



## INFORME TECNICO FINAL

<b>Nombre del proyecto</b>	Micotoxinas: Diseño y Desarrollo de un Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA) aplicado a frutos secos
<b>Código del proyecto</b>	PYT – 2016 - 0064
<b>Informe final</b>	2
<b>Período informado</b> (considerar todo el período de ejecución)	Desde el 1 dic 2015 hasta el 15 julio 2019
<b>Fecha de entrega</b>	23 septiembre 2019

<b>Nombre coordinador</b>	Jessica Millar Arellano
<b>Firma</b>	

## INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR Y PRESENTAR EL INFORME

- Todas las secciones del informe deben ser contestadas, utilizando caracteres tipo Arial, tamaño 11.
- Sobre la información presentada en el informe:
  - Debe dar cuenta de todas las actividades realizadas en el marco del proyecto, considerando todo el período de ejecución, incluyendo los resultados finales logrados del proyecto; la metodología utilizada y las modificaciones que se le introdujeron; y el uso y situación presente de los recursos utilizados, especialmente de aquellos provistos por FIA.
  - Debe estar basada en la última versión del Plan Operativo aprobada por FIA.
  - Debe ser resumida y precisa. Si bien no se establecen números de caracteres por sección, no debe incluirse información en exceso, sino solo aquella información que realmente aporte a lo que se solicita informar.
  - Debe ser totalmente consistente en las distintas secciones y se deben evitar repeticiones entre ellas.
  - Debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero final y ser totalmente consistente con ella.
- Sobre los anexos del informe:
  - Deben incluir toda la información que complemente y/o respalde la información presentada en el informe, especialmente a nivel de los resultados alcanzados.
  - Se deben incluir materiales de difusión, como diapositivas, publicaciones, manuales, folletos, fichas técnicas, entre otros.
  - También se deben incluir cuadros, gráficos y fotografías, pero presentando una descripción y/o conclusiones de los elementos señalados, lo cual facilite la interpretación de la información.
- Sobre la presentación a FIA del informe:
  - Se deben entregar tres copias iguales, dos en papel y una digital en formato Word (CD o pendrive).
  - La fecha de presentación debe ser la establecida en el Plan Operativo del proyecto, en la sección detalle administrativo. El retraso en la fecha de presentación del informe generará una multa por cada día hábil de atraso equivalente al 0,2% del último aporte cancelado.
  - Debe entregarse en las oficinas de FIA, personalmente o por correo. En este último caso, la fecha válida es la de ingreso a FIA, no la fecha de envío de la correspondencia.
- El FIA se reserva el derecho de publicar una versión del Informe Final editada especialmente para estos efectos.

## CONTENIDO

1.	ANTECEDENTES GENERALES .....	4
2.	EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO .....	4
3.	RESUMEN EJECUTIVO .....	5
4.	OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.....	6
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE).....	7
6.	RESULTADOS ESPERADOS (RE).....	8
7.	CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO.....	24
8.	ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO.....	26
9.	POTENCIAL IMPACTO.....	27
10.	CAMBIOS EN EL ENTORNO.....	28
11.	DIFUSIÓN.....	29
12.	PRODUCTORES PARTICIPANTES .....	30
13.	CONSIDERACIONES GENERALES.....	31
14.	CONCLUSIONES .....	32
15.	RECOMENDACIONES .....	32
16.	ANEXOS.....	33
17.	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA .....	

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre Ejecutor:	Asociación gremial de productores y exportadores de nueces de Chile AG
Nombre(s) Asociado(s):	Universidad de Chile
Coordinador del Proyecto:	Jessica Millar Arellano
Regiones de ejecución:	Región Metropolitana y Valparaíso
Fecha de inicio iniciativa:	01 diciembre 2015
Fecha término Iniciativa:	15 julio 2019

## 2. EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO

Costo total del proyecto			
Aporte total FIA			
Aporte Contraparte	Pecuniario		
	No Pecuniario		
	Total		

Acumulados a la Fecha		Monto (\$)
Aportes FIA del proyecto		
1. Total de aportes FIA entregados		
2. Total de aportes FIA gastados		
3. Saldo real disponible (Nº1 – Nº2) de aportes FIA		
Aportes Contraparte del proyecto		
1. Aportes Contraparte programado	Pecuniario	
	No Pecuniario	
2. Total de aportes Contraparte gastados	Pecuniario	
	No Pecuniario	
3. Saldo real disponible (Nº1 – Nº2) de aportes Contraparte	Pecuniario	
	No Pecuniario	

### 3. RESUMEN EJECUTIVO

#### 3.1 Resumen del período no informado

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante el período comprendido entre el último informe técnico de avance y el informe final. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

Se desarrolló un protocolo de Buenas Prácticas de Manufacturación en la Producción de Nueces, en el cual se acopian referencias directas a normativas vigentes hoy en Chile, y al cumplimiento de las normativas establecidas por el mercado internacional para la exportación de nueces enteras, sin cáscara, frescas y secas, con el objetivo de garantizar la calidad e inocuidad de las nueces producidas en Chile y perfeccionar la calidad y oportunidad de la detección e información sobre micotoxinas, hongos toxigenicos, EPT y parámetros ambientales que afectan la inocuidad alimentaria.

Este protocolo fue difundido a todos los actores involucrado de la producción del nogal socios de Chilenut a través, de la entrega de un manual impreso y formato on line en la página web de Chilenut [www.chilenut.cl](http://www.chilenut.cl).

Además, se realizó la implementación del Protocolo de Buenas Prácticas de Manufacturación en la Producción de Nueces en 6 plantas de procesadoras de nueces asociadas a Chilenut. A las cuales se les realizo una visita con el objetivo de diagnosticar a través de una inspección visual su proceso de inocuidad alimentaria y se establecieron oportunidades de mejoras continuas que se podrían instalar en el plan de gestión de cada empresa.

Con fecha jueves 20 de junio a las 12:30 horas, se realizó el seminario de transferencia de la metodología analítica HPLC para determinar la contaminación de nueces por AFLAs y OTA, en el marco del Programa de Fisiología y Biofísica del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, a profesionales del área.

Finalmente, se dio termino a las actividades con el seminario de cierre de proyecto, este se llevo a cabo el día 9 de julio en el Hotel Atton Las Condes, en esta instancia se presentaron los resultados de este proyecto y se hizo entrega del Manual a jefes de calidad e inocuidad de plantas exportadoras.

#### 3.2 Resumen del proyecto

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante todo el período de ejecución del proyecto. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

El fantasma de las crisis en seguridad alimentaria ha venido recurrentemente alarmando al mundo. Los brotes de hongos toxigénicos han sido frecuentes en países de gran importancia agrocomercial. La salud humana y la economía de las industrias de este sector productivo han recibido los mayores impactos negativos. En Europa, una red de 1.200 laboratorios de referencia vigila la calidad alimentaria. Sólo 80 de éstos cuentan con el sello de Laboratorios de Referencia Comunitaria. Estos laboratorios se han focalizado en optimizar el análisis de micotoxinas y elementos pesticidas trazas (EPT) en alimentos. Europa se ha propuesto la meta principal de unificar sus criterios analíticos para estas sustancias en la red completa de sus laboratorios. Europa es un mercado principal para agroproductos chilenos. Infortunadamente, Chile carece de infraestructura analítica para enfrentar las demandas de sus mercados compradores de productos

sensibles a hongos toxigénicos, como son frutos secos, frutos deshidratados, uva y vino, entre otros.

El presente Proyecto estuvo orientado a generar conocimientos e innovaciones científicas y tecnológicas que contribuyan a garantizar la calidad e inocuidad de frutos secos (nueces) producidos en Chile, así como a perfeccionar la calidad y oportunidad de la detección e información sobre micotoxinas y hongos toxigénicos, los que constituyen componentes elementales en la evaluación del riesgo aplicado a la inocuidad alimentaria.

La información científica/tecnológica de apoyo a la investigación asociada al impacto de las micotoxinas en las cadenas agroalimentarias, orientada al cumplimiento de las normativas del mercado internacional, se obtuvo de manera expedita e inmediata desde un Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA). Se espera que éste pase a constituir la base de la alerta temprana *in situ* de focos tóxicos y contaminantes que, junto con asegurar la calidad e inocuidad alimentaria, respalde la gestión productiva de las empresas asociadas al rubro frutos secos (nueces).

Como metas específicas de PRIMACIA alcanzadas mediante el Proyecto están:

1. Generar información base para el diseño y desarrollo de PRIMACIA como apoyo a la investigación asociada con el impacto de micotoxinas en las cadenas agroalimentarias.
2. Aumentar el conocimiento sobre la biodiversidad de los hongos toxigénicos, como apoyo a los estudios de análisis de riesgo y de estrategias de control de las contaminaciones.
3. Implementar y transferir una metodología analítica robusta y confiable para detectar y cuantificar micotoxinas que contaminan los frutos como herramienta de control y establecimiento de estrategias de protección del patrimonio fitosanitario del país.
4. Diseñar y desarrollar un Manual de inocuidad alimentaria, que permita generar una propuesta científico/tecnológica para la definición de estándares sanitarios o bases para una normativa de inocuidad para contaminantes o parámetros relevantes en algunos grupos taxonómicos de suelos del país, que contribuyan a prevenir la micotoxicidad, u otros impactos asociados al ecosistema.

Los resultados del proyecto son de uso público y pueden ser comunicados a las autoridades nacionales competentes (ACHIPIA, Ministerio de Agricultura y Autoridades Sanitarias). Se espera que este prototipo de Programa Integrado de Monitoreo y Análisis de Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA) sea incorporado a los programas de modernización del Estado de Chile.

#### **4. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO**

Diseñar y desarrollar un Programa Integrado de Monitoreo y Análisis de Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA) que permita detectar y monitorear micotoxinas (Aflatoxinas y Ocratoxina A) y Pesticidas a lo largo de toda la cadena productiva en el clusters de Frutos secos (nueces), con la misma sensibilidad utilizada actualmente en la Unión Europea (UE). El Programa permitirá identificar los puntos críticos de contaminación en estas líneas de producción, para determinar tendencias en la proliferación de los hongos tóxicos asociados y construir así una base de datos, de utilidad en la toma decisiones regulatorias.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

### 5.1. Porcentaje de Avance

El porcentaje de avance de cada objetivo específico se calcula luego de determinar el grado de avance de los resultados asociados a éstos. El cumplimiento de un 100% de un objetivo específico se logra cuando el 100% de los resultados asociados son alcanzados.

Nº OE	Descripción del OE	% de avance al término del proyecto <sup>1</sup>
1	Generar cultivos de hongos puros asociados a micotoxinas, caracterizarlos mediante técnicas microscópicas y determinar su toxicidad (capacidad de producción de toxinas).	100
2	Desarrollar e implementar métodos analíticos HPLC/FL para identificar y cuantificar Aflatoxinas y Ocratoxina A, en muestras de nueces, validado de acuerdo con normativas internacionales que permita su acreditación INN según NCh ISO 17025/2005.	100
3	Determinar el perfil y la contaminación por AFLAs y OTA en los distintos componentes de las muestras de nueces recolectadas en 3 etapas de la línea de producción (huerto, bodega y packing) para desarrollar metodología de análisis de riesgo.	100
4	Desarrollar e implementar un Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA) aplicado a nueces, el que estará orientado al cumplimiento de las normativas establecidas por el mercado internacional para la exportación de nueces enteras, sin cáscara, frescas y secas.	80
5	Transferir y difundir la tecnología referida a identificación tanto de hongos toxigénicos, análisis e identificación de micotoxinas como estructura del Programa de Sanidad de Frutos secos, desde el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Chile a las empresas asociadas a Chilenut.	63

<sup>1</sup> Para obtener el porcentaje de avance de cada Objetivo específico (OE) se promedian los porcentajes de avances de los resultados esperados ligados a cada objetivo específico para obtener el porcentaje de avance de este último.

## 6. RESULTADOS ESPERADOS (RE)

Para cada resultado esperado debe completar la descripción del cumplimiento y la documentación de respaldo.

### 6.1. Cuantificación del avance de los RE al término del proyecto

El porcentaje de cumplimiento es el porcentaje de avance del resultado en relación con la línea base y la meta planteada. Se determina en función de los valores obtenidos en las mediciones realizadas para cada indicador de resultado.

El porcentaje de avance de un resultado no se define según el grado de avance que han tenido las actividades asociadas éste. Acorde a esta lógica, se puede realizar por completo una actividad sin lograr el resultado esperado que fue especificado en el Plan Operativo. En otros casos se puede estar en la mitad de la actividad y ya haber logrado el 100% del resultado esperado.

N º O E	Nº R E	Resultad o Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						% de cum plimi ento
			Nombre del indicador	Fórmul a de cálculo	Línea base <sup>2</sup>	Meta del indicador <sup>3</sup> (situación final)	Fecha alcance meta program ada <sup>4</sup>	Fecha alcanc e meta real <sup>5</sup>	
1	1	Caracteri zación morfológi ca de hongos	Cultivo y aislación de cepas de hongos	Nº de Colonia s por placa	0	Identificación de hongos micotoxigéni cos	30-10- 2016	30-10- 2016	100

Para estudiar el potencial peligro del desarrollo de hongos productores de micotoxinas en nueces, se realizó una prospección de inóculos potencial de hongos productores de micotoxinas en diferentes nocedales de la Región Metropolitana y Valparaíso.

Para la identificación de hongos toxigénicos se tomaron muestras de: hojas, pelón, cascara y semilla obtenidas directamente desde arboles suelo y bodega en distintos predios durante el periodo de cosecha de la temporada 2016, con el objetivo de correlacionar estas observaciones con la detección de micotoxinas en los frutos y semillas. Para ello se utilizaron técnicas de cultivo para hongos en medios convencionales para luego realizar su identificación microscópica a nivel de género. Como medio de cultivo se usó agar papa dextrosa (APD). Como se indicó anteriormente, las muestras consistieron en hojas, frutos y semillas de nogal recolectadas en el campo y al momento de su procesamiento en el packing, procedentes de predios y centros de procesamiento de nueces. Las muestras fueron debidamente identificadas y trasladadas al laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, donde fueron almacenadas a 6°C durante 5 a 7 días.

En el caso de las semillas, una parte fue dejada en cámara húmeda a 27°C por 7 días. Los hongos que se desarrollaron se aislaron en medio de cultivo APD modificado (incorporación de 0,1 g. de cloranfenicol por litro de medio). A partir de las colonias de hongos obtenidas se hicieron cultivos puros en APD y se identificaron a nivel de género a través de características morfológicas microscópicas.

<sup>2</sup> Línea base: corresponde al valor que tiene el indicador al inicio del proyecto.

<sup>3</sup> Meta del indicador (situación final): es el valor establecido como meta en el Plan Operativo.

<sup>4</sup> Fecha alcance meta programada: es la fecha de cumplimiento de la meta indicada en el Plan Operativo.

<sup>5</sup> Fecha alcance meta real: es la fecha real de cumplimiento al 100% de la meta. Si la meta no es alcanzada, no hay fecha de cumplimiento.

Nº O E	Nº R E	Resultado o Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						% de cum plimi ento
			Nombre del indicador	Fórmul a de cálculo	Línea base <sup>2</sup>	Meta del indicador <sup>3</sup> (situación final)	Fecha alcance meta program ada <sup>4</sup>	Fecha alcanc e meta real <sup>5</sup>	
1	1	Caracteri zación morfológi ca de hongos	Cultivo y aislación de cepas de hongos	Nº de Colonia s por placa	0	Identificación de hongos micotoxigéni cos	30-10- 2016	30-10- 2016	100

Para la identificación a nivel de especie de las cepas aisladas y previamente separadas acorde con sus características morfológicas microscópicas, se enviaron cultivos al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, quienes realizaron la identificación molecular de las cepas.

Con las diferentes cepas aisladas y caracterizadas genotípicamente, como se indicó antes (identificación y potencial toxicogénico) se conformó una colección cepario, que fue almacenada en el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

De acuerdo a la prospección realizada se determinó que prácticamente en todas las muestras hubo presencia de *Penicillium spp.* y de *Aspergillus spp.*, hongos potencialmente toxigénicos. Al comparar un mismo nocedal y lugar de obtención de la muestra, la cantidad de inóculo en la cáscara fue mayor que en la semilla. En general, se determinó una mayor cantidad de inóculo en las muestras de cáscaras y semillas, de frutos provenientes del suelo que, de los obtenidos directamente de los árboles, a excepción de uno de los nocedales.

**Anexo Nº1:** Determinación de la presencia de *Penicillium sp.*, y *Aspergillum sp.*, en nogal.

**Anexo Nº2:** Identificación genotípica

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
1	2	Determinación toxicidad del hongo	Capacidad de producción de toxinas	Cantidad de Toxina/ml	No existe	Presencia de toxina	30-03-2017	30-03-2017	100

Las muestras de hongos previamente seleccionadas e identificadas molecularmente fueron cultivadas y sometidas por nueve días a un tratamiento de estrés oxidativo en caldo de papa más glucosa al 1,8%, al cual se le añadió 100 µM de hidroperóxido de terc-Butilo al 70%, para promover la producción de micotoxinas y su posterior análisis cromatográfico mediante metodología HPLC-FL. De las muestras de hongos analizadas cromatográficamente solo resultaron positivas para Ocratoxina A (OTA) las muestras de *Aspergillus tubingensis* (stress de tiempo) y la muestra de FN10-S-4 correspondiente a *Penicillium brevicompactum* (stress químico). Todas las muestras de hongos analizadas resultaron negativas para Aflatoxinas.

**Tabla N°1. Análisis de Toxicidad de Muestras de Hongos Identificados Molecularmente**

Nº	Lugar de origen	Tipo muestra	Identificación de Hongo	Toxicidad
1	<b>Chincolco</b> V Región - Prov Petorca	Pelón (árbol)	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	Negativo para OTA y AFLAs
2	<b>Lo Herrera</b> Región Metropolitana - Prov Maipo	Cáscara (suelo)	<i>Penicillium expansum</i>	Negativo para OTA y AFLAs
3	<b>Chincolco</b> V Región - Prov Petorca	<b>Semilla (suelo)</b>	<b><i>Penicillium brevicompactum</i></b>	<b>Positivo para OTA (stress químico)</b>
4	<b>Lo Herrera</b> Región Metropolitana - Prov Maipo	<b>Semilla (árbol)</b>	<b><i>Penicillium brevicompactum</i></b>	<b>Negativo para OTA y AFLAs</b>
5	<b>Chincolco</b> V Región - Prov Petorca	Pelón (árbol)	<i>Penicillium echinulatum</i>	Negativo para OTA y AFLAs
6	<b>Chincolco</b> V Región - Prov Petorca	Hojas (árbol)	<i>Penicillium sp</i>	Negativo para OTA y AFLAs
7	<b>Lo Herrera</b> Región Metropolitana - Prov Maipo	Semilla (suelo)	<i>Penicillium buchwaldii</i>	Negativo para OTA y AFLAs
8	<b>San Esteban</b> V Región - Prov Los Andes	Semilla (bodega)	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Positivo para OTA (stress metabólico)

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

**Anexo N°3A:** Stress Químico

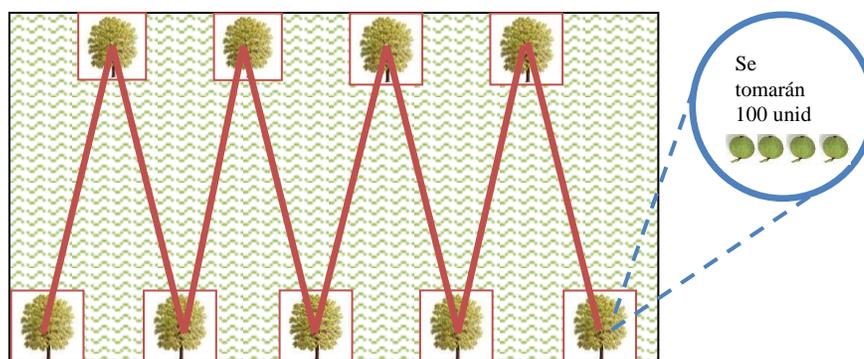
**Anexo N°3B:** Stress de Tiempo

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance e meta programada		
2	3	Método HPLC Validado para la determinación de AFLAs y OTA	Curvas de Calibración y Análisis de Recuperabilidad	$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} + S_{yy}}}$	r = 0,99 R = 94 %	Valores entre r= 0.89 - 0,99 R = 90 y 110 %	30-10-2016	30-10-2016	100
<p>Determinación de AFLAs/OTA a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección de fluorescencia: Las muestras de nueces obtenidas, fueron extraídas en una solución mezcla de solventes orgánicos, posteriormente limpiadas a través de columnas de inmunoafinidad y derivatizadas. Finalmente, fueron inyectadas al equipo HPLC con detector de fluorescencia.</p> <p>Validación de método HPLC-FD: El método HPLC-FD fue implementado y validado, tomando como referencia la guía técnica "Aspectos generales sobre la validación de métodos" del Instituto de Salud Pública y AOAC. Para ello, se confeccionaron protocolos de validación del método analítico a partir de una solución estándar de AFLAs/OTA y de material fortificado, para determinar la linealidad, determinar la sensibilidad, límites de detección y cuantificación, precisión, selectividad del método.</p> <p>Validación del método analítico a partir de material fortificado: Se realizaron curvas de calibración con matriz fortificada, donde se determinó:</p> <p>Linealidad: Se realizó una curva de calibración con material (nueces) fortificado con soluciones estándar de AFLAs y OTA.</p> <p>Límite de detección y cuantificación de solución estándar AFLAs/OTA: Es calculado a partir de la desviación estándar de los residuales del calibrado, utilizando el punto de menor concentración de la recta de calibrando del método analítico.</p> <p>Recuperación: El porcentaje de recuperación fue calculado a partir del material fortificado. Para dichos cálculos se tomaron la concentración obtenida de las muestras en duplicado y la concentración teórica del material fortificado.</p> <p>Precisión del Método: La precisión del método analítico se determinó a partir de la repetibilidad y reproducibilidad del método.</p> <p><b>Anexo N°4A:</b> Protocolo de determinación de aflatoxinas en muestras de nueces.</p> <p><b>Anexo N°4B:</b> Protocolo de determinación de Ocratoxina A en muestras de nueces.</p>									

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	4	Análisis de riesgo basado en 2 periodos consecutivos de cosecha	Identificación de puntos de contaminación	2 matrices contaminadas	0	Identificación de puntos de riesgo de la intoxicación	30/11/2017	30/08/2018	100

Durante los periodos de cosecha de nueces de los años 2016 y 2017, se analizaron un total de 67 y 97 muestras, respectivamente. Estas muestras provinieron de huertos de nogales en la Región Metropolitana, localidad de Lo Herrera, y la Región de Valparaíso en la localidad de San Esteban y Chicolco, durante 2 temporadas, a fin de alcanzar observaciones y resultados comparativos que dieran un mayor respaldo a un análisis de riesgo.

El muestreo se realizó en 2 etapas de la línea de producción: huerto (árbol) y bodega de almacenamiento, en los cuales se analizaron distintas partes del fruto (semillas, cascara y pelón), que permitieron establecer la trazabilidad de la contaminación. De los árboles muestreados en campo de cultivo, aleatoriamente se tomaron de 25 a 30 árboles, aplicándose un muestreo en forma de "W o Z" como se muestra en la Figura 1, colectando aproximadamente 100 unidades de nueces. En las muestras de nueces cosechadas y almacenadas en bodega se tomaron muestras aleatoriamente de diferentes bins de aproximadamente 2 kilos.



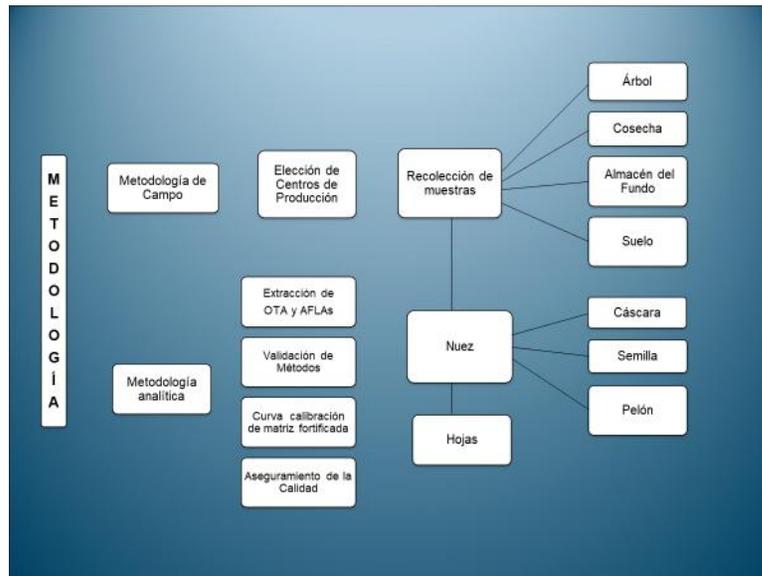
**Figura N°1: Descripción muestreo en forma de W o Z.**

Muestreo en forma de "W o Z", como se indica en FOOD AND VETERINARY OFFICE. 2008. Sampling Methods in Agriculture

Una vez culminado el trabajo en campo y previo al análisis, todas las muestras de nueces fueron acondicionadas en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Para la determinación de la contaminación por AFLAs Y OTA de las matrices en estudio, se realizaron de acuerdo al Procedimiento de Extracción de Ocratoxina A y Aflatoxinas, los cuales fueron desarrollados y validados por el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. La determinación del perfil de contaminación, la metodología analítica se enfocó en la determinación de las 4 especies de Aflatoxinas (AFLA B1, AFLA B2, AFLA G1 y AFLA G2), y en la determinación de Ocratoxina A. Para esto, se utilizó el método de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia, que fue desarrollado e implementado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es la técnica analítica de separación más utilizada en la actualidad. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y su especificidad, lo que permite utilizarla para la identificación de compuestos de primordial interés en la industria.

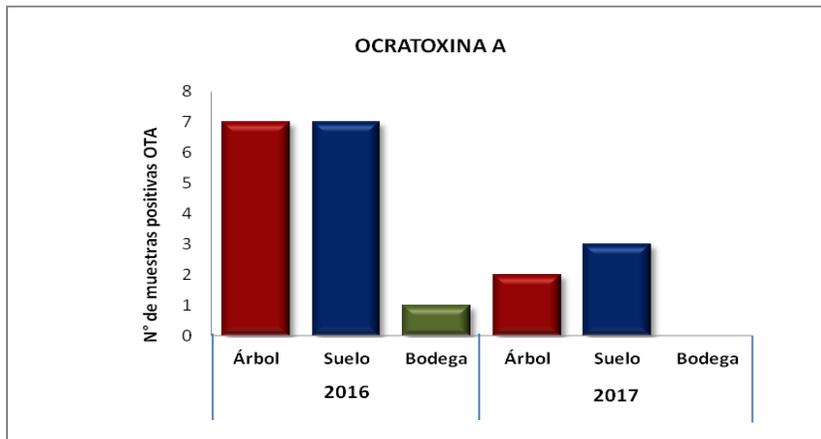
Las muestras fueron analizadas, utilizando columnas de inmunoafinidad y de extracción de fase sólida (SPE) de 3 mL, 500 mg, fase reversa unida a gel de sílica (Octadecyl C18). Las ventajas de estas columnas es su bajo costo y los antecedentes previos del Laboratorio de Toxicología en el uso de la extracción de OTA en otras matrices con excelentes resultados.



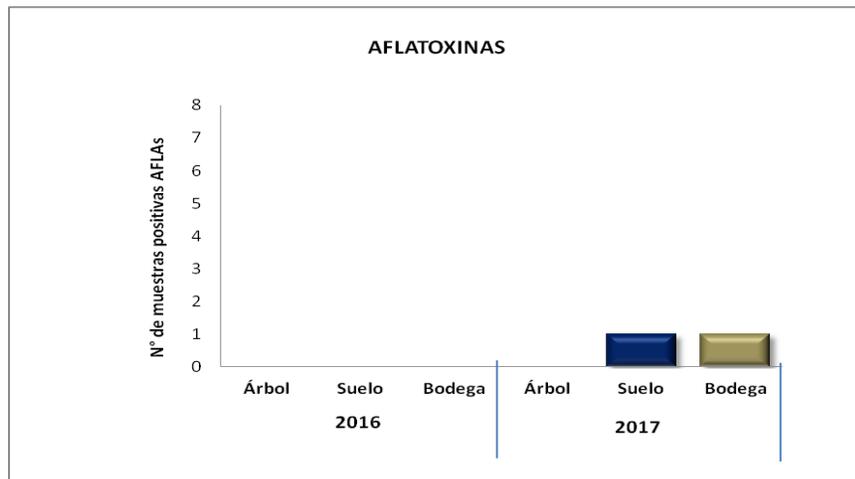
**Figura 2. Metodología de recolección de muestras de campo y análisis de muestras**

**En base a los análisis realizados se obtuvieron las siguientes conclusiones**

- 1.- Para una misma procedencia y sector, la cantidad de UFC en las muestras de cáscara es mayor que en las semillas.
2. Las muestras de estructuras (cáscara y semilla) de frutos provenientes del suelo presentan usualmente una mayor cantidad de UFC / g de muestra en comparación con muestras provenientes de los árboles.
3. Solo se determinó presencia de *Aspergillus* sp. en una muestra de semilla (Nuez pulpa) del sector San Esteban. De las muestras estudiadas para la producción de micotoxinas, las especies *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* y *Aspergillus tubingensis* resultaron positivas para Ocratoxina A (OTA). La especie *Penicillium brevicompactum* fue positiva para Aflatoxina B2 (AFLA/B2).



**Figura N° 3: Muestras de nueces positivas a Ocratoxina A, que fueron recolectadas durante el período de cosecha del año 2016 y 2017, provenientes de árbol, suelo y bodega.**



**Figura N° 4: En el año 2016 no se observaron muestras positivas para aflatoxinas. En el año 2017 se observaron dos muestras de nueces positivas a Aflatoxinas (Bodega: G1, B1, G2 y B2 y Suelo B1),**

**Análisis de riesgo en el manejo del cultivo:** Los antecedentes arriba indicados fueron considerados para la determinación de los puntos críticos de la contaminación de los productos del nogal con las micotoxinas en estudio.

En general las cosechas de las nueces (modelos con sistema de recolección por aspiración y/o mecánico) se realizan desde el suelo. De acuerdo con los resultados de desarrollos de hongos potencialmente tóxicos, se observa una mayor cantidad de UFC/g de muestra, en cáscaras y semillas de nuez provenientes del suelo que de los árboles

En consecuencia, las nueces cosechadas desde el suelo (y expuesta al polvo del suelo) están en riesgo potencial de contaminación de hongos provenientes de este sustrato. De esta manera, el suelo es el punto crítico de mayor importancia en la contaminación de las nueces con micotoxinas.

- Anexo N°5A,** Muestras Chicolco 2016
- Anexo N°5B,** Muestras Chicolco 2017
- Anexo N°5C,** Muestras Lo Herrera 2016
- Anexo N°5D,** Muestras Lo Herrera 2017
- Anexo N°5E,** Muestras San Esteban 2017
- Anexo N°5F** AM1 RL1

N O E	N O R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	5	Determinar el perfil y la contaminación AFLAs y OTA en distintos componentes de las muestras recolectadas	Perfil de toxinas	Toxinas /muestra	0	Presencia de contaminación por muestra	30/10/2018	30/10/2018	100

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Con el fin de ampliar la cobertura geográfica del proyecto, durante el período de cosecha de nueces de la temporada 2018, se realizó un muestreo en 3 etapas de la línea de producción: huerto (árbol), bodega y packing, en 15 huertos de los asociados de Chilenuit, distribuidos entre la IV y IX Región. El número de huertos a muestrear en cada Región se determinó en función de la superficie plantada con nogales, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla N°1: Descripción de la recolección de muestras en campo por región.**

Región	Superficie Plantada (ha)	Nº de Predio	Nº muestras para análisis AFLAs	Nº de muestras para análisis OTA
Coquimbo	2.466,1	1	75	75
Valparaíso	5.644	2	150	150
Metropolitana	10.948,9	4	300	300
O'Higgins	5.527	3	300	300
Maule	2.436,4	2	150	150
Bio Bio	808,1	2	150	150
La Araucanía	95,3	1	75	75
TOTAL		15	1275	1275

El análisis de las distintas partes del fruto (semilla, la cáscara y el pelón), permitió establecer la trazabilidad de la contaminación según la etapa en estudio. De los árboles muestreados en campo de cultivo, aleatoriamente se tomaron de 25 a 30 árboles. Es importante destacar que, el hecho de analizar pelón y cáscaras de nuez sirvió para determinar los posibles puntos críticos de la contaminación con micotoxinas.

De las nueces cosechadas y almacenadas en bodega se tomaron las muestras de la siguiente forma. Todas las muestras fueron recolectadas aleatoriamente de diferentes bins. Cada muestra fue de aproximadamente 2 kg.

En el caso de la toma de muestras en packing, se procedió a la toma de muestra al inicio de la línea de partidura manual o mediante maquina se tomó muestra de una señora en partidura, se tomó una segunda muestra en la línea de selección y una última muestra al final de la línea de embalaje, antes de pasar al sellado de la bolsa atmosfera.

Una vez culminado el trabajo en campo y previo al análisis, todas las muestras de nueces fueron acondicionadas en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

N º O E	N º R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	5	Determinar el perfil y la contaminación AFLAs y OTA en distintos componentes de las muestras recolectadas	Perfil de toxinas	Toxinas /muestra	0	Presencia de contaminación por muestra	30/10/2018	30/10/2018	100

Todas las muestras colectadas fueron analizadas en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. La determinación de la contaminación por AFLAs y OTA de las matrices en estudio, se realizará de acuerdo a los protocolos de Procedimiento de Extracción y Análisis de las micotoxinas en estudio.

El estudio permitió establecer que todas las muestras de nueces analizadas resultaron negativas tanto para los distintos tipos de AFLAs estudiadas como para OcrA, no observándose influencia alguno de las distintas partes del fruto ni del origen geográfico de las muestras. Sin embargo, se considera un cumplimiento de 100% dado que se logró determinar el perfil de contaminación de las distintas muestras colectadas.

**Anexo N°6:** Grafico número de muestras analizadas periodo 2018

N O E	N O R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcanc e meta real	% de cu mpl imi ent o
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
4	6	Desarrollo del Programa Integrado de Monitoreo y Análisis Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA)	Manual PRIMACIA	Nº manuales explicativos	0	1	30/12/2018	10/06/2019	100

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Se desarrolló un protocolo de Buenas Prácticas de Manufacturación en la Producción de Nueces, en el cual se acopian referencias directas a normativas vigentes hoy en Chile, y al cumplimiento de las normativas establecidas por el mercado internacional para la exportación de nueces enteras, sin cáscara, frescas y secas, con el objetivo de garantizar la calidad e inocuidad de las nueces producidas en Chile y perfeccionar la calidad y oportunidad de la detección e información sobre micotoxinas, hongos toxigénicos, EPT y parámetros ambientales que afectan la inocuidad alimentaria.

El protocolo contiene la descripción de las actividades que deben seguirse en la realización de las diferentes funciones propias de una bodega de almacenamiento de nueces. Este protocolo incluye, además, los cargos o unidades de producción y administrativas que intervienen, precisando su responsabilidad y participación. Asimismo, el Manual contiene información y ejemplos de formularios, autorizaciones o documentos necesarios, instrumentos de producción y equipos de oficina a utilizar, como también cualquier otro dato que pueda contribuir al correcto desarrollo de las actividades dentro de las instalaciones de la empresa. En él se encuentra registrada y transmitida sin distorsión, la información básica referente al funcionamiento de todas las unidades de producción y administrativas facilita las labores de auditoría, la evaluación y control interno y su vigilancia, y estimula la conciencia en empleados y jefes, respecto de si el trabajo se está realizando o no adecuadamente.

Este protocolo fue difundido a todos los actores involucrados en la producción de nogal y quedó alojado en forma online en la página web de Chilenut ([www.chilenut.cl](http://www.chilenut.cl)). Ha habido gran interés de los socios de Chilenut especialmente de los socios exportadores en dar a conocer a sus productores proveedores esta información respecto a la calidad e inocuidad de las nueces. Además, en los encuentros regionales de Chilenut se entregó este protocolo.

**Anexo N°7:** Protocolo de Buenas Prácticas de Manufacturación en la Producción de Nueces en Centros Nacionales.

**Anexo N°8:** Link de descarga en página de Chilenut de protocolo. [http://www.chilenut.cl/docs/BPM\\_Nueces.pdf](http://www.chilenut.cl/docs/BPM_Nueces.pdf)

N O E	N O R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
4	7	Implementación del Programa Integrado de Monitoreo y Análisis de Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA)	Participación de empresas en el Programa	Nº Empresas asociadas al programa	6	10	30/07/2019	30/07/2019	60

En el desarrollo de la implementación del Programa Integrado de Monitoreo y Análisis de Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA), se visitaron distintas plantas procesadoras de nueces asociadas a Chilenut para determinar los procedimientos y conocimientos de empleados y jefes en materia de inocuidad alimentaria. Cabe destacar que esta implementación solo constituye observaciones visuales generales en un proceso de inocuidad alimentaria. Asimismo, se establece dentro del marco de las "mejoras continuas" gestiones que se podrían instalar en el Plan de Gestión de cada Empresa.

Las inspecciones fueron efectuadas entre el 28 de mayo y el 26 de junio del 2019, y participaron colaborativamente 6 empresas socias de Chilenut:

1. **Baika Chilean Fruit.** Representada por Sra. Elizabeth Castro Milla, Encargada de Calidad (Cuidad de San Felipe, Provincia de Los Andes, región de Valparaíso). Fecha de Inspección: 28/05/19
2. **Exportadora Frunut.** Representada por Sres. Rafael Bianchini, Gerente Comercial y Alvaro Baeza, encargado de Aseguramiento, Calidad e Inocuidad (Comuna de San Esteban, Provincia de Los Andes, región de Valparaíso). Fecha de Inspección: 28/05/19
3. **Agrícola y Comercial Fiume S.A.** Representante Sr. Diego Matus, responsable del Sistema de Gestión de Calidad e Inocuidad (Comuna de San Bernardo, Provincia del Maipo, región Metropolitana). Fecha de Inspección: 29/05/19
4. **Frutexa.** Representada por Sr. Juan Hermosilla, Encargado de Aseguramiento de Calidad (Comuna de Buin, Provincia de Maipo, región Metropolitana). Fecha de Inspección: 29/05/19
5. **Vitakai.** Representada por Sr. Renzo Muñoz, encargado del Área de Aseguramiento de Calidad (Comuna de El Monte, Provincia de Talagante, región Metropolitana). Fecha de Inspección: 26/06/19
6. **Growex.** Representada por Sra. Nicole Quinteros, encargada de Aseguramiento de Calidad (Comuna de Isla de Maipo, Provincia de Talagante, región Metropolitana). Fecha de Inspección: 26/06/19.

Del total de empresas inspeccionadas se determino que solo 1 no cuenta con un sistema de inocuidad implementado. El resto tiene implementado HACCP y además poseen acreditación BRC, que es un estándar mundial para la seguridad de los alimentos.

N O E	N O R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
4	7	Implementación del Programa Integrado de Monitoreo y Análisis de Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA)	Participación de empresas en el Programa	Nº Empresas asociadas al programa	6	10	30/07/2019	30/07/2019	60
<p>Como propuestas de mejora a las plantas procesadoras se abordaron los siguientes puntos:</p> <p>1.- Alerta temprana: se sugiere realizara análisis de identificación morfológica de hongos toxigénicos para predecir el riesgo de contaminación toxicológica temprana.</p> <p>2.- Control de la inocuidad del producto: el análisis de micotoxina debe realizarse por productor y no por mix de productos de distintos orígenes; los análisis de micotoxinas deben realizarse en la cascara y por separado, para así evitar la contaminación cruzada; los análisis de hongos micotoxigénicos deben realizare en los siguientes puntos en la línea de producción: termino de cosecha, antes del envase y antes del envío a destino.</p>									
<p><b>Anexo N°9:</b> Implementación del Programa</p> <p><b>Anexo N°10:</b> Informe visita a empresas</p>									

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
5	8	Tecnología transferida	Agricultores capacitados	Nº Agricultores capacitados	0	100	30/10/2018	30/10/2018	100	

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

En base al diagnóstico realizado en los encuentros regionales de Chilenuit en las ciudades de Linares y Los Andes durante junio y julio de 2017, se determinó que el 90% de los encuestados no contaban con información referente a la presencia de Micotoxinas en nueces y sus posibles consecuencias. Por lo anterior, se determinó necesario realizar talleres informativos y educativos en los temas de inocuidad y contaminación alimentaria, que se realizaron durante los semanarios regionales de Chilenuit durante el año 2018, entre los meses de junio y agosto en las ciudades de Chillan, Talca y Linares.

En los talleres de capacitación se realizó un quiz de diagnóstico antes y después de la exposición de Américo López, para determinar el nivel de conocimiento y aprendizaje de los asistentes en base a la charla presentada. Los talleres contaron en total con 101 asistentes, principalmente productores y asesores de nogal, que, de acuerdo con los datos obtenidos entre el quiz de entrada y quiz posterior a la charla de capacitación, lograron incrementar su nivel de conocimiento en la materia, se evidencia en la figura N° 5

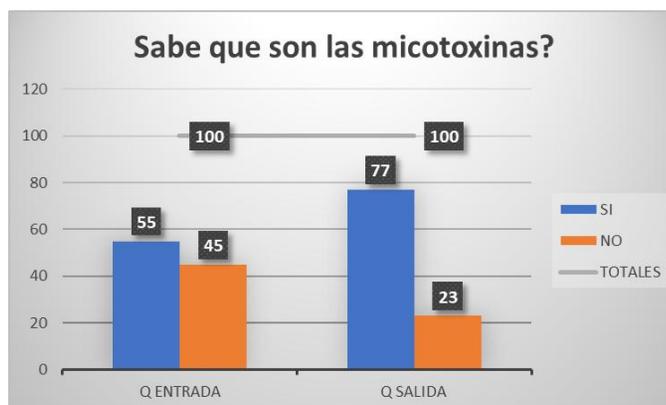


Figura N°5: ¿Sabe que son las micotoxinas?

**Anexo N° 11:** Resultado de diagnóstico realizadas a productores

**Anexo N°12:** Quiz a productores

**Anexo N°13:** Resultados encuestas

**Anexo N°14:** Presentación AM Lopez Linares 2018

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	
5	9	Difusión	Publicación de artículos en revista agronómica de circulación nacional	Cantidad de publicaciones de artículos en revista agronómica nacional	2	2	15/11/2016 30/09/2018	15/11/2016 01/04/2018	100
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.									
Se realizó la difusión en News Letter de CHILENUT INFONUT, así como también la publicación de un artículo de divulgación en una revista agronómica Red Agrícola).									
<b>Anexo N°15</b> Para detectar micotoxinas en nueces. Red Agrícola.									

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	
5	10	Difusión	Publicación de artículos en revista científica	Cantidad de publicaciones de artículos científico	0	0	30/07/2019	30/07/2019	0
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.									
En relación a la publicación en Revista Científica: Los resultados analíticos del proyecto no evidenciaron ningún antecedente que pudiera ser de interés para una publicación científica. Todas las muestras fueron negativas para la contaminación de las micotoxinas del estudio. Sin embargo, es importante destacar se realizaron presentaciones del proyecto en:									
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Congreso de la Sociedad Fitopatológica de Chile, XIX, Congreso Latino Americano de Fitopatología y LVII, APS Caribbean Division Meeting, Realizado entre el 2 y 5 octubre 2017.</li> <li>2. LX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, realizado entre el 21 y 22 de noviembre del 2017 en Puerto Varas.</li> <li>3. XIV Reunión Anual de la Sociedad de Ecología de Chile, realizado entre el 22 y 23 de noviembre del 2017 en Puerto Varas</li> </ol>									
<b>Anexo N°16</b> Poster congresos									

N o O E	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programa da	Fecha alcance meta real	% de cum plimi ento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
5	11	Difusión	Manuales de Programa Integrado de Monitoreo y Análisis Calidad e Inocuidad Alimentaria en frutos secos. Folletos de difusión	Cantidad de publicaciones	0	500 manuales de manejo integral + manual versión digital y 1000 folletos de difusión.	30/03/2019	30/06/2019	50	
<p>Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.</p> <p>Chilenut, junto al apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), elaboraron un protocolo sobre micotoxinas e inocuidad alimentaria específica para frutos secos, de tal modo de cumplir con los estándares de calidad equivalentes a los exigidos en Europa y Estados Unidos.</p> <p>El protocolo pretende generar conocimientos e innovaciones científicas y tecnológicas que contribuyan a garantizar la calidad e inocuidad de frutos secos (nueces) producidos en Chile, así como perfeccionar la calidad y oportunidad de la detección e información sobre micotoxinas, hongos toxigénicos, EPT y parámetros ambientales, los que constituyen componentes elementales en la evaluación del riesgo aplicado a la inocuidad alimentaria.</p> <p>Este protocolo fue impreso en 500 unidades y difundido a todos los actores involucrados en la producción de nogal. La versión digital del protocolo quedo alojado en la página web de Chilenut (<a href="http://www.chilenut.cl">www.chilenut.cl</a>)</p> <p>En este proyecto además comprometía la realización de folletos con el protocolo para la detección de micotoxinas en nueces en huertos, plantas de proceso y bodegas de almacenamiento. Pero se decidió no hacer este folleto y enfocar todos los recursos e información en el desarrollo del protocolo.</p>										
<p><b>Anexo N°8</b> Link Descarga Protocolo</p>										

## 6.2 Análisis de brecha.

Cuando corresponda, justificar las discrepancias entre los resultados programados y los obtenidos.

En relación a la publicación en Revista Científica: Los resultados analíticos del proyecto no evidenciaron ningún antecedente que pudiera ser de interés para una publicación científica. Todas las muestras fueron negativas para la contaminación de las micotoxinas del estudio.

## 7. CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO

Especificar los cambios y/o problemas enfrentados durante el desarrollo del proyecto. Se debe considerar aspectos como: conformación del equipo técnico, problemas metodológicos, adaptaciones y/o modificaciones de actividades, cambios de resultados, gestión y administrativos.

Describir cambios y/o problemas	Consecuencias (positivas o negativas), para el cumplimiento del objetivo general y/o específicos	Ajustes realizados al proyecto para abordar los cambios y/o problemas
Recolección de muestras en periodo de lluvias	Mayor probabilidad de desarrollo de hongos productores de toxinas, en consecuencia, mejor oportunidad de la evaluación de riesgo por contaminación.	Ajuste realizado para fundamentar la evaluación del riesgo por contaminación cruzada de micotoxinas.
Se modificó el envío de muestras contemplado en un principio en el plan operativo a enviar al Internacional Centre for Agricultural Bioscience International (CABI, Inglaterra) por el envío de muestras de hongos para su identificación genotóxica al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.	Cabe precisar que los cultivos puros de hongos en medio APD no fueron enviados para su International Centre for Agricultural Bioscience International (CABI, Inglaterra), como se había contemplado originalmente, en consideración a que las metodologías de análisis molecular aplicables para fines de identificación hoy están disponibles en distintos laboratorios de nuestro país y a que, particularmente, el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso ha instalado la metodología de análisis en referencia y adquirido una amplia experiencia en la prestación del servicio analítico, aspectos que son del mayor interés para los fines de	Junto con un costo significativamente menor del servicio contratado a la entidad nacional señalada, la cercanía física de esta institución representa una notable ventaja adicional para el eventual, pronto y expedito envío de muestras y contramuestras potencialmente portadoras de especímenes toxigénicos. Tampoco resultado ajeno a nuestras consideraciones para el manejo de los procedimientos analíticos al interior de nuestro país, la autosuficiencia de nuestras capacidades instaladas localmente, así como los riesgos asociados a una mala interpretación del envío de muestras potencialmente tóxicas, a un país como Inglaterra, el cual se ha convertido en los últimos meses en un blanco potencial de actividades terroristas.

	identificación planteados en nuestro proyecto.	
El cambio en el número de muestras establecidas en la metodología del objetivo número 3.	Decisión que permitió alcanzar observaciones y resultados comparativos que dan un mayor respaldo a un análisis de riesgo basado en dos periodos consecutivos de cosechas.	Se procedió a repartir el total de los lugares de recolección de muestras del año anterior. Se recolectaron muestras del año anterior. Se recolectaron muestras 3 en la V región y 1 en la Región Metropolitana, además de 2 muestras de bodega de centros de producción de nueces (San Esteban y Lo Herrera). Ajuste realizado para obtener resultados comparativos y poder establecer así un análisis de riesgo en dos periodos consecutivos de cosechas.
En plan operativo se planifico la realización de encuestas a productores de nogal durante los meses de junio, julio y agosto del año 2016. Estas encuestas serán realizadas en los meses de junio, julio y agosto del presente año.	Esta modificación no traerá ninguna consecuencia en el desarrollo del proyecto ya que serán realizadas en los eventos de difusión de la asociación programados para este año 2017.	Esta encuesta será realizada en los encuentros regionales de Chilenut programados para los días 27 de junio en la ciudad de Linares (VI región) y 6 de julio en la ciudad de los Andes (V región).
En consideración al desfase entre la disponibilidad de recursos y los periodos de cosecha y, por ende, de recolección de las muestras indicadas en el proyecto original, se postergó la fecha de término del proyecto. Además, en el muestreo no se consideró la toma de muestra en packing que esta descrita en el plan operativo.	La modificación señalada permitirá incluir otros lugares de recolección de muestras. Como ventaja adicional de la modificación señalada se podrá ahora disponer de resultados comparativos que darán una mayor fortaleza al análisis de riesgo basado en las características geográficas y agronómicas de los cultivos del nogal en Chile.	El nuevo muestreo se realizará en 3 etapas de la línea de producción: huerto (árbol), packing y bodega. En campo de cultivo, aleatoriamente se tomarán 25 a 30 árboles. Se analizarán distintas partes del fruto (semilla, cáscara y pelón). Lo señalado permitirá establecer la trazabilidad de la contaminación. El análisis de pelón y cáscaras de la nuez es de importancia en la determinación de posibles puntos críticos de la contaminación con micotoxinas.
Se eliminó la toma de muestras contemplada en la región de Los Ríos, y se aumentó 1 muestra en la	Se modificó la toma de muestras contemplada en los predios de la región del Los Ríos por tener poca superficie cultivada para realizar el muestreo y no tener muestras	En reemplazo de los predios de la región del Los Ríos, se muestreó un predio más de la región del Bio Bio.

región del Biobío.	para packing.	
Dado el retraso en la elaboración del manual y posterior implementación fue necesario extender el proyecto.	Se modificó la fecha del seminario técnico para promover la participación de los interesados.	Se fijó la siguiente fecha para el seminario técnico
Dado el retraso en la elaboración del manual y posterior implementación fue necesario extender el periodo de ejecución del proyecto.	Se modificó la fecha de la actividad de cierre de proyecto.	Se fijó la siguiente fecha para julio de 2019.

## 8. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO

### 8.1 Actividades programadas en el plan operativo y realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.

Durante el desarrollo de este proyecto se realizaron diferentes actividades para lograr culminar exitosamente.

Se colectaron un total de 1438 muestras (pelón, cáscara y semilla) durante los años 2016, 2017 y 2018, en 21 huertos entre la IV a IX región de nuestro país las cuales fueron acondicionadas en el laboratorio de toxicología de la Facultad de Medicina de Universidad de Chile. Paralelamente en el laboratorio se realizó la preparación de medios de cultivo y siembra de hongos, también se realizaron cultivos y aislamiento de hongos, la caracterización morfológica de hongos en muestras de fruto en árbol y almacén.

Se realizó con el montaje del método analítico para la cuantificación de micotoxinas, lo que contempló: curvas de calibración, análisis de recuperabilidad, la determinación de micotoxinas con material fortificado. Se protocolizó el método (procedimientos e instructivos).

Una vez concluidas las pruebas en laboratorio se procedió con el análisis de muestras de frutos secos evaluando el riesgo basado en dos temporadas de recolección de muestras.

Conjuntamente durante los encuentros regionales de Chilenut durante el año 2018 se realizaron quiz a modo de generar un diagnóstico inicial que abarcó pequeños, medianos y grandes productores de nogal.

En la etapa de difusión de información se transmitió vía diversos canales, buscando utilizar siempre el canal más confiable para cada segmento de productores, para ello se seleccionó a personas fuentes de información, invitándolos a los talleres realizados por Chilenut 4 veces al año, durante el año 2018, de manera de capacitarlos respecto a los resultados obtenidos. A estos talleres fueron invitados también todos los productores de nogal.

Como segunda parte de la etapa de difusión se realizó a través de la asistencia a 1 congreso de relevancia de inocuidad de alimentos, así como la publicación de artículos durante el año 2018 en la revista agronómica RED AGRICOLA.

Como tercera etapa de difusión se efectuó una sesión de trabajo de Transferencia de la metodología analítica HPLC durante el mes de junio del 2019 para determinar la contaminación de nueces por AFLAs y OTA, desde la Universidad de Chile a las entidades asociadas del sector productivo público y privado, a fin de fortalecer la inocuidad alimentaria en los diversos puntos de riesgo.

Finalmente se culmina con la creación de un manual del Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria permitirá difundir la información obtenida a todos los actores involucrados en la producción de nogal, y permitirá reforzar y concentrar la información previamente difundida por distintas vías.

## **8.2 Actividades programadas y no realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.**

En un inicio se contempla la publicación en Revista Científica, esta publicación no se realizó debido a que los resultados analíticos del proyecto no evidenciaron ningún antecedente que pudiera ser de interés para una publicación científica. Todas las muestras fueron negativas para la contaminación de las micotoxinas del estudio.

## **8.3 Analizar las brechas entre las actividades programadas y realizadas durante el período de ejecución del proyecto.**

No se evidenció ningún antecedente que pudiera ser de interés para una publicación científica

# **9. POTENCIAL IMPACTO**

## **9.1 Resultados intermedios y finales del proyecto.**

Descripción y cuantificación de los resultados obtenidos al final del proyecto, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias; ventas y/o anuales (\$), nivel de empleo anual (JH), número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios; nuevos empleos generados por efecto del proyecto, nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas.

Este proyecto logro generar conocimientos e innovaciones científicas y tecnológicas respecto de la biodiversidad de los hongos toxigénicos, determinación de puntos de riesgos de contaminación con micotoxinas en la línea productiva de frutales de nuez, implementación de una metodología analítica para detectar y cuantificar micotoxinas, y el desarrollo de un programa integrado de monitoreo y análisis para la calidad e inocuidad alimentaria (PRIMACIA), con el fin de contribuir a garantizar la calidad e inocuidad de frutos secos (nueces) producidos en Chile, así como perfeccionar la calidad y oportunidad de la detección e información sobre micotoxinas, hongos toxigénicos, EPT y parámetros ambientales, los que constituyen componentes elementales en la evaluación del riesgo aplicado a la inocuidad alimentaria.

En base a lo anterior nuestros asociados tanto productores como procesadores y exportadores, manifestaron la importancia de poder contar con este manual en nuestra industria ya que el día de hoy la producción de nueces alcanza las 130 mil toneladas producidas en una extensión de 47 mil hectáreas desde la IV a la IX región de Chile.

## 10. CAMBIOS EN EL ENTORNO

Indique si existieron cambios en el entorno que afectaron la ejecución del proyecto en los ámbitos tecnológico, de mercado, normativo y otros, y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

Dada la posibilidad de la extensión del cultivo de nogales hacia zonas más lluviosas y húmedas y a los efectos del cambio climático, que podrían favorecer el desarrollo de hongos productores de micotoxinas en las semillas de nueces, se decidió ampliar la prospección de inóculo potencial de hongos productores de micotoxinas entre las regiones de Coquimbo y La Araucanía

## 11. DIFUSIÓN

Describe las actividades de difusión realizadas durante la ejecución del proyecto. Considere como anexos el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares.

	Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Documentación Generada
1	Marzo 2016	Revista de Chilenut	Difusión	2.000	Artículo técnico
2	15/11/2016	Viña Sta. Rita, Buin	Charla Seminario de Chilenut	123	Charla en página web <a href="http://www.chilenut.cl">www.chilenut.cl</a>
3	Enero 2016	News Letter INFONUT	Publicación digital	2.200	Publicación digital en página web de Chilenut <a href="http://www.chilenut.cl">www.chilenut.cl</a>
4	2 al 5 octubre 2017	Chillan, Chile	Congreso de la sociedad Fitopatológica de Chile, XIX, Congreso Latino Americano	250	Poster
5	21 al 22 noviembre 2017	Puerto Varas, Chile	LX Reunión Anual de la Sociedad de Ecología de Chile	150	Poster
6	22 al 23 noviembre 2017	Puerto Varas, Chile	XIVX Reunión Anual de la Sociedad de Ecología de Chile	80	Poster
7	Abril 2018	Revista Red Agrícola	Entrevista a Equipo técnico, Coordinador Gral. De proyecto y representante de FIA	10.000	Revista impresa y digital
8	9 julio 2019	Hotel Atton El Bosque, Las Condes	Seminario de cierre de proyecto	21	PROTOCOLO DE BUENAS PRACYICAS DE MANUFACTURACION EN LA PRODUCCION DE NEUCES EN CENTROS NACIONALES
Total, participantes				<b>14.824</b>	

## 12. PRODUCTORES PARTICIPANTES

Complete los siguientes cuadros con la información de los productores participantes del proyecto.

### 12.1 Antecedentes globales de participación de productores

Debe indicar el número de productores para cada Región de ejecución del proyecto.

Región	Tipo productor	N° de mujeres	N° de hombres	Etnia (Si corresponde, indicar el N° de productores por etnia)	Totales
	Productores pequeños	No Aplica			
	Productores medianos-grandes				
	Productores pequeños				
	Productores medianos-grandes				
	<b>Totales</b>				

### 12.2 Antecedentes específicos de participación de productores

Nombre	Ubicación Predio			Superficie Há.	Fecha ingreso al proyecto
	Región	Comuna	Dirección Postal		
			No Aplica		

## CONSIDERACIONES GENERALES

### 13.1 ¿Considera que los resultados obtenidos permitieron alcanzar el objetivo general del proyecto?

Si, por cuanto frente a la inexistencia en Chile de un sistema de evaluación del riesgo toxicológico que proporcione un alto nivel de garantías sobre la seguridad de los productos agrícolas y que permita reforzar la protección de la salud pública y el manejo de la producción de la agricultura nacional, hoy la industria de frutos puede contar con un proceso preventivo para garantizar la inocuidad toxicológica.

El presente Proyecto permitió la generación de conocimientos e innovaciones científicas y tecnológicas que contribuyen a garantizar la calidad e inocuidad de nueces producidas en Chile, así como a perfeccionar la calidad y oportunidad de la detección e información sobre micotoxinas y hongos toxigénicos ambientales, los que constituyen componentes elementales en la evaluación del riesgo aplicado a la inocuidad alimentaria.

Se espera que en futuro el Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA), pase a constituir la base de la alerta temprana in situ de focos tóxicos y contaminantes que, junto con asegurar la calidad e inocuidad alimentaria, respalde la gestión productiva de las empresas asociadas al rubro frutos secos (nueces).

### 13.2 ¿Cómo fue el funcionamiento del equipo técnico del proyecto y la relación con los asociados, si los hubiere?

A lo largo de este proyecto se evidencio una difícil coordinación entre las partes, debido principalmente a que los tiempos de rendiciones y ejecución de la entidad asociada son muy distintos y mucho más prolongados que los de Chilenuit (que cuenta con una larga experiencia en la ejecución de proyectos con entidades como FIA). Pero sim embargo, a medida avanzaba la ejecución del proyecto se fueron manejando mejor los tiempos de rendición y de ejecución.

### 13.3 A su juicio, ¿Cuál fue la innovación más importante alcanzada por el proyecto?

La creación de un manual del Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria que permite difundir la información sobre normativas internacionales de inocuidad alimentaria a todos los actores involucrados en la producción de nogal, a fin de lograr una ventaja competitiva en los mercados internacionales y adelantarse a la entrada en vigencia de normativas internacionales de control de micotoxinas y hongos micotóxicos, contando así con estándares sanitarios de contaminantes o parámetros relevantes que contribuyan a prevenir la contaminación.

### 13.4 Mencione otros aspectos que considere relevante informar, (si los hubiere).

En este informe Final después queremos agradecer el constante apoyo de nuestra contraparte FIA.

### 13. CONCLUSIONES

Realice un análisis global de las principales conclusiones obtenidas luego de la ejecución del proyecto.

La identificación de los hongos que contaminan las nueces y su potencial toxicidad y la determinación de los puntos de riesgos de la contaminación en la cadena productiva permite contar con una industria informada y capacitada respecto a la inocuidad de alimentos y al manejo de las micotoxinas que se pudiesen cultivar y detectar las nueces.

Asimismo, el diseño y aplicación de un programa integrado de calidad e inocuidad alimentaria PRIMACIA, focalizado específicamente en garantizar la sanidad de la nuez aportará beneficios productivos, económicos y comerciales que se generarían al contar con una certificación de alimento libre de micotoxinas que agregará valor a las nueces chilenas sobre todo en mercados como Europa quienes exigen estas certificaciones y donde se exportan más del 30% del volumen nacional.

**Finalmente podemos decir que este proyecto** tuvo como principal propósito, metas en investigación básica aplicada, capacitación en procedimientos y métodos analíticos, Sistemas de Gestión, HACCP, BPA y capacidades de servicios analíticos a Empresas asociadas, para cubrir exigencias en el cumplimiento de normativas y análisis de residuos de impacto alimentario exigidos por la Comunidad Internacional ***dio origen a un paquete tecnológico que no existía en la actualidad*** en la industria de nueces en Chile.

### 14. RECOMENDACIONES

Señale si tiene sugerencias en relación a lo trabajado durante el proyecto (considere aspectos técnicos, financieros, administrativos u otro).

## **15. ANEXOS**

**Anexo N.º1** Determinación de la presencia de *Penicillium* sp., y *Aspergillum* sp., en nogal.

**Anexo N.º2.** Identificación genotípica

**Anexo N.º3 A** Stress Químico

**Anexo N.º3 B** Stress de Tiempo

**Anexo N.º4 A:** Protocolo de determinación de aflatoxinas en muestras de nueces.

**Anexo N.º4 B:** Protocolo de determinación de Ocratoxina A en muestras de nueces.

**Anexo N.º5 A** Muestras Chicolco 2016

**Anexo N.º5 B** Muestras Chicolco 2017

**Anexo N.º5 C** Muestras Lo Herrera 2016

**Anexo N.º5 D** Muestras Lo Herrera 2017

**Anexo N.º5 E** Muestras San Esteban 2017

**Anexo N.º5 F** AM1 RL1

**Anexo N.º6** Grafico numero de muestras analizadas periodo 2018

**Anexo N.º7** Protocolo de determinación de Manufacturación en la Producción de Nueces en Centros de Producción Nacional.

**Anexo N.º8** Link descarga Protocolo

**Anexo N.º9** Implementación del programa

**Anexo N.º10** Informe visitas a empresas

**Anexo N.º11** Resultados diagnostico a productores

**Anexo N.º12** Quiz productores

**Anexo N.º13** Resultados encuesta FIA 0064 Regionales

**Anexo N.º14** Presentación AM Lopez Linares 2018

**Anexo N.º15** Para detectar micotoxinas en nueces Red Agrícola

**Anexo N.º16** Posters congreso



## ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE *Penicillium* sp. Y *Aspergillus* sp. EN NOGAL

**INVESTIGADOR:** Jaime R. Montealegre A.

Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de Enfermedades, Departamento de Sanidad Vegetal  
Facultad de Cs. Agronómicas, Universidad de Chile

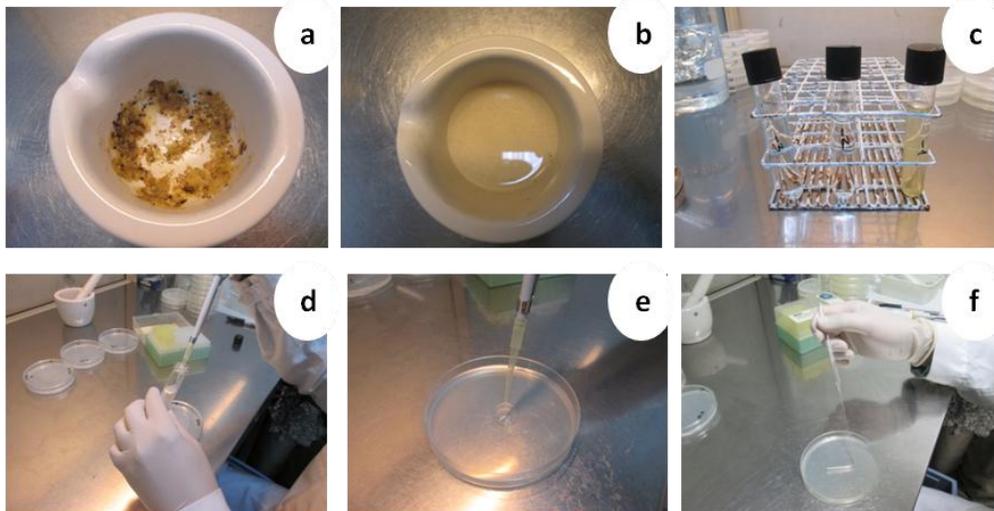
### OBJETIVO

Determinar la presencia de hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus* en muestras de diferentes estructuras de Nogal: hojas, pelón (mesocarpio), cáscara (endocarpio) y semilla.

### MATERIALES Y MÉTODO

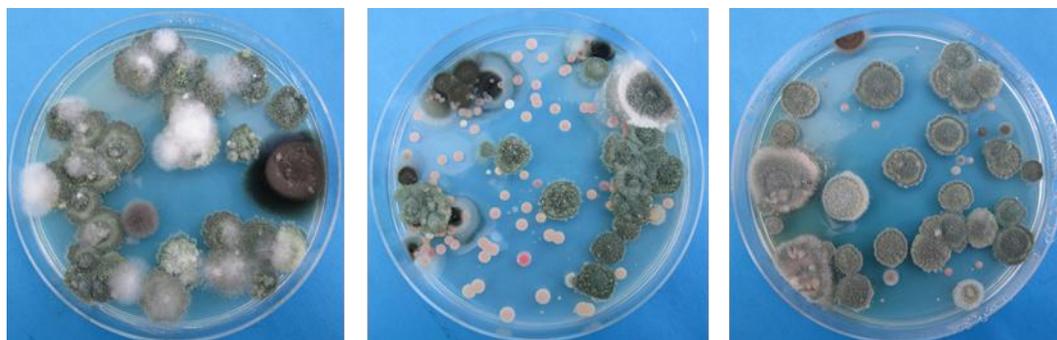
El material desde donde se obtuvieron las muestras (Véase Cuadro 1) y la nomenclatura respectiva utilizada, fue proporcionado por el Laboratorio de Toxicología del Dr. Américo López-Rivera, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se tomaron muestras homogéneas; 2,5 g. de tejido para hoja y 5 g. para pelón, cáscara y semillas. Estas fueron trituradas en morteros de porcelana, con 50 ml. de agua destilada estéril para conformar una suspensión. Luego se realizaron diluciones seriadas, incorporando 1 ml. de la suspensión a un tubo de ensayo con 9 ml. de agua destilada estéril. Posteriormente y previa agitación, se tomó 100  $\mu$ l de cada dilución y se sembró en placas Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD) modificado (incorporación de 0,1 g. de cloranfenicol por litro de medio). Luego se incubaron durante 10 días a 25 °C.



**Figura 1:** Etapas del procesamiento de muestras. **a:** Trituración de la muestra. **b:** Suspensión. **c:** Diluciones seriadas. **d y e:** Incorporación de 100  $\mu$ l al centro de la placa. **f:** Siembra en céspe en medio APD + cloranfenicol.

La evaluación consistió en realizar un conteo de UFC de hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* en cada placa (Figura 2). Los resultados se expresaron en Nº de UFC/g de tejido de la estructura respectiva analizada.



**Figura 2:** UFC desarrollándose en placas Petri con APD + cloranfenicol.

## RESULTADOS

Los resultados se observan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** UFC de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.\* de muestras de diferentes estructuras de Nogal.

Muestra y rotulación	Fecha muestreo	Sector	Estructura procesada	UFC/g de muestra
H.A.1	01/06/2016	Lo Herrera	Hojas	Sin UFC
H.A.2	01/06/2016	Lo Herrera	Hojas	Sin UFC
H.A.1	31/05/2016	Chincolco	Hojas	$2,68 \times 10^3$
			Cáscara	$4,43 \times 10^5$
H.A.2	31/05/2016	Chincolco	Semilla	$1,16 \times 10^5$
			Hojas	$2,52 \times 10^3$
H.A.3	31/05/2016	Chincolco	Pelón	$3,58 \times 10^7$
			Hojas	Sin UFC
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	$3,19 \times 10^6$
			Semilla	$9,35 \times 10^4$
(N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	$7,43 \times 10^5$
			Semilla	$5,50 \times 10^4$
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	$5,50 \times 10^5$
			Semilla	$4,40 \times 10^4$
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	$7,15 \times 10^5$
			Semilla	$4,77 \times 10^4$

(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	$2,20 \times 10^5$
			Semilla	$6,05 \times 10^4$
NA-Compuesto (A1,A2)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	$1,93 \times 10^4$
			Semilla	$5,50 \times 10^2$
NA-Compuesto (A3,A4, A5)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	$8,25 \times 10^3$
			Semilla	$1,83 \times 10^2$
			Pelón	$6,83 \times 10^6$
NB-Compuesto (B1,B2,B3)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	$4,40 \times 10^4$
			Semilla	$1,82 \times 10^3$
Pelón	31/05/2016	Chincolco	Pelón	$3,26 \times 10^7$
NA-Compuesto (A1,A2)	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	$1,47 \times 10^5$
			Semilla	$8,25 \times 10^2$
			Pelón	$6,30 \times 10^6$
NA-Compuesto (A3,A4)	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	$1,10 \times 10^5$
			Semilla	$5,78 \times 10^2$
			Pelón	$2,63 \times 10^6$
Hojas Árbol	09/06/2016	San Esteban	Hojas	$1,05 \times 10^4$
Nuez pulpa *	09/06/2016	San Esteban	Semilla	$1,43 \times 10^3$
Árbol (Bolsa 1y2)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$3,26 \times 10^6$
			Semilla	$2,34 \times 10^5$
			Pelón	$2,57 \times 10^7$
Suelo (Bolsa 1,2y3)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$6,60 \times 10^5$
			Semilla	$5,31 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$1,84 \times 10^3$
			Semilla	$1,10 \times 10^3$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$2,57 \times 10^2$
			Semilla	$2,75 \times 10^1$
Pelón molido	09/06/2016	San Esteban	Pelón	$3,03 \times 10^6$

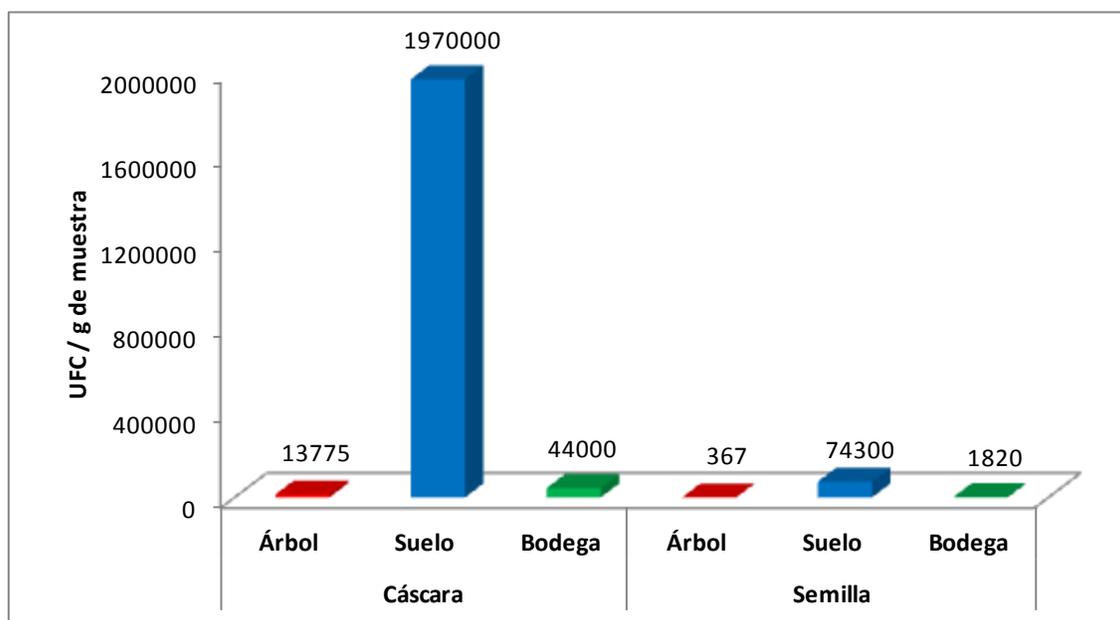
\* Solo en la semilla de la muestra "Nuez pulpa" se desarrolló *Aspergillus* sp. con  $5,50 \times 10^1$  de UFC/g de muestra.

Se realizó un análisis más detallado de los datos por **sector** (Véase Cuadros 2, 3 y 5 y Figuras 3, 4 y 5), en donde se agruparon las estructuras (cáscara y semilla) proveniente de árbol, suelo y bodega, obteniendo los siguientes resultados:

- Chicolco

**Cuadro 2.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega, sector Chicolco.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
NA-Compuesto (A1,A2)	Cáscara	Árbol	$1,38 \times 10^4$
NA-Compuesto (A3,A4, A5)		Suelo	$1,97 \times 10^6$
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta (N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta		Bodega	$4,40 \times 10^4$
NA-Compuesto (A1,A2)	Semilla	Árbol	$3,67 \times 10^2$
NA-Compuesto (A3,A4, A5)		Suelo	$7,43 \times 10^4$
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta (N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta		Bodega	$1,82 \times 10^3$



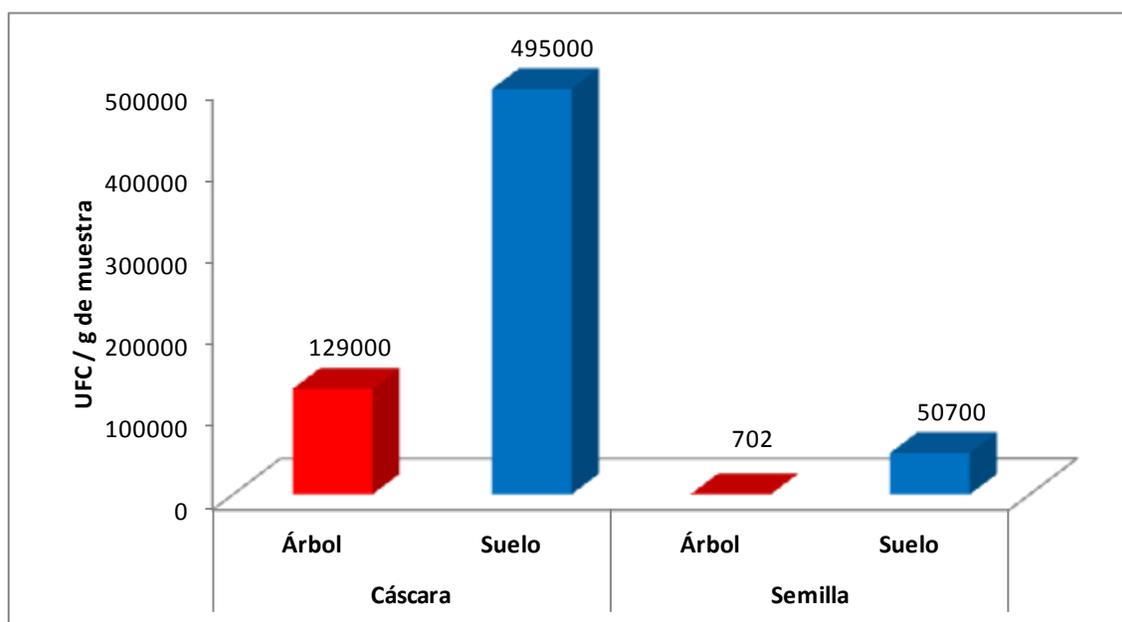
**Figura 3:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. agrupadas por muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega (sector Chicolco).

Las muestras de cáscara provenientes del suelo presentan la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla, la cantidad de UFC de la primera estructura es mayor que la segunda en todas las procedencias. Tanto en las muestras de cáscara y semilla provenientes de bodega, las UFC son mayores que las que provienen desde los árboles.

- Lo Herrera

**Cuadro 3.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol y suelo, sector Lo Herrera.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
NA-Compuesto (A1,A2)	Cáscara	Árbol	1,29 x 10 <sup>5</sup>
NA-Compuesto (A3,A4)			
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta		Suelo	4,95 x 10 <sup>5</sup>
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta			
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta			
NA-Compuesto (A1,A2)	Semilla	Árbol	7,02 x 10 <sup>2</sup>
NA-Compuesto (A3,A4)			
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta		Suelo	5,07 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta			
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta			



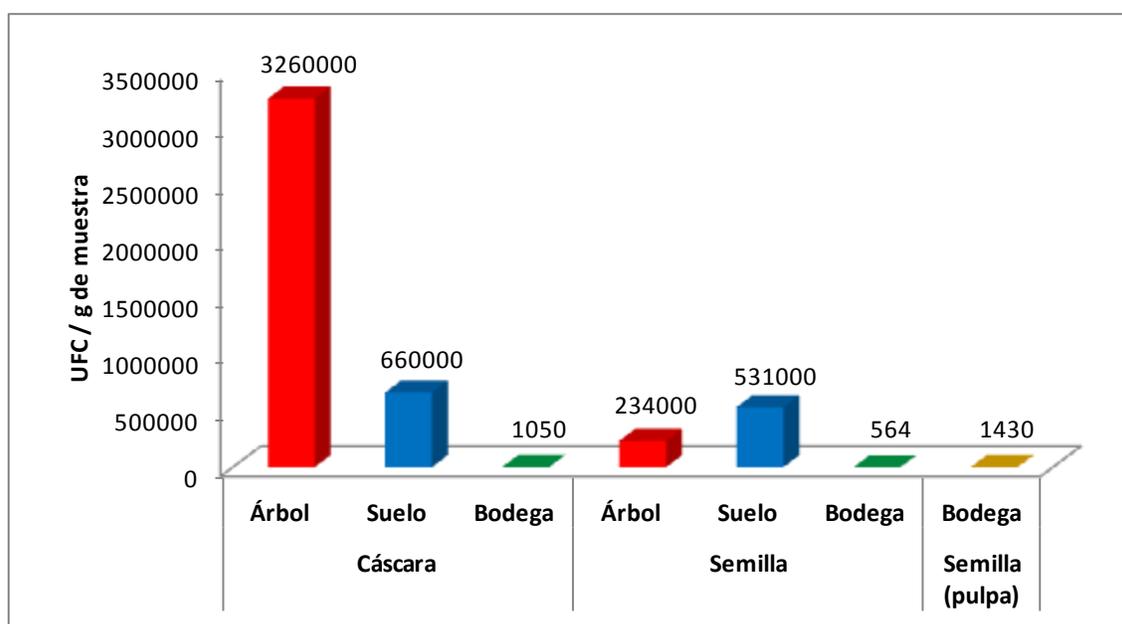
**Figura 4:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. agrupadas por muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol y suelo (sector Lo Herrera).

Las muestras de cáscara provenientes del suelo del sector Lo Herrera, al igual que las del sector Chincolco, presentan la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla de las dos procedencias, la cantidad de UFC en la primera estructura es mayor que en la segunda.

- **San Esteban**

**Cuadro 4.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega, sector San Esteban.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
Arbol (Bolsa 1y2)	Cáscara	Árbol	$3,26 \times 10^6$
Suelo (Bolsa 1,2y3)		Suelo	$6,60 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)		Bodega	$1,05 \times 10^3$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)	Semilla	Árbol	$2,34 \times 10^5$
Suelo (Bolsa 1,2y3)		Suelo	$5,31 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)		Bodega	$5,64 \times 10^2$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)		Bodega	$1,43 \times 10^3$
Nuez pulpa	Semilla (pulpa)	Bodega	$1,43 \times 10^3$



**Figura 5:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. agrupadas por muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega (sector San Esteban).

En el sector San Esteban se contó con una muestra de Semilla (pulpa), es decir, semilla sin cáscara, la cual provino directamente de una muestra de bodega y no del fruto (cáscara + semilla) como en todas las otras muestras de semilla, de este y de los diferentes sectores (Chincolco y Lo Herrera).

Las muestras de cáscara provenientes de los árboles presentaron la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla de todas las procedencias, al igual que en los sectores Chincolco y Lo Herrera, la cantidad de UFC de las

muestras de cáscara es mayor que en las de semilla. A diferencia del sector Chicolco, tanto en las muestras de cáscara y semilla provenientes de bodega, las UFC son menores que las que provienen desde los árboles.

Si se observan las muestras de semilla “con cáscara” y las de semilla “sin cáscara”, ambas obtenidas de bodega, la cantidad de UFC es mayor en las semillas “sin cáscara” que en las que la poseen.

### **CONCLUSIONES**

1. La cantidad de UFC de las muestras de cáscara es mayor que en las semillas en todas las aquellas de la misma procedencia y sector.
2. Se observó en general una mayor cantidad de UFC / g de muestra en estructuras (cáscara y semilla) de frutos provenientes del suelo que de los árboles (a excepción del sector San Esteban).
3. Solo se determinó presencia de *Aspergillus* sp. en una muestra de semilla (Nuez pulpa) del sector San Esteban.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
**DE VALPARAISO**

Facultad de Agronomía  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO  
ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López Rivera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

ANÁLISIS MOLECULAR :

Aislado	Resultado*	% ID
01	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	100

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
**DE VALPARAISO**

Facultad de Agronomía  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO  
ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López Rivera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

ANÁLISIS MOLECULAR

Aislado	Resultado*	% ID
02	<i>Penicillium expansum</i>	99

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAIN-C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
DE VALPARAISO

Facultad de Agronomía  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO  
ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López rivera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

ANÁLISIS MOLECULAR

Aislado	Resultado*	% ID
03	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAIN G.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO

Facultad de Agronomía  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO  
ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López rivera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

ANÁLISIS MOLECULAR

Aislado	Resultado*	% ID
04	<i>Penicillium brevicompactum</i>	100

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
**DE VALPARAISO**

Facultad de Agronomía  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**  
**ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López rivera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

ANÁLISIS MOLECULAR

Aislado	Resultado*	% ID
05	<i>Penicillium echinulatum</i>	100

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAINC.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO

Facultad de Agronomía  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO  
ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López rivera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

ANÁLISIS MOLECULAR

Aislado	Resultado*	% ID
06	<i>Penicillium sp.</i>	99

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
**DE VALPARAISO**

**Facultad de Agronomía**  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**  
**ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López rívera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

Aislado	Resultado*	% ID
07	<i>Penicillium buchwaldii</i>	100

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO

Facultad de Agronomía  
Escuela de Agronomía  
www.agronomia.ucv.cl

**DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO  
ANÁLISIS MOLECULAR**

SOLICITA : Americo López rivera  
DIRECCIÓN :  
LOCALIDAD : Santiago  
N° REGISTRO : 196  
FECHA DE ANÁLISIS : 31 Marzo de 2017  
MUESTRA : Colonia fungosa en tubo con agar inclinado.  
IDENTIFICACIÓN CON PCR : La presencia de bandas en electroforesis indica la amplificación de regiones específicas de DNA, las que fueron secuenciadas y confirmadas con un índice de identidad sobre un 97% con la base de datos internacional GenBank.

ANÁLISIS MOLECULAR

Aislado	Resultado*	% ID
08	<i>Aspergillus tubingensis</i>	99

\*Secuencia ITS según metodología de White et al., 1990

OBSERVACIONES : S/O

**Dra. XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

**NOTA:** El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo.

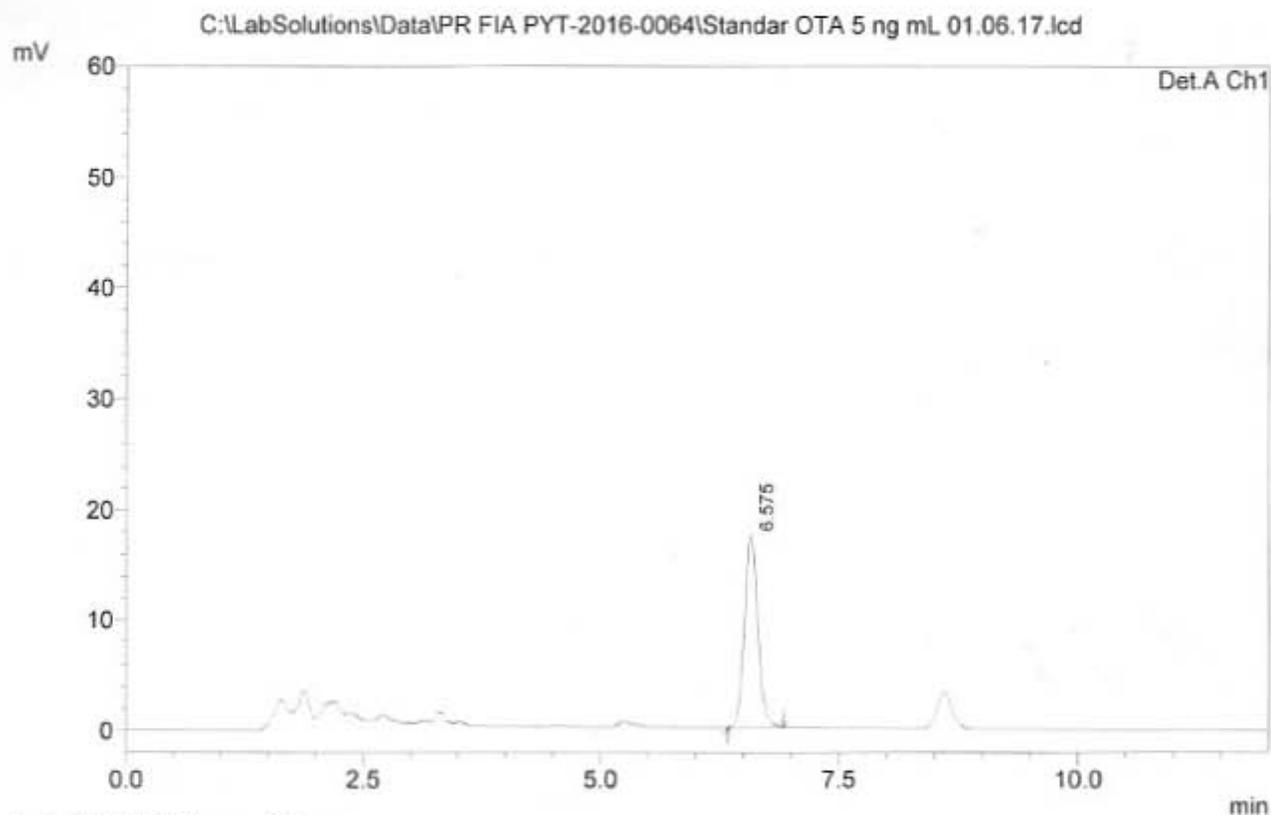


**Universidad de Chile**  
**Facultad de Medicina**  
**Laboratorio de Toxicología**

Sample Information

Acquired by : Américo López-Rivera  
 Sample Name : OTA Nuez  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data Filename : Standar OTA 5 ng mL 01.06.17.lcd  
 Date Acquired : 01/06/2017  
 Method : OTAm 2 wine.lcm

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/333nm - 460nm

PeakTable

Detector A Ch1 333nm - 460nm

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 5% Height	Conc.
OTA	6.575	169633	17366	0.336	0.523
		169633	17366		

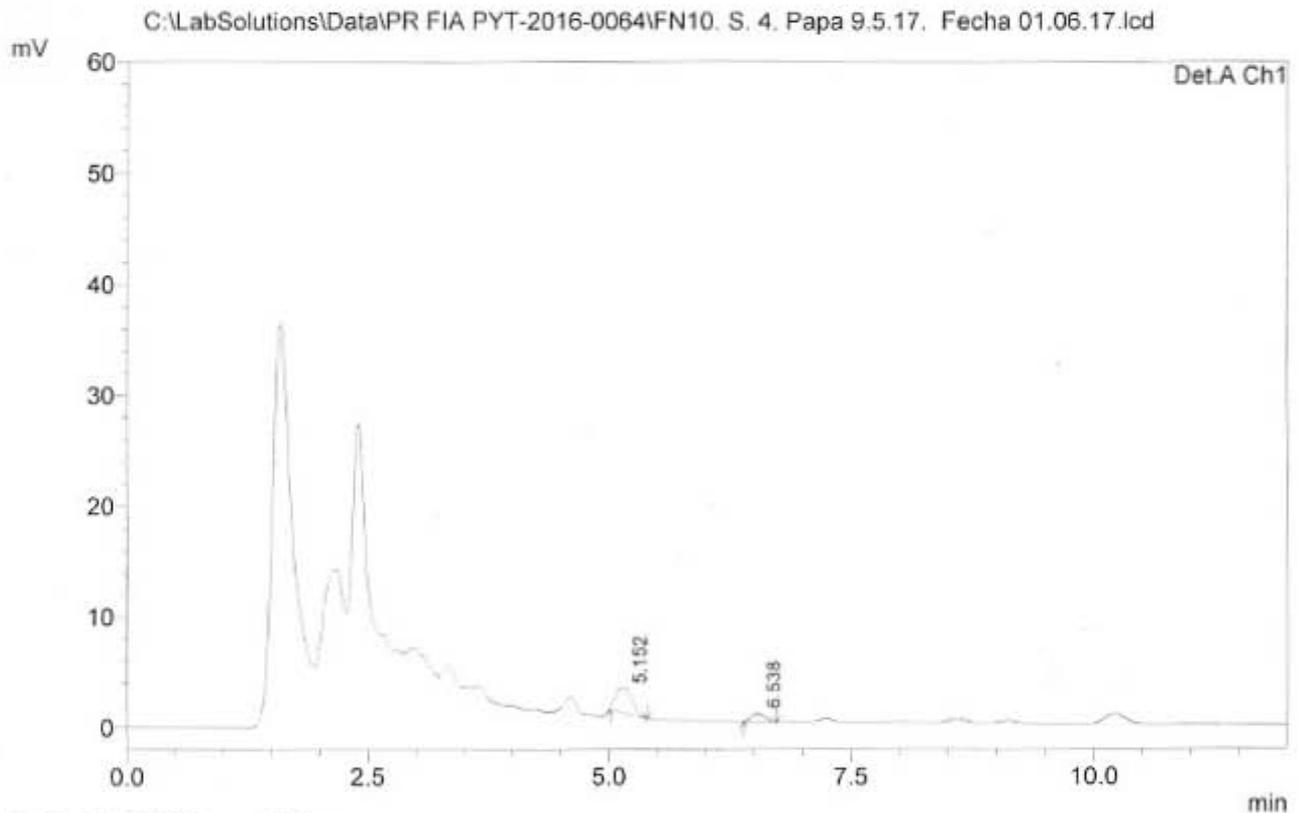


**Universidad de Chile**  
**Facultad de Medicina**  
**Laboratorio de Toxicología**

Sample Information

Acquired by : Américo López-Rivera  
 Sample Name : OTA Nuez  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data Filename : FN10. S. 4. Papa 9.5.17. Fecha 01.06.17.lcd  
 Date Acquired : 01/06/2017  
 Method : OTAm 2 wine.lcm

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 333nm - 460nm

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 5% Height	Conc.
	5.152	26542	2159	0.327	0.000
OTA	6.538	6616	721	0.295	0.063
		33158	2881		

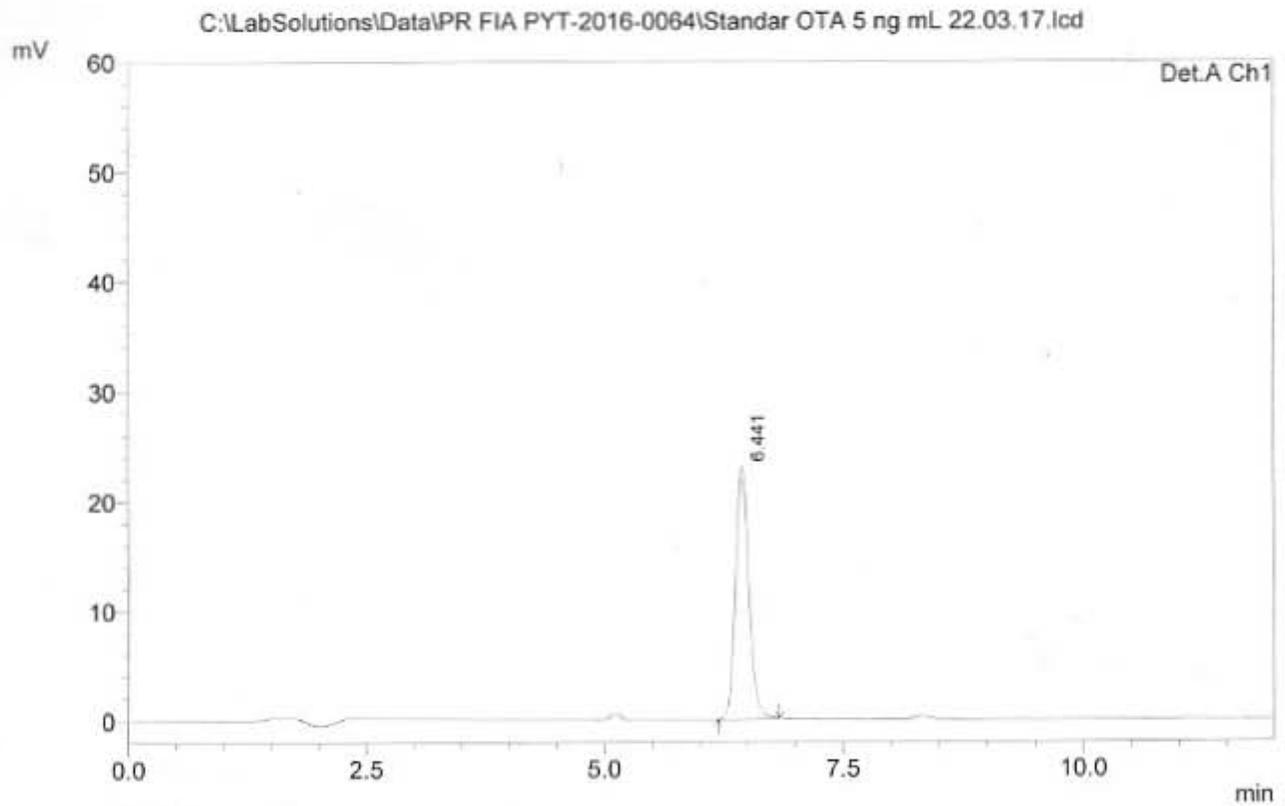


**Universidad de Chile**  
**Facultad de Medicina**  
**Laboratorio de Toxicología**

Sample Information

Acquired by : Américo López-Rivera  
 Sample Name : OTA Nuez  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data Filename : Standar OTA 5 ng mL 22.03.17.lcd  
 Date Acquired : 22/03/2017  
 Method : OTAm 2 wine.lcm

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/333nm - 460nm

PeakTable

Detector A Ch1 333nm - 460nm

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 5% Height	Conc.
OTA	6.441	222673	23025	0.333	0.672
		222673	23025		

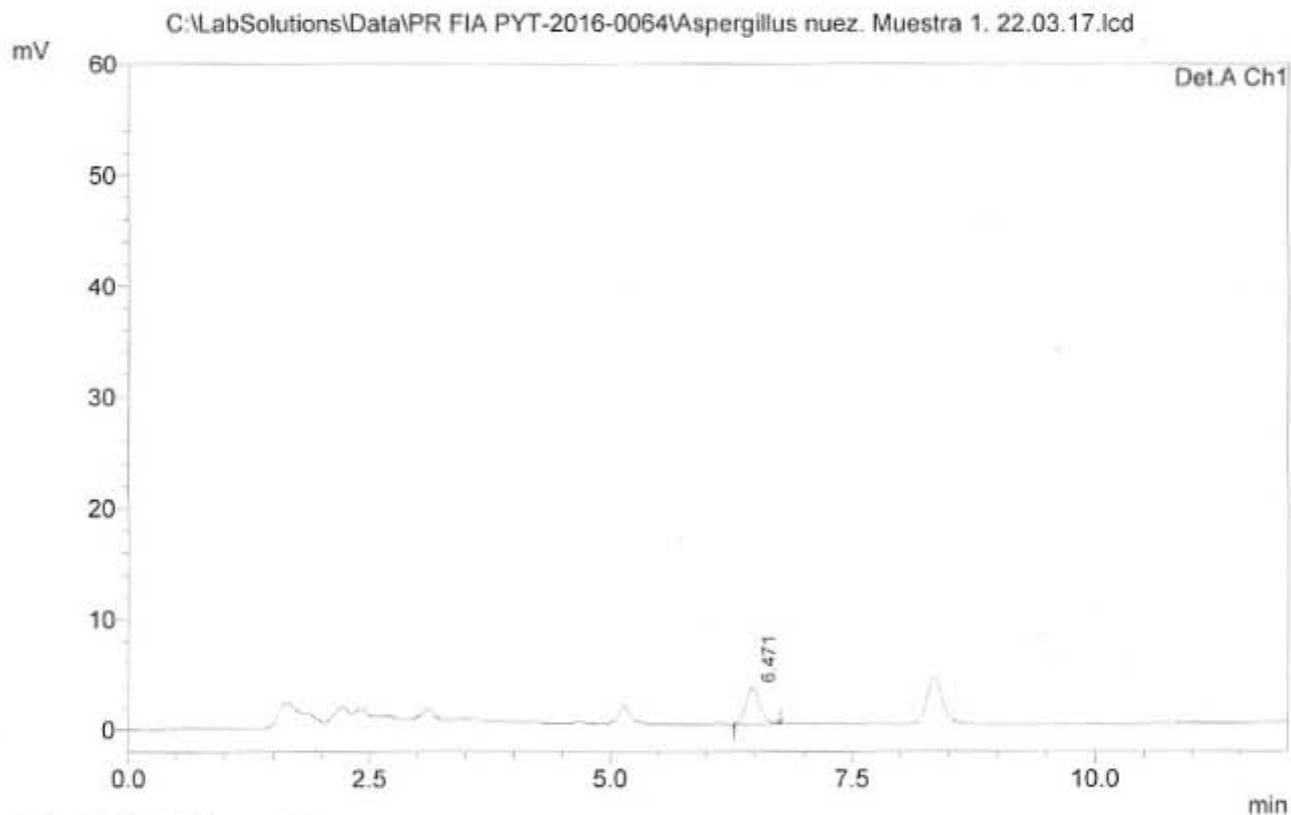


**Universidad de Chile**  
**Facultad de Medicina**  
**Laboratorio de Toxicología**

Sample Information

Acquired by : Américo López-Rivera  
 Sample Name : OTA Nuez  
 Injection Volume : 100 µL  
 Data Filename : Aspergillus nuez. Muestra 1. 22.03.17.lcd  
 Date Acquired : 22/03/2017  
 Method : OTAm 2 wine.lcm

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 333nm - 460nm

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 5% Height	Conc.
OTA	6.471	32114	3277	0.333	0.135
		32114	3277		

## ANEXO 4 A: Protocolo de determinación de aflatoxinas en muestras de nueces.

 <p>Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología</p>	<b>PROTOKOLO DE DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE NUECES</b>	<b>COPIA N° 1 01/09/16</b>
	Américo López Rivera <sup>a</sup> Andrea Mella Torres <sup>b</sup> y Pablo Yañez Soto <sup>c</sup>	
	<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>b</sup> Analista: Bioquímico <sup>c</sup> Analista: Químico farmacéutico	

### 1. OBJETIVO.

Describir el protocolo de Análisis de Determinación y Cuantificación de Aflatoxinas (AFLAs) en muestras de nueces, detallando en forma clara y precisa los ítems de: instrumentación, uso de columna de inmutofinidad y extracción, dilución del estándar, condiciones cromatográficas (HPLC/FL), inyección de la muestra y reactivos, de modo que el analista obtenga la información necesaria para la correcta aplicación de este protocolo.

### 2. ALCANCE.

Este procedimiento es aplicable a todas las determinaciones de AFLAs en muestras de nueces, mediante el uso de columnas de inmutofinidad y del método HPLC/FL, desarrollado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (LABTOX).

### 3. RESPONSABILIDAD.

#### Prof. Director de Laboratorio:

- Gestionar los recursos para la adquisición de los estándares, equipamientos, materiales y reactivos utilizados en el procedimiento de Determinación y Cuantificación de AFLAs en nueces.
- Revisar y aprobar el protocolo de Determinación y Cuantificación de AFLAs en nueces.

#### Analistas del Proyecto:

- Desarrollar y proponer un protocolo de determinación de AFLAs en nueces.
- Aplicar el protocolo al análisis de muestras de nueces de acuerdo a lo establecido.
- Verificar que los resultados de los análisis, se encuentren dentro del rango de aceptabilidad.
- Participar en la evaluación de los resultados obtenidos.
- Registrar los resultados y la información obtenida.

### 3. DISTRIBUCIÓN.

Profesor Américo López Rivera, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

### 5. EQUIPOS Y REACTIVOS.

#### 5.1. Equipamiento

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento equipado con: Muestreador automático (Prominence SIL-20 AC), bomba cuaternaria (DGU-20A 5R), Detector de Fluorescencia (Shimadzu RF-10 AXL).
- Baño de Ultrasonido Branson, Ultrasonic Cleaner 2510.
- Vortex Thermolyne Maximix II.
- Desionizador Barnstead Nanopure Infinity.
- Micropipetas Gilson, 100-1000  $\mu$ L.
- Columnas de extracción CIA (Columnas de Inmunoafinidad) de 3 mL, S&B Analítica Immunoaffinity Columns.
- Columna analítica marca Phenomenex SYNERGY 4 $\mu$  MAX-RP 80<sup>a</sup>; 250 x 4.60 mm.
- Balanza de precisión 0.01 g. Boeco.
- Balanza de 600 g. Scout.
- Baño termostático 60  $\pm$  2 °C. Kotterman.
- Centrifuga para tubos de 50 mL capaz de alcanzar 6000 rpm. Thermo Electron Corporation.
- Evaporador de N<sub>2</sub> Thermo Scientific. Reacti-Therm III # TS-18823
- pH metro. VENN, PHS-25.
- Viales de 4 mL, ámbar.
- Pipetas volumétricas de 1-5 y 10 mL.
- Viales ámbar de 2 mL para autosampler.
- Tubos de centrifuga de 50 mL.
- Material usual de laboratorio.

#### 5.2. Reactivos.

- Acetonitrilo grado HPLC.
- Metanol grado HPLC.
- Agua desionizada.
- Nitrogeno, gas inerte.

##### 5.2.1 Soluciones.

- **Solución madre de AFLAs B1, B2, G1 y G2:** 200  $\mu$ g/mL en benceno/acetonitrilo (99/1; v/v).
- **Solución de trabajo mix de AFLAs:** 50 ng/mL para B1, B2, G1, G2, preparada a partir de la solución madre y diluidas en solución acetonitrilo/ agua (90/10; v/v).
- **Solución acondicionadora de columna PBS (Solución Buffer de fosfato salino):** Disolver 8 g de NaCl, 1, 16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,2 g de KCl en 1 litro de agua. Ajustar pH a 7.4.
- **Solución de lavado Tween 20-PBS:** Agregar 100  $\mu$ L de Tween 20 a 1 litro de PBS (0,1/ 1000; v/v).
- **Solución de extracción Tween 20-PBS:** Agregar 20 g de Tween 20 en 1 litro de PBS (20/1000; p/v).
- **Solución derivatizante:** Tomar 2 mL de ácido trifluoroacético, 1 mL ácido acético glacial, 7 mL de agua desionizada.

## 5.2.2 Estándares

1 mg de mix de aflatoxina (B1, B2, G1 y G2) obtenidas de *Aspergillus flavus*, mayor igual a 98%.

## 6. FUNDAMENTO.

El método está basado en extracción de Aflatoxinas (AFLAs) desde nueces, con la solución de extracción (Tween 20-PBS) y separación del analito mediante el uso de columnas de inmunoafinidad para su posterior análisis por técnica HPLC con detección por fluorescencia.

El cálculo de la concentración de la toxina, se determina mediante el uso de una curva de calibración realizada con matrices fortificadas con mix de AFLAs.

## 7. DEFINICIONES.

Para los efectos de esta directriz se define como:

**Aflatoxinas (AFLAs):** Son potentes toxinas carcinogénicas metabolizadas por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. La toxina se forma cuando estos hongos invaden una serie de productos alimenticios, entre los que se incluyen las nueces.

**Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento o High Performance Liquid Chromatography (HPLC):** Es un tipo de cromatografía en columna. Es el método analítico de separación más versátil y más utilizado de los métodos cromatográficos debido a su alta sensibilidad, especificidad y al gran campo de aplicación.

**Tiempo de retención (TR):** Es el tiempo que transcurre inmediatamente después de la inyección de la muestra hasta que el pico cromatográfico del analito alcanza su máximo.

**Columna de Inmunoafinidad:** Columna de extracción o de limpieza (*clean up*) que retiene el analito específicamente, basado en el principio de la afinidad antígeno-anticuerpo.

**Nueces Fortificadas:** Muestra de nueces a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito de interés.

## 8. ACTIVIDAD.

El control de calidad de este método analítico HPLC para AFLAs se verifica de acuerdo al Protocolo de Aseguramiento de la Calidad de los Resultados (Anexo N°3).

### 8.1 Curvas de calibración

Construcción de una curva de calibración con matriz (nuez) fortificada con AFLAs.

#### 8.1.1 Curva de calibración de nueces y almendras fortificadas

Para la cuantificación se construye una curva de calibración de nueces fortificadas con AFLAs. Se utilizan 5 puntos de concentración (1,5-10 ng/g). Cada punto es inyectado 3 veces. Se obtienen en ambos casos curvas promedios.

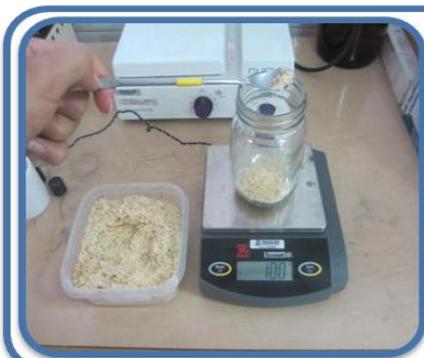
## 8.2 Muestras

### 8.2.1 Recolección y Toma de Muestras

Las muestras de nueces se recolectaron en tres segmentos: a) Árbol, b) Suelo y c) Bodega. Los lugares de recolección fueron los siguientes: Localidad de Chicolco y Frunut S.P.A. comuna San Esteban-Los Andes, V región de Valparaíso, y Agrícola y Comercial Fiume Ltda., ubicada en la comuna de San Bernardo región Metropolitana. El acondicionamiento de las muestras de nueces realizada en el LABTOX se verifica en el Anexo N°1.

### 8.2.1 Protocolo de extracción.

#### 8.2.1.1 Preparación de la muestra.



Pesar 10 g de pulpa de nuez homogenizada (rayada) en el frasco de juguera.



Mezclar con 40 mL de acetonitrilo/agua (90/10; v/v) durante 1 minuto en frasco de juguera.



Traspasar el homogenizado en un tubo de 50 mL y centrifugar a 6000 rpm por 10 min.



En un tubo de vidrio de 30 mL poner 10 mL del sobrenadante.



Evaporar la muestra a sequedad a 40°C, bajo corriente de N<sub>2</sub>.



Reconstituir el sedimento con 2 mL de una solución de acetonitrilo/agua (90/10; v/v). Homogenizar 30 segundos y sonicar por 1 minuto (Repetir 3 veces).



Agregar 18 mL de solución Tween 20/PBS (20/1000; p/v). Homogenizar y sonicar por 1 minuto.

#### **8.2.1.2 Activación de la columna**

- a. Colocar las columnas de inmutofinidat en un soporte.
- b. Dejar eluir la solución del fabricante del interior de la columna por gravedad.
- c. Aplicar 3 mL de solución PBS.
- d. Dejar pasar el volumen por gravedad.
- e. Repetir paso anterior y eluir hasta la mitad del volumen.
- f. Descartar.
- g. No permitir secar la columna.

#### **8.2.1.3 Aplicación de la muestra**

- a. Aplicar 10 mL de la muestra preparada.
- b. Hacer pasar la muestra a través de la columna (20 a 25 gotas por minuto).
- c. Descartar.

#### **8.2.1.4 Lavado de la muestra**

- a. Lavar con 10 mL de solución de lavado.
- b. Secar completamente la columna con presión manual.
- c. Descartar.

#### **8.1.2.5 Elución del analito.**

- a. Recoger la elución en un tubo ámbar de 8 a 10 mL.
- b. Eluir la muestra retenida con la columna IA con 1 mL de acetonitrilo puro.
- c. Dejar reposar todo el sistema a presión ambiental durante 5 minutos.
- d. Agregar a la columna 2 mL de acetonitrilo puro.
- e. Eluir completamente con presión manual.
- f. Evaporar la muestra a 35°C hasta sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub>.
- g. Reconstituir el sedimento con 500 µL de solución acetonitrilo: agua (90:10; v/v).
- h. Reconstituir homogenizando y sonicando por 5 minutos.

#### **8.1.2.6 Derivatización.**

- a. Mezclar 500 µL del reconstituido con 500 µL de solución derivatizante.
- b. Homogenizar por 1 minuto.
- c. Aplicar baño termorregulado a 60°C por 10 minutos.
- d. Homogenizar por 1 minuto.
- e. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- f. Colectar el volumen en un vial de 2 mL.
- g. Inyectar un volumen de 25 µL.

#### **8.1.2.7 Condiciones Cromatográficas.**

- Columna Analítica Phenomenex SYNERGY 4µ RP 80<sup>a</sup>; 250 x 4.60 mm.
- Flujo de la fase móvil: 1 mL/min.
- Longitud de onda de excitación: 360 nm.
- Longitud de onda de emisión: 440 nm.
- Volumen de inyección: 25 µL.
- Tiempo de corrida: 20 minutos.

## ANEXO 4.1: Protocolo de Aseguramiento de la Calidad de los Resultados

 <p>Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología</p>	<b>PROTOCOLO DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS</b>	<b>COPIA N° 1 01/09/16</b>
	Américo López Rivera <sup>a</sup> Andrea Mella Torres <sup>b</sup> y Pablo Yañes Soto <sup>c</sup>	
	<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>b</sup> Analista: Bioquímico <sup>c</sup> Analista: Químico farmacéutico	

### 1. OBJETIVO.

Describir las actividades y determinar los parámetros que permitan asegurar la calidad y validez de los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de AFLAs en nueces, mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC-FLD).

### 2. ALCANCE.

Este procedimiento es aplicable a los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de AFLAs en matrices de nueces, mediante el uso de un método de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia.

### 3. RESPONSABILIDAD.

#### **Prof. Director del Laboratorio:**

- Gestionar los recursos para la adquisición de los estándares, equipamientos, materiales y reactivos utilizados en el procedimiento de aseguramiento de la calidad de los resultados.
- Revisar y aprobar el Protocolo de Aseguramiento de la Calidad de los Resultados.
- Participar en la evaluación de los resultados obtenidos.

#### **Analistas Químicos del Proyecto.**

- Desarrollar y proponer un protocolo de aseguramiento de la calidad de los resultados.
- Aplicar el Protocolo aseguramiento de la calidad de los resultados de acuerdo a lo establecido.
- Verificar que los resultados de los análisis, se encuentren dentro del rango de aceptabilidad de acuerdo al aseguramiento de la calidad de los resultados.
- Participar en la evaluación de los resultados obtenidos.
- Registrar los resultados y la información adquirida.

#### 4. DISTRIBUCIÓN.

Profesor Américo López Rivera, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

#### 5. EQUIPOS Y MATERIALES.

Se utilizan los equipos, materiales, reactivos y estándares identificados en el Protocolo de determinación y cuantificación de AFLAs en nueces.

##### 5.1.1 Matriz Fortificada con Mix de AFLAs de 2,5 ng/g.

- **Muestra de nueces fortificadas:** A 30 g de matriz (nuez), previamente analizadas y designadas como muestras cero agregar 1,5 mL de una solución mix de AFLAs de 50 ng/mL.

#### 6. FUNDAMENTO.

El aseguramiento de la calidad de los resultados es determinada mediante la fijación del tiempo de retención de las AFLAs en una solución estándar y la reproducibilidad de la recuperación en una muestra de la matriz fortificada con una concentración conocida.

#### 7. DEFINICIONES.

- **Duplicado (re análisis):** Otra porción de una muestra que es analizada en paralelo a la muestra inicial, aplicando el mismo método de análisis y equipos.
- **Replicado:** Es otra lectura analítica obtenido de un procedimiento y realizado a una sola muestra.
- **Estándar Certificado de Mix de Aflatoxinas (AFLAs):** Sustancias caracterizadas por la pureza química y/o trazas de impurezas. Patrones utilizados, para validar los métodos de medición analíticos, o para la calibración de los instrumentos.

#### 8. ACTIVIDAD.

##### 8.1. Uso de estándar de trabajo.

Cada vez que se realiza una serie de análisis de muestras, se inyecta una solución del estándar del mix de AFLAs con concentración conocida. Estas soluciones son inyectadas al comienzo de un set de análisis.

##### 8.2. Uso de matriz (nuez) fortificada con mix de AFLAs.

Cada vez que se realiza una serie de análisis de muestras, se procesa una matriz blanco fortificada con estándar de mix de AFLAs con concentración conocida y se inyecta en el cromatógrafo.

### 8.3. Control diario de calidad.

Se define como set de control, al siguiente conjunto de análisis:

- Fase móvil.
- Solución estándar de trabajo.
- Fase móvil.
- Muestra (nuez) fortificada con mix de AFLAs
- Fase móvil.
- Set de 6 muestras.
- Fase móvil.

El set de control cumple con las siguientes características:

- Es realizado en el mismo tiempo, espacio físico y por el mismo analista.
- Está sometido a las mismas condiciones ambientales y riesgo de contaminación.

### 8.4. Criterio general de aceptación o rechazo.

#### 8.4.1. Criterios de aceptabilidad de análisis diario.

Se debe realizar un test de aceptabilidad del extracto de matriz fortificada con 2.5 ng/g del mix de AFLAs de: tiempos de retención, temperatura ambiental, presión de la columna analítica. Para procesar un set de muestras, se verifica que se cumplan los siguientes criterios:

Parámetros	Criterios de aceptación
Concentración del estándar de trabajo	± 5 a 10 %
Recuperación (matriz fortificada)	90% ± 10%
Tiempo de retención	AFG1: 5.7 min ± 5% AFB1: 7 min ± 5% AFG2: 11 min ± 5% AFB2: 14.9 min ± 5%
Temperatura ambiental	20- 25 °C
Presión de la columna analítica	250–260 bar

#### 8.4.2. Pasos a seguir en caso de desviación de los criterios de aceptación.

Parámetro no Satisfactorio	Pasos a seguir en caso de desviación
Concentración de trabajo	-Realizar chequeo del sistema HPLC (control de flujo, funcionamiento de lámpara, presión, etc.) -Inyectar nuevamente la solución estándar
Recuperación (muestra fortificada)	-Verificar la composición (%) de la fase móvil en uso. -Activar la columna por un tiempo no menor a 15 min. -Preparar una nueva muestra de matriz fortificada. -Inyectar nuevamente el extracto de matriz fortificada. -Cambiar la columna analítica
Tiempo de retención	-Verificar composición de las soluciones de lavado, acondicionamiento y extracción.  Realizar procedimiento de limpieza de la columna analítica.
Presión de la columna analítica	-Cambiar la columna analítica.
Temperatura ambiental	Verificar el funcionamiento del sistema de control de temperatura ambiental.

En caso de desviación de uno o más parámetros se pueden realizar todos o una combinación de los pasos descritos.

## ANEXO 4 B: Protocolo de determinación de Ocratoxina A en muestras de nueces.

 Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología	<b>PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN MUESTRAS DE NUECES</b>	<b>COPIA N° 01 09/09/2016</b>
	Américo López Rivera <sup>a</sup> , Andrea Mella Torres <sup>b</sup> y Pablo Yañez Soto <sup>c</sup> .	
	<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>b</sup> Analista: Bioquímico <sup>c</sup> Analista: Químico farmacéutico	

### 1. OBJETIVO.

Describir el protocolo de Análisis de Determinación y Cuantificación de Ocratoxina A (OTA) en muestras de nueces, detallando en forma clara y precisa los ítems de instrumentación, uso de columna de extracción, dilución del estándar, condiciones cromatográficas (HPLC/FL) e inyección de las muestras, de modo que el analista obtenga la información necesaria para la correcta aplicación de este protocolo.

### 2. ALCANCE.

Este procedimiento es aplicable a todas las determinaciones de OTA en muestras de nuez, utilizando columnas de extracción de fase sólida (SPE) y el método HPLC/FL, desarrollado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (LABTOX).

### 3. RESPONSABILIDAD.

#### Prof. Director de Laboratorio:

- Gestionar los recursos para la adquisición de los estándares, equipamientos, materiales y reactivos utilizados en el procedimiento de determinación de OTA y cuantificación de OTA en nueces.
- Revisar y aprobar el protocolo de determinación y cuantificación de OTA en nueces.

#### Analistas del Proyecto:

- Desarrollar y proponer un protocolo de determinación de OTA en nueces.
- Aplicar el protocolo al análisis de muestras de nueces de acuerdo a lo establecido.
- Verificar que los resultados de los análisis, se encuentren dentro del rango de aceptabilidad.
- Participar en la evaluación de los resultados obtenidos.
- Registrar los resultados y la información obtenida.

#### 4. DISTRIBUCIÓN.

Profesor Américo López Rivera, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

#### 5. EQUIPOS Y REACTIVOS.

##### 5.1. Equipamiento.

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento equipado con: Muestreador Automático (prominence SIL-20 AC), Bomba Isocrática (Prominence Liquid chromatograph LC-20AR), Detector de Fluorescencia (Shimadzu RF-10AXL).
- Baño de ultrasonido Brason, Ultrasonic Cleaner 2510.
- Vortex Termolyne Maximix II.
- Desionizador Barnstead Nanopure Infinity.
- Micropipetas Gilson, 100-1000 $\mu$ L y 10-100 $\mu$ L.
- Columnas de Extracción de Fase Solida (SPE) de 3 mL. 500 mg unida a gel Sílica. (Bakerbond, Octadecyl C<sub>18</sub>), SampliQ.
- Columna analítica marca Phenomenex: Luna C<sub>18</sub>, 250 x 2.00 mm 5 $\mu$ .

##### 5.2. Reactivos.

- Acetonitrilo, grado HPLC.
- Metanol, grado HPLC.
- Agua desionizada.
- Ácido acético, para análisis.
- Gas inerte nitrógeno.

##### 5.2.1. Soluciones.

- **Solución de dilución de estándar de OTA:**

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH, (30:70:1) v/v.

Para 100 mL de solución se agrega, 30 mL de acetonitrilo, 70 mL de agua y 1 mL de ácido acético.

- **Solución de extracción de muestra:**

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH, (50:50:1) v/v.

Para 500 mL de solución se agrega, 250 mL de acetonitrilo, 250 mL de agua y 5 mL de ácido acético.

- **Solución de lavado:**

MeOH/H<sub>2</sub>O, (30:70) v/v.

Para 100 mL de solución se agrega, 30 mL de metanol y 70 mL de agua.

- **Solución de elución:**

MeOH/ CH<sub>3</sub>COOH, (99.5/0.5) v/v.

Para 100 mL de solución se agrega, 99.5 mL de metanol y 0.5 mL de ácido acético.

- **Fase móvil:**

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH, (56:43:1) v/v.

Para 1 L de solución se agrega, 560 mL de acetonitrilo, 430 mL de agua y 10 mL de ácido acético.

##### 5.3. Estándar.

1 mg de estándar de Ochratoxin A obtenidas de *Aspergillus ochraceus*. (Sigma), mayor igual a 98% pureza.

## 6. FUNDAMENTO.

El método está basado en extracción de OTA de nuez, con la solución de extracción (acetonitrilo/ agua/ ácido acético; 50:50:1; v/v) y separación del analito mediante el uso de columnas (SPE) para su posterior análisis por técnica HPLC con detección por fluorescencia.

El cálculo de la concentración de la toxina, se determina mediante el uso de una curva de calibración realizada con matriz fortificada con estándar de OTA.

## 7. DEFINICIONES.

Para los efectos de esta directriz se define como:

**Ocratoxina A (OTA):** Es una micotoxina producida por hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Tiene propiedades nefrotóxicas e inmunosupresoras. Ha sido detectada en numerosos alimentos, como cereales, legumbres, café, cacao, entre otros.

**Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento o High Performance Liquid Chromatography (HPLC):** Es un tipo de cromatografía en columna. Es el método analítico de separación más versátil y más utilizado de los métodos cromatográficos debido a su alta sensibilidad, especificidad y al gran campo de aplicación.

**Tiempo de retención (TR):** Es el tiempo que transcurre inmediatamente después de la inyección de la muestra hasta que el pico cromatográfico del analito alcanza su máximo.

**Nueces Fortificadas:** Muestras de nuez a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito de interés.

## 8. ACTIVIDAD.

El control de calidad de este método analítico HPLC-FL para OTA se verifica de acuerdo al Procedimiento de Aseguramiento de la Calidad (Anexo 4).

### 8.1. Curvas de calibración.

Construcción de una curva de calibración con matriz (nuez) fortificada con estándar de OTA.

#### 8.1.1. Curva de calibración de nuez fortificada con OTA.

Para la cuantificación de OTA se realiza una curva de calibración de nuez fortificada con OTA. Se utilizan al menos 5 puntos de concentración (1,5; 2,5; 5,0; 7,0 y 10,0 ng/g). Cada punto es realizado por duplicado e inyectado en replicado.

### 8.2. Muestras.

#### 8.2.1. Recolección y toma de muestras.

Las muestras de nueces se recolectaron en tres segmentos: a) Árbol, b) Suelo y c) Bodega. Los lugares de recolección fueron los siguientes: Localidad de Chincolco y Frunut S.P.A. comuna San Esteban-Los Andes, ubicados en la V región de Valparaíso, y Agrícola y Comercial Fiume Ltda., ubicada en la comuna de San Bernardo región Metropolitana.

El acondicionamiento de las muestras de nuez realizada en el LABTOX se verifica en el Anexo N°1.

## 8.2.2. Protocolo de extracción.

### 8.2.2.1. Pre tratamiento de la muestra.

Se realiza por cada tipo de muestra: semilla, cáscara y pelón de nuez.

- **Semilla:** Pesar 180 g de muestra y rayar utilizando un rayador de mano.
- **Cáscara:** Pesar 160 g de muestra, y luego moler utilizando un molino de grano.
- **Pelón:** Pesar 160 g de muestra. No requiere un tratamiento adicional para ser homogenizada.

### 8.2.2.2. Preparación de la muestra.

- a. En un vaso de vidrio agregar: 10 g de muestra homogenizada y 40 mL de solución de extracción (acetonitrilo/agua/ác.Acético):  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$  (50:50:1) v/v.
- b. Licuar la mezcla durante 1 min.
- c. Trasvasar a un tubo de 50 mL para ser centrifugado a 6000 rpm por un tiempo de 10 min.
- d. El sobrenadante es filtrado para obtener la muestra lista para ser adicionado a la columna de extracción de OTA.

### 8.2.2.3. Activación de la columna.

- a. Aplicar 3 mL de agua desionizada.
- b. Agregar 3 mL de MeOH.

No permitir secar la columna. **Descartar**

### 8.2.2.4. Aplicación de la muestra.

- a. Aplicar 3 mL de la muestra filtrada.
  - b. Hacer pasar la muestra a través de la columna (20 a 25 gotas por minuto).
- No permitir secar la columna. **Descartar**

### 8.2.2.5. Lavado de la muestra.

- a. Lavar con 2,5 mL de (metanol/agua) MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (30/70) v/v.
- b. Secar completamente la columna con presión. **Descartar**

### 8.2.2.6. Elución del analito.

- a. Eluir la muestra con 2,5 mL de (metanol/ác.acético) MeOH/ $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,5/0,5) v/v.
- b. Permitir eluir 5 primeras gotas con presión.
- c. Dejar reposar a presión ambiental durante 2 minutos.
- d. Eluir suavemente a un ritmo de 10 a 12 gotas por minuto.
- e. Recoger el eluido en un tubo ámbar de 8 mL.
- f. Eluir el analito completamente con presión.
- g. Secar bajo corriente de  $\text{N}_2$  a 45 °C.
- h. Reconstituir con 0,5 mL de la solución de dilución: (acetonitrilo/agua/ác.acético)  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$  (30/70/1) v/v.
- i. Inyectar un volumen de 100  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo.

## 8.3. Condiciones cromatográficas.

- Columna analítica: Phenomenex Luna C18, 250 x 2.00 mm 5 $\mu$ .
- Longitud de onda de excitación: 333 nm.
- Longitud de onda de emisión: 460 nm.
- Fase móvil: acetonitrilo/agua/ác.acético (56:43:1) v/v.
- Flujo de la fase móvil: 0,28 mL/min.
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{L}$ .
- Tiempo de retención estimado: aprox 8,5 min.
- Tiempo de corrida: 14 min.

#### **8.4. Cálculo de la concentración de ocratoxina A.**

Para la cuantificación de OTA se construyó una curva de calibración con nuez fortificada con estándar de OTA. Se utilizaron 5 puntos de concentración (1,5; 2,5; 5,0; 7,0 y 10,0 ng/g). Cada punto es realizado en duplicado e inyectado en replicado. La concentración extrapolada de la curva de calibración que da el equipo, corresponde a la concentración en ng/g de OTA en 1 g de la muestra reconstituida. Para calcular la cantidad de OTA (ng/g) presente en las muestras se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración muestra} = \frac{CHPLC * VR}{VM}$$

Donde:

CHPLC	: Lectura encontrada por equipo HPLC.
VR	: Volumen de reconstitución de la muestra.
VM	: Cantidad de muestra.

## ANEXO 4.1: Protocolo de Aseguramiento de la Calidad de los Resultados.

 Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología	<b>PROTOCOLO DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS RESULTADOS DE OCRATOXINA A</b>	<b>Copia N° 01 09/09/2016</b>
	Américo López Rivera <sup>a</sup> Andrea Mella Torres <sup>b</sup> y Pablo Yañes Soto <sup>c</sup>	
	<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>b</sup> Analista: Bioquímico <sup>c</sup> Analista: Químico farmacéutico	

### 1. OBJETIVO.

Describir las actividades y determinar los parámetros que permitan asegurar la calidad y validez de los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de OTA en nueces, mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC-FLD).

### 2. ALCANCE.

Este procedimiento es aplicable a los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de OTA en nuez, usando el uso del método HPLC/FL desarrollado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

### 3. RESPONSABILIDAD.

#### Prof. Director de Laboratorio:

- Gestionar los recursos para la adquisición de los estándares, equipamientos, materiales y reactivos utilizados en el procedimiento de control de calidad de los análisis.
- Revisar y aprobar el Protocolo Aseguramiento de la Calidad de los Resultados.
- Participar en la evaluación de los resultados obtenidos.

#### Analistas Químicos del Proyecto.

- Desarrollar y proponer un protocolo de aseguramiento de la calidad de los análisis.
- Aplicar el protocolo de control de calidad de los análisis de acuerdo a lo establecido.
- Verificar que los resultados de los análisis, se encuentren dentro del rango de aceptabilidad de acuerdo al aseguramiento de control de calidad de los resultados.
- Registrar los resultados y la información obtenida.

#### 4. DISTRIBUCIÓN.

Profesor Américo López Rivera, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

#### 5. EQUIPOS Y MATERIALES.

##### 5.1. Equipamiento.

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento equipado con: Muestreador automático (Prominence SIL-20 AC), Bomba Isocrática (ProminCE Liquid Chromatograph LC-20AT), Detector de fluorescencia (Shimadzu RF-10AXL).
- Baño ultrasonido Branson, Ultrasonic Cleaner 2510.
- Vortex Thermolyne Maximix II.
- Desionizador Barnstead Nanopure Infinity.
- Micropipetas Gilson, 100-1000  $\mu\text{L}$  y 10-100  $\mu\text{L}$ .
- Columnas de Extracción de Fase Sólida (SPE) de 3 mL. 500 mg unida a gel Sílica (Bakerbond, Octadecyl  $\text{C}_{18}$ ).
- Columna analítica marca Phenomenex: Luna C18, 250 x 2.00 mm 5 $\mu$ .

##### 5.2. Reactivos.

- Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), grado HPLC.
- Metanol ( $\text{MeOH}$ ), grado HPLC.
- Agua desionizada, grado HPLC.
- Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), para análisis.

##### 5.2.1. Soluciones.

###### Solución de dilución de estándar de OTA:

$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , (30:70:1) v/v.

Para 100 mL de solución se agrega, 30 mL de acetonitrilo, 70 mL de agua y 1 mL de ácido acético.

###### Solución de extracción de muestra:

$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , (50:50:1) v/v.

Para 500 mL de solución se agrega, 250 mL de acetonitrilo, 250 mL de agua y 5 mL de ácido acético.

###### Solución de lavado:

$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , (30:70) v/v.

Para 100 mL de solución se agrega, 30 mL de metanol y 70 mL de agua.

###### Solución de elución:

$\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , (99.5/0.5) v/v.

Para 100 mL de solución se agrega, 99.5 mL de metanol y 0.5 mL de ácido acético.

###### Fase móvil:

$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , (56:43:1) v/v.

Para 1 L de solución se agrega, 560 mL de acetonitrilo, 430 mL de agua y 10 mL de ácido acético.

##### 5.2.2. Estándares.

1 mg de estándar de Ochratoxin A extraída de *Aspergillus ochraceus*. (Sigma), mayor igual a 98% pureza.

## 6. FUNDAMENTO.

El aseguramiento de la calidad de los resultados, permitió asegurar la validez de los valores obtenidos mediante la determinación del tiempo de retención en una solución estándar del analito y reproducibilidad de la recuperación en una muestra de matriz fortificada con una concentración conocida.

## 7. DEFINICIONES.

- **Duplicado (re-análisis):** Otra parte de una muestra que es analizada en paralelo a la muestra inicial, aplicando el mismo método de análisis y equipos.
- **Replicado:** Es otra lectura analítica obtenida de un procedimiento y realizado a una sola muestra.
- **Recuperación:** Capacidad del método de determinar todo el analito presente en la muestra.
- **Límite de detección (LD):** Concentración a la cual la señal del compuesto analizado es 3 veces mayor que el nivel de ruido.
- **Límite de cuantificación (LC):** Concentración mínima cuantificable.
- **Material fortificado:** Cantidad de una matriz a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del estándar de OTA.

## 8. ACTIVIDAD.

**8.1.1. Uso de estándar de trabajo:** Cada vez que se realiza una serie de análisis de muestras, se inyecta una solución del estándar de ocratoxina A con concentración conocida. Estas soluciones son inyectadas al comienzo de un set de análisis.

**8.1.2. Uso de muestra (nuez) fortificada con OTA:** Cada vez que se realiza una serie de análisis de muestras, se procesa en duplicado cada muestra fortificada con estándar de ocratoxina A con concentración conocida.

**8.1.3. Control diario de calidad.** Se define como set de control, al siguiente conjunto de análisis:

- Fase móvil.
- Solución estándar de trabajo.
- Fase móvil.
- Muestra (nuez) fortificada con OTA.
- Fase móvil.
- Set de 6 muestras
- Fase móvil.

Este procedimiento se realiza cada 6 muestras.

El set de control cumple con las siguientes características:

- Es realizado en el mismo tiempo, espacio físico y por el mismo analista.
- Está sometido a las mismas condiciones ambientales.

## 8.2. Criterio general de aceptación o rechazo.

**8.2.1. Criterios de aceptabilidad de análisis diario:** Se debe realizar un test de aceptabilidad de la solución de estándar de ocratoxina A de 2.5 ng/mL: tiempos de retención, temperatura ambiental, presión de la columna analítica. Para procesar un set de muestras, se verifica que se cumplan los siguientes criterios:

Parámetros	Criterios de aceptación
Concentración de trabajo	$\pm 5\%$
Recuperación (muestra fortificada)	$90\% \pm 5\%$
Tiempo de retención	$8.5 \text{ min} \pm 5\%$
Temperatura ambiental	20- 25 °C
Presión de la columna analítica	180 – 240 bar

## 8.2.2. Pasos a seguir en caso de desviación de los criterios de aceptación.

Parámetro no Satisfactorio	Pasos a seguir en caso de desviación
Concentración de trabajo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Realizar chequeo del sistema HPLC (control de flujo, funcionamiento de lámpara, presión, etc).</li><li>• Inyectar el estándar en duplicado.</li><li>• Verificar composición de la fase móvil en uso.</li><li>• Preparar una nueva fase móvil y se activa la columna por un tiempo no menor a 15 min.</li><li>• Inyectar nuevamente el estándar con la fase móvil nueva.</li><li>• Preparar un nuevo estándar de trabajo.</li><li>• Aplicar programa de limpieza de la columna.</li><li>• Cambiar la columna.</li><li>• Verificar composición de las soluciones de extracción.</li><li>• Cambiar la columna de extracción (SPE)</li></ul>
Recuperación (muestra fortificada)	
Tiempo de retención	
Presión de la columna analítica	
Temperatura ambiental	
	Verificar el funcionamiento del sistema de control de temperatura ambiental.

## ANEXO 4.2: Cromatogramas.

Figura 1: Cromatograma de solución estándar puro de OTA de 10,0 ng/mL.

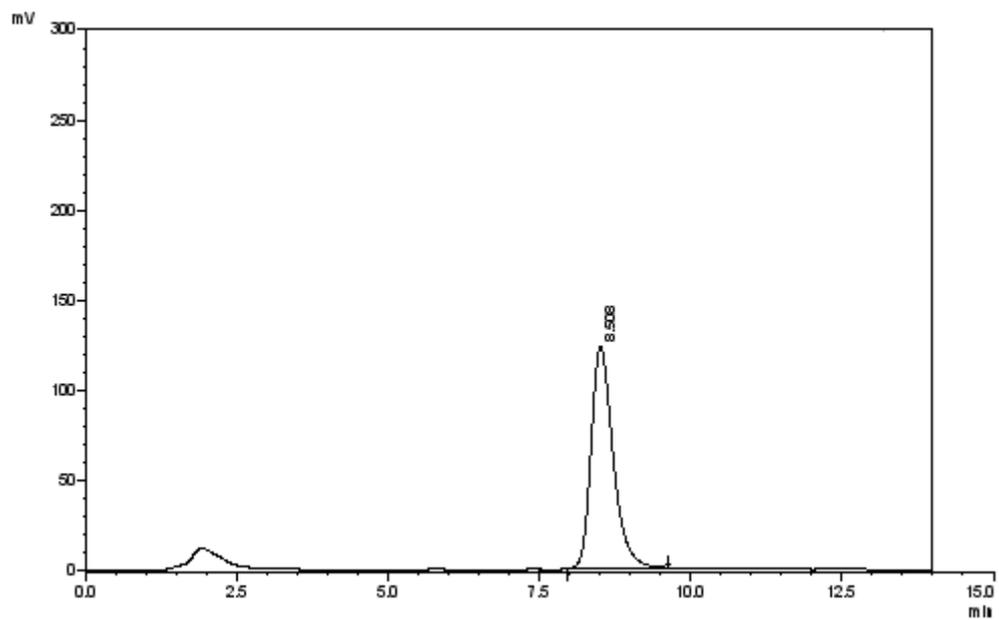
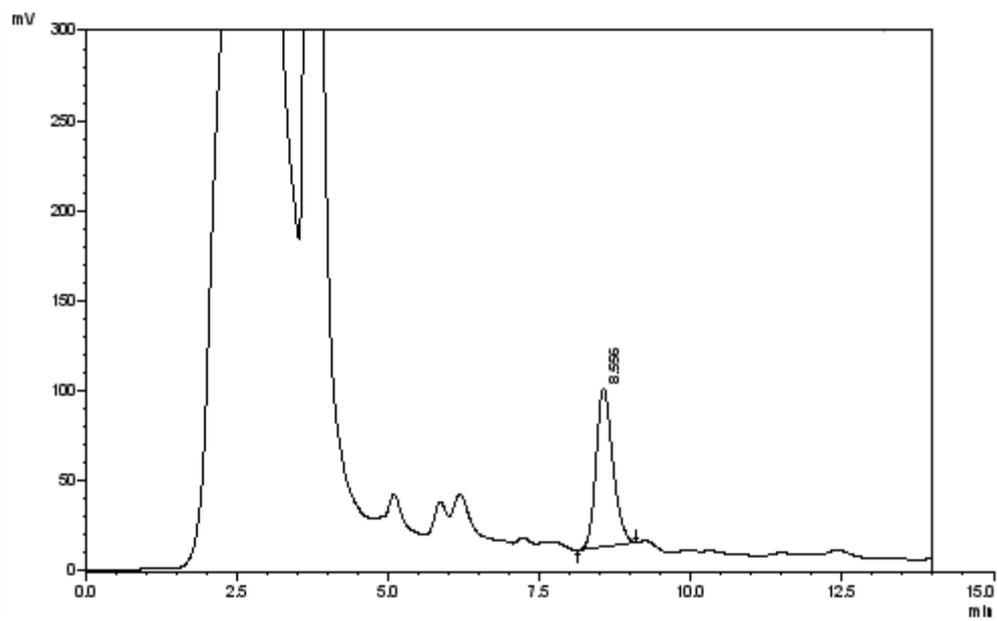
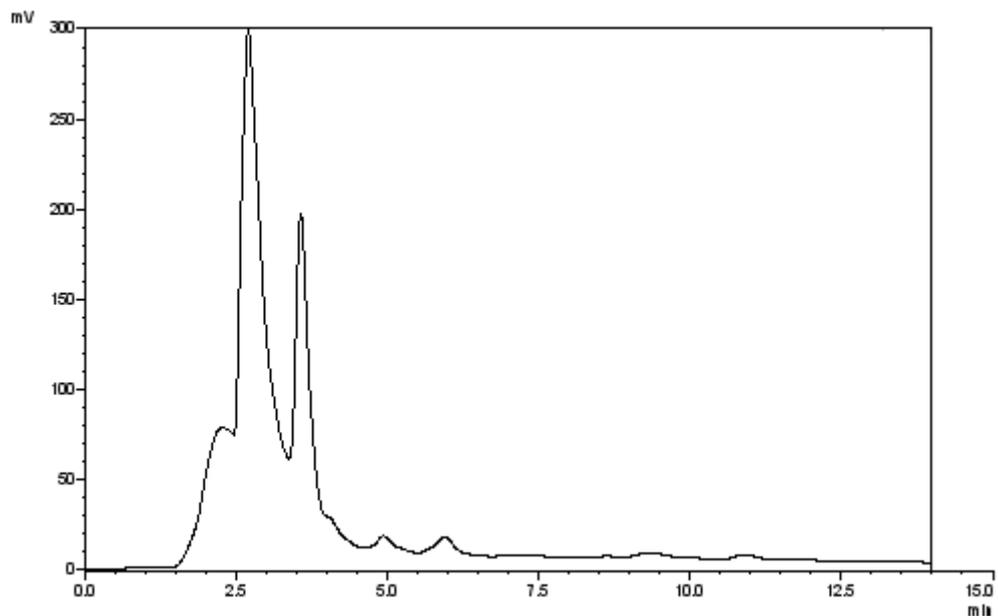


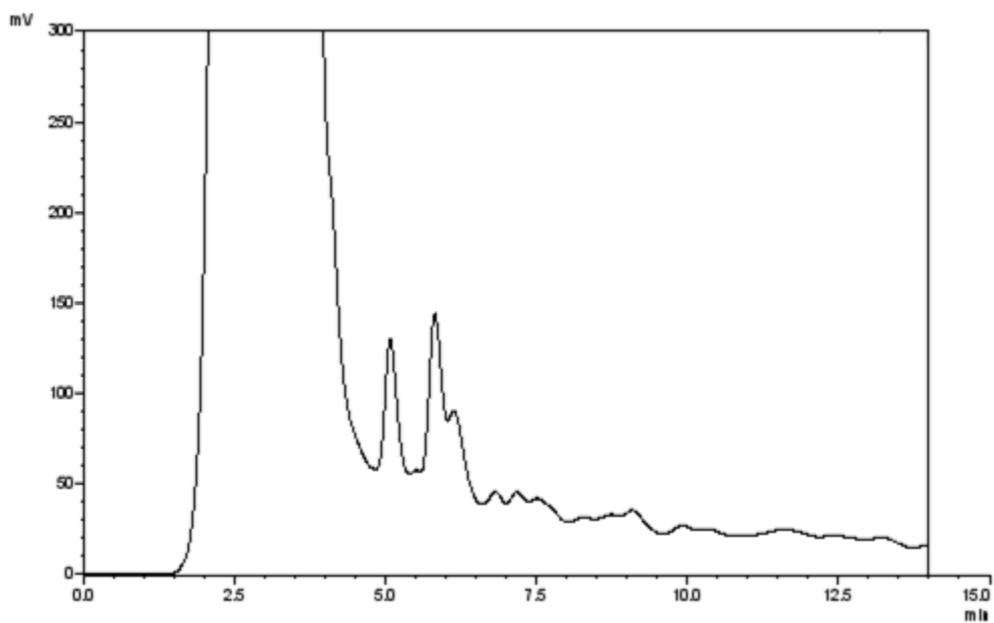
Figura 2: Cromatograma de análisis de semilla de nuez fortificada con 10,0 ng/g.



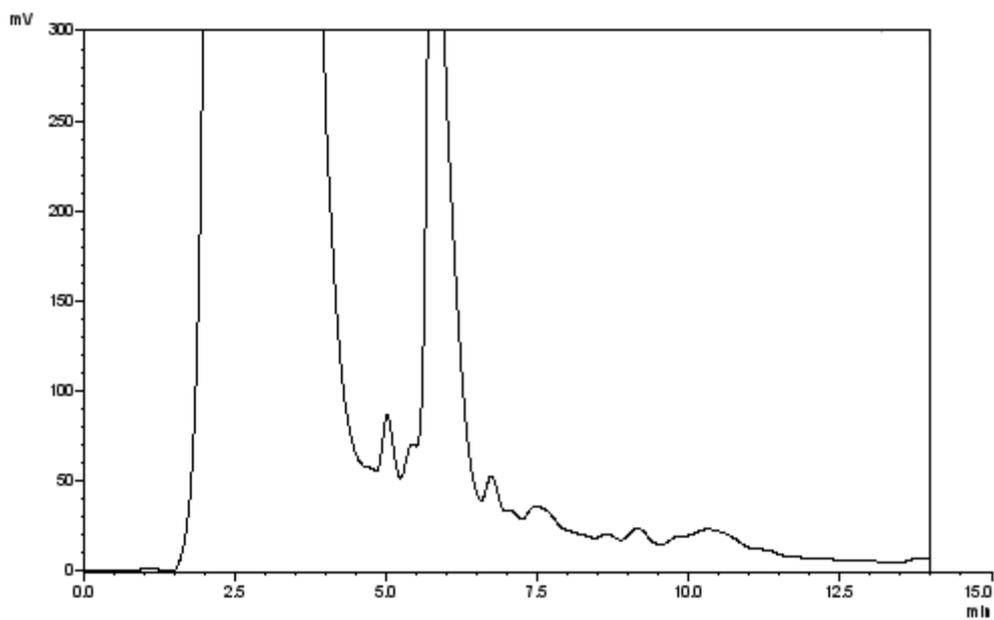
**Figura 3: Cromatograma de análisis de semilla de nuez H20/A16 sin la presencia de OTA.**



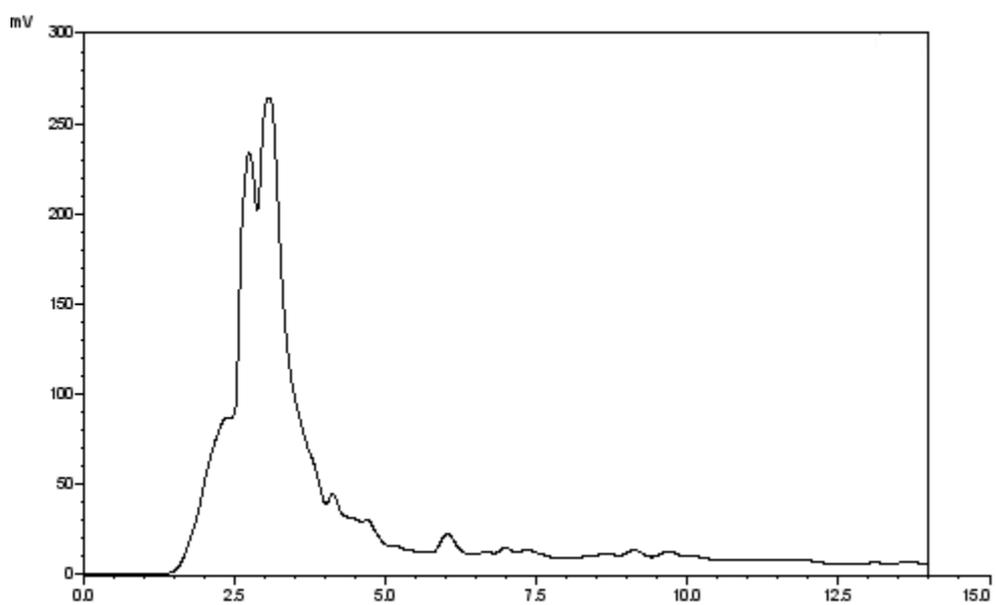
**Figura 4: Cromatograma de análisis de cáscara de nuez C6/M1 sin la presencia de OTA.**



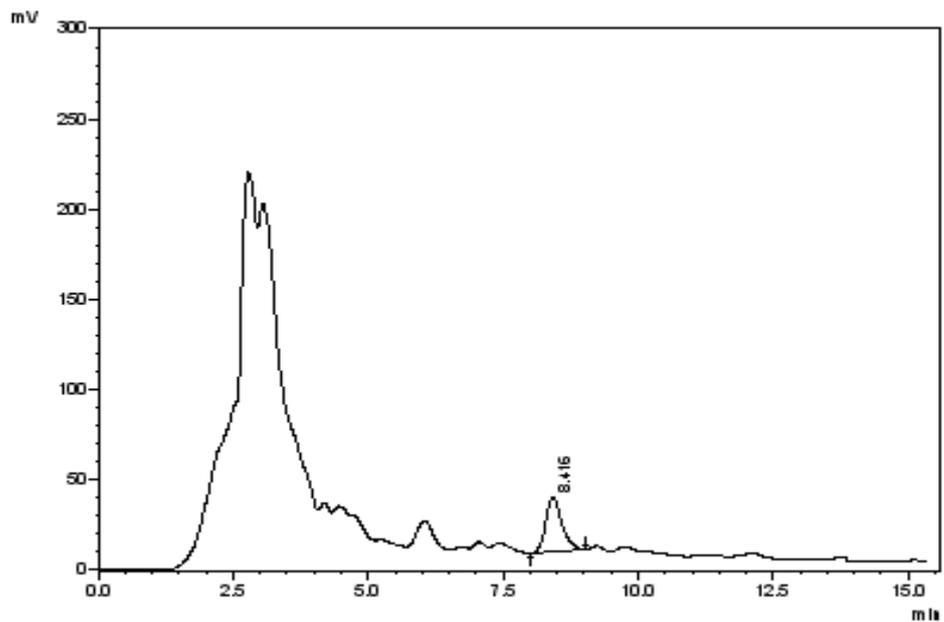
**Figura 5: Cromatograma de análisis de pelón de nuez H06 / A08 sin la presencia de OTA.**



**Figura 6: Cromatograma de análisis de semilla de almendra H13/A06 sin la presencia de OTA.**



**Figura 7: Cromatograma de análisis de semilla de almendra fortificada con 2,5 ng/g.**



**Figura 8: Cromatograma de análisis de cáscara de almendra C2/M3 sin la presencia de OTA**

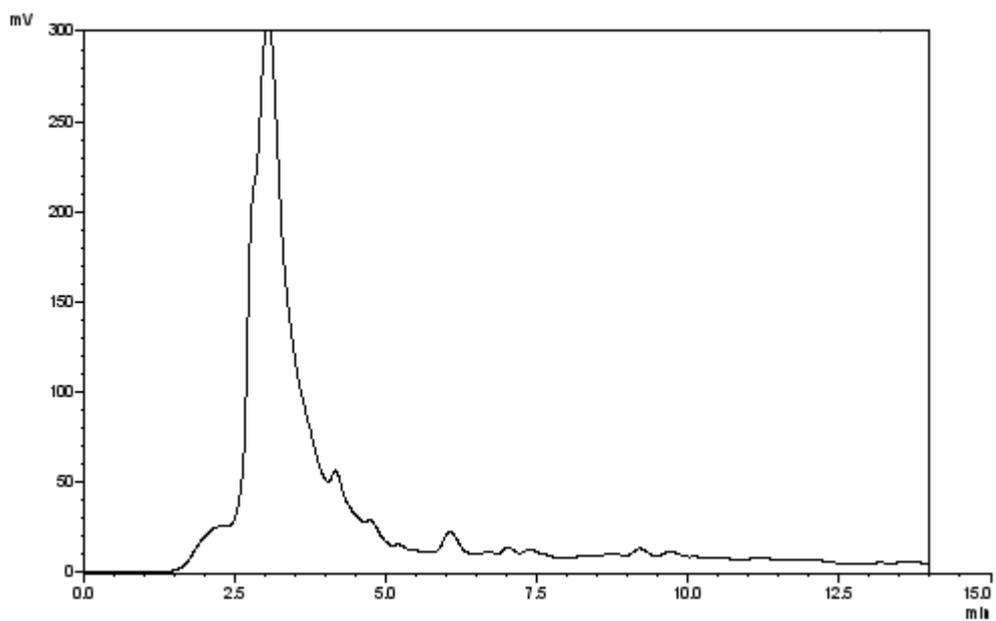
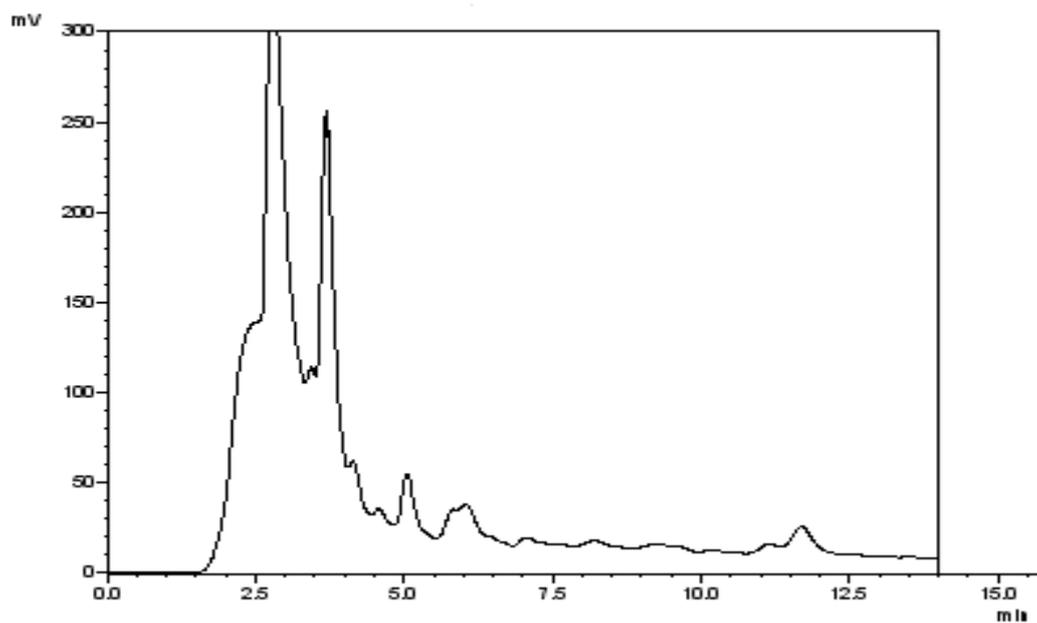


Figura 9: Cromatograma de análisis de pelón de almendra H15/A11 sin la presencia de OTA



## ANEXO 5A

Chincolco 2016

N°	Muestra	Lugar	Código muestra	Resultados [OTA]	Resultados [AFLAs]
1	Pulpa Limpia	Suelo	M 43	Positivo (BLC)	negativo
2	Pulpa Limpia	Suelo	M 42	Positivo (BLC)	negativo
3	Pulpa Limpia	Árbol	M 8	Positivo (BLC)	negativo
4	Pulpa Limpia	Bodega	M 13	negativo	negativo
5	Pulpa Sucia	Bodega	M 6	negativo	negativo
6	Pulpa Sucia	Bodega	M 7	Positivo (BLC)	negativo
7	Cáscara sucia	Bodega	M 10	negativo	negativo
8	Cáscara sucia	Bodega	M 11	negativo	negativo
9	Pulpa Sucia	Suelo	M 25	negativo	negativo
10	Pulpa Sucia	Árbol	M 9	Positivo (BLC)	negativo
11	Cáscara Sucia	Árbol	M 16	negativo	negativo
12	Cáscara sucia	Suelo	M 12	negativo	negativo
13	Cáscara sucia	Suelo	M 15	negativo	negativo
14	Pulpa Sucia	Suelo	M 26	negativo	negativo
15	Cáscara sucia	Árbol	M 14	negativo	negativo
16	Pulpa Sucia	Árbol	M 17	Positivo (BLC)	negativo
17	Pulpa Limpia	Árbol	M 56	negativo	negativo
18	Pulpa Limpia	Árbol	M 57	negativo	negativo
19	Pulpa Limpia	Árbol	M 58	negativo	negativo
20	Pulpa Limpia	Árbol	M 59	negativo	negativo
21	Pulpa Limpia	Árbol	M 60	negativo	negativo
22	Pulpa Limpia	Árbol	M 61	negativo	negativo

De las diferentes muestras analizadas mediante el método HPLC desarrollado para la detección de micotoxinas (OTA y AFLAs) se observaron sólo 6 muestras sobre el límite de detección (BLC = bajo el límite de cuantificación) para OTA, y para AFLAs todas las muestras presentaron un resultado bajo el nivel de detección (negativas)

## ANEXO 5B

Chincolco 2017

N°	Muestra	Lugar	Código muestra	Resultados [OTA]	Resultados AFLAs
1	Nuez Cáscara Sucia	Árbol	A13	negativo	negativo
2	Nuez pulpa Sucia	Árbol	A14	negativo	Negativo
3	Nuez Pelón	Árbol	A15	negativo	negativo
4	Nuez pulpa Sucia	Árbol	A17	negativo	negativo
5	Nuez Cáscara Sucia	Árbol	A18	negativo	negativo
6	Nuez Pelón	Árbol	A19	Positivo (BLC)	negativo
7	Nuez pulpa Sucia	Suelo	A31	negativo	Negativo
8	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A35	negativo	Positivo (BLC)
9	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A28	negativo	Negativo
10	Nuez pulpa Sucia	Suelo	A42	negativo	negativo
11	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A43	negativo	negativo
12	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A44	negativo	negativo
13	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A55	negativo	negativo
14	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A56	Positivo (BLC)	negativo
15	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A61	negativo	negativo
16	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A65	negativo	negativo
17	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A66	negativo	negativo
18	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A 70	negativo	negativo
19	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A 71	negativo	negativo
20	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A 72	negativo	negativo
21	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A 73	negativo	negativo
22	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A 74	negativo	negativo
23	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A 75	negativo	negativo
24	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A 76	negativo	negativo

De las diferentes muestras analizadas mediante el método HPLC desarrollado para la detección de micotoxinas (OTA y AFLAs) se observaron sólo 2 muestras sobre el límite de detección (BLC = bajo el límite de cuantificación) para OTA, y para AFLAs sólo 1 muestra sobre el límite de detección pero bajo el límite de cuantificación

## ANEXO 5C

Lo Herrera 2016

N°	Muestra	Lugar	Código Muestra	Resultados [OTA]	Resultados [AFLAs]
1	Pulpa Sucia	Árbol	M 23	negativo	negativo
2	Cáscara Sucia	Suelo	M 20	negativo	negativo
3	Cáscara Sucia	Suelo	M 22	negativo	negativo
4	Pulpa Sucia	Suelo	M 27	negativo	negativo
5	Cáscara Sucia	Árbol	M 19	Positivo (BLC)	negativo
6	Cáscara Sucia	Árbol	M 18	Positivo (BLC)	negativo
7	Pulpa Sucia	Árbol	M 24	negativo	negativo
8	Pulpa Sucia	Suelo	M 28	negativo	negativo
9	Pulpa Sucia	Suelo	M 29	negativo	negativo
10	Cáscara Sucia	Suelo	M 21	negativo	negativo
11	Pulpa Limpia	Árbol	M 66	negativo	negativo
12	Pulpa Limpia	Árbol	M 45	Positivo (BLC)	negativo
13	Pulpa Limpia	Suelo	M 44	Positivo (BLC)	negativo
14	Pulpa Limpia	Suelo	M 46	Positivo (BLC)	negativo
15	Pulpa Limpia	Árbol	M 47	Positivo (BLC)	negativo
16	Pulpa Limpia	Suelo	M 48	Positivo (BLC)	negativo
17	Pulpa Limpia	Árbol	M 62	negativo	negativo
18	Pulpa Limpia	Árbol	M 63	negativo	negativo
19	Pulpa Limpia	Árbol	M 64	negativo	negativo
20	Pulpa Limpia	Árbol	M 65	negativo	negativo

De las diferentes muestras analizadas mediante el método HPLC desarrollado para la detección de micotoxinas (OTA y AFLAs) se observaron sólo 7 muestras sobre el límite de detección (BLC = bajo el límite de cuantificación) para OTA, y para AFLAs todas las muestras presentaron un resultado bajo el nivel de detección (negativas)

## ANEXO 5D

Lo Herrera 2017

N°	Muestra	Lugar	Código Muestra	Resultados [OTA]	Resultados AFLAs
1	Nuez Pulpa Sucia	Árbol	A1	negativo	Negativo
2	Nuez Cáscara Sucia	Árbol	A2	negativo	negativo
3	Nuez Cáscara Sucia	Árbol	A3	negativo	negativo
4	Nuez Pelón	Árbol	A4	Positivo (BLC)	Negativo
5	Nuez Pelón	Árbol	A5	negativo	negativo
6	Nuez Pulpa Sucia	Árbol	A6	negativo	Negativo
7	Nuez Pulpa Sucia	Árbol	A7	negativo	Negativo
8	Nuez Cáscara Sucia	Árbol	A8	negativo	negativo
9	Nuez Pelón	Árbol	A9	negativo	negativo
10	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A10	negativo	negativo
11	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A11	negativo	Negativo
12	Nuez Pelón	Suelo	A12	negativo	negativo
13	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A16	negativo	negativo
14	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A20	negativo	Negativo
15	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A21	negativo	negativo
16	Nuez Pelón	Suelo	A22	Positivo (BLC)	negativo
17	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A23	negativo	negativo
18	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A24	negativo	negativo
19	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A25	negativo	Negativo
20	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A26	Positivo (BLC)	Negativo
21	Nuez Cáscara Sucia	Suelo	A27	Positivo (BLC)	Negativo
22	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A29	negativo	Negativo
23	Nuez Cáscara Sucia	Bodega	A45	negativo	Negativo
24	Nuez Pulpa Sucia	Bodega	A46	negativo	Negativo
25	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A51	negativo	Negativo
26	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A52	negativo	Negativo
27	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A53	Positivo (BLC)	Negativo
28	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A54	Positivo (BLC)	Negativo
29	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A57	negativo	Negativo
30	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A58	negativo	Negativo
31	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A59	negativo	Negativo
32	Nuez Pulpa Limpia	Suelo	A60	negativo	Negativo
33	Nuez Pulpa Limpia	Bodega	A67	negativo	Negativo
34	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A30	negativo	negativo
35	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A77	negativo	Negativo
36	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A78	negativo	Negativo
37	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A79	negativo	Negativo
38	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A80	negativo	Negativo

De las diferentes muestras analizadas mediante el método HPLC desarrollado para la detección de micotoxinas (OTA y AFLAs) se observaron sólo 6 muestras sobre el límite de detección (BLC

= bajo el límite de cuantificación) para OTA, y para AFLAs todas las muestras presentaron un resultado bajo el nivel de detección (negativas).

## ANEXO 5E

San Esteban 2017

N°	Muestra	Lugar	Código Muestra	Resultados [OTA]	Resultados [AFLAs]
1	Nuez Pulpa Sucia	Bodega	A36	negativo	negativo
2	Nuez Cáscara Sucia	Bodega	A37	negativo	negativo
3	Nuez Pulpa Sucia	Bodega	A38	negativo	negativo
4	Nuez Cáscara Sucia	Bodega	A39	negativo	negativo
5	Nuez Pulpa Sucia	Bodega	A40	negativo	negativo
6	Nuez Pulpa Limpia	Bodega	A32	negativo	negativo
7	Nuez Pulpa Limpia	Bodega	A33	negativo	negativo
8	Nuez Pulpa Limpia	Bodega	A34	negativo	Negativo
9	Nuez Cáscara Sucia	Bodega	A41	negativo	negativo
10	Nuez Cáscara Sucia	Bodega/Fundo San Esteban	A47	negativo	negativo
11	Nuez Pulpa Sucia	Bodega/Fundo San Esteban	A48	negativo	negativo
12	Nuez Cáscara Sucia	Bodega/Fundo San Esteban	A49	negativo	negativo
13	Nuez Pulpa Sucia	Bodega/Fundo San Esteban	A50	negativo	negativo
14	Nuez Pulpa Limpia	Bodega	A62	negativo	negativo
15	Nuez Pulpa Limpia	Bodega	A63	negativo	Negativo
16	Nuez Pulpa Limpia	Bodega	A64	negativo	Negativo
17	Nuez Pulpa Limpia	Bodega/Fundo San Esteban	A68	negativo	Negativo
18	Nuez Pulpa Limpia	Bodega/Fundo San Esteban	A69	negativo	Positivo (BLC)
19	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A81	negativo	negativo
20	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A82	negativo	negativo
21	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A83	negativo	negativo
22	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A84	negativo	negativo
23	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A85	negativo	negativo
24	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A86	negativo	negativo
25	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A87	negativo	negativo
26	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A88	negativo	negativo
27	Nuez Pulpa Sucia	Suelo	A89	negativo	negativo
28	Nuez Pulpa Limpia	Árbol	A90	negativo	negativo
29	Pelón	Árbol	A91	negativo	negativo
30	Pelón	Árbol	A92	negativo	negativo
31	Cáscara Sucia	Suelo	A93	negativo	negativo
32	Cáscara Sucia	Suelo	A94	negativo	negativo
33	Pelón	Árbol	A95	negativo	negativo
34	Cáscara Sucia	Suelo	A96	negativo	negativo
35	Cáscara Sucia	Suelo	A97	negativo	negativo

De las diferentes muestras analizadas mediante el método HPLC desarrollado para la detección de micotoxinas (OTA y AFLAs) se observó sólo 1 muestra sobre el límite de detección (BLC = bajo el límite de cuantificación) para AFLAs, y para OTA todas las muestras presentaron un resultado bajo el nivel de detección (negativas)

N°5 F AM1 RL1

Resultados del análisis toxicológico de hongos.

**Cuadro 1.** UFC de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.\* de muestras de diferentes estructuras de Nogal.

Muestra y rotulación	Fecha muestreo	Sector	Estructura procesada	UFC/g de muestra
H.A.1	01/06/2016	Lo Herrera	Hojas	Sin UFC
H.A.2	01/06/2016	Lo Herrera	Hojas	Sin UFC
H.A.1	31/05/2016	Chincolco	Hojas	2,68 x 10 <sup>3</sup>
			Cáscara	4,43 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	1,16 x 10 <sup>5</sup>
H.A.2	31/05/2016	Chincolco	Hojas	2,52 x 10 <sup>3</sup>
			Pelón	3,58 x 10 <sup>7</sup>
H.A.3	31/05/2016	Chincolco	Hojas	Sin UFC
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	3,19 x 10 <sup>6</sup>
			Semilla	9,35 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	7,43 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	5,50 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	5,50 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	4,40 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	7,15 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	4,77 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	2,20 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	6,05 x 10 <sup>4</sup>
NA-Compuesto (A1,A2)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	1,93 x 10 <sup>4</sup>
			Semilla	5,50 x 10 <sup>2</sup>
NA-Compuesto (A3,A4, A5)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	8,25 x 10 <sup>3</sup>
			Semilla	1,83 x 10 <sup>2</sup>
			Pelón	6,83 x 10 <sup>6</sup>
NB-Compuesto (B1,B2,B3)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	4,40 x 10 <sup>4</sup>
			Semilla	1,82 x 10 <sup>3</sup>
Pelón	31/05/2016	Chincolco	Pelón	3,26 x 10 <sup>7</sup>
			Cáscara	1,47 x 10 <sup>5</sup>
NA-Compuesto (A1,A2)	01/06/2016	Lo Herrera	Semilla	8,25 x 10 <sup>2</sup>
			Pelón	6,30 x 10 <sup>6</sup>
NA-Compuesto (A3,A4)	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	1,10 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	5,78 x 10 <sup>2</sup>
			Pelón	2,63 x 10 <sup>6</sup>
Hojas Árbol	09/06/2016	San Esteban	Hojas	1,05 x 10 <sup>4</sup>

Nuez pulpa *	09/06/2016	San Esteban	Semilla	$1,43 \times 10^3$
			Cáscara	$3,26 \times 10^6$
Árbol (Bolsa 1y2)	09/06/2016	San Esteban	Semilla	$2,34 \times 10^5$
			Pelón	$2,57 \times 10^7$
Suelo (Bolsa 1,2y3)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$6,60 \times 10^5$
			Semilla	$5,31 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$1,84 \times 10^3$
			Semilla	$1,10 \times 10^3$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$2,57 \times 10^2$
			Semilla	$2,75 \times 10^1$
Pelón molido	09/06/2016	San Esteban	Pelón	$3,03 \times 10^6$

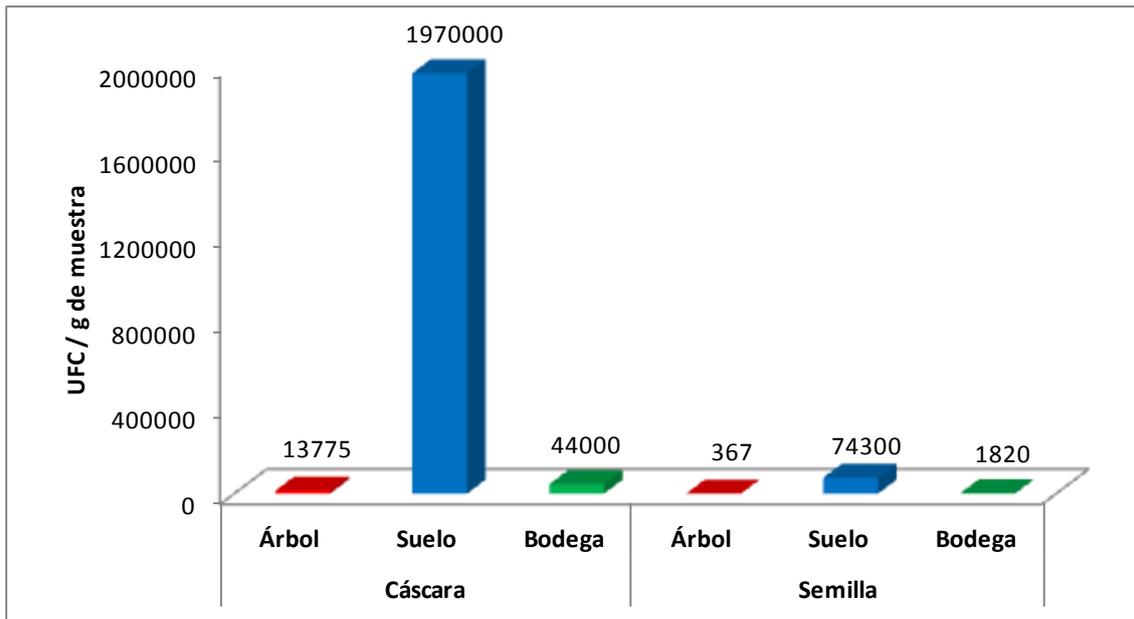
\* Solo en la semilla de la muestra "Nuez pulpa" se desarrolló *Aspergillus* sp. con  $5,50 \times 10^1$  de UFC/g de muestra.

Se realizó un análisis más detallado de los datos por **sector** (Véase Cuadros 1, 2 y 3 y Figuras 1, 2 y 3), en donde se agruparon las estructuras (cáscara y semilla) proveniente de árbol, suelo y bodega, obteniendo los siguientes resultados:

### Sector Nº1

**Cuadro 1.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
NA-Compuesto (A1,A2)	Cáscara	Árbol	$1,38 \times 10^4$
NA-Compuesto (A3,A4, A5)		Suelo	$1,97 \times 10^6$
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta (N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta		Bodega	$4,40 \times 10^4$
NA-Compuesto (A1,A2)	Semilla	Árbol	$3,67 \times 10^2$
NA-Compuesto (A3,A4, A5)		Suelo	$7,43 \times 10^4$
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta (N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta		Bodega	$1,82 \times 10^3$
NB-Compuesto (B1,B2,B3)			



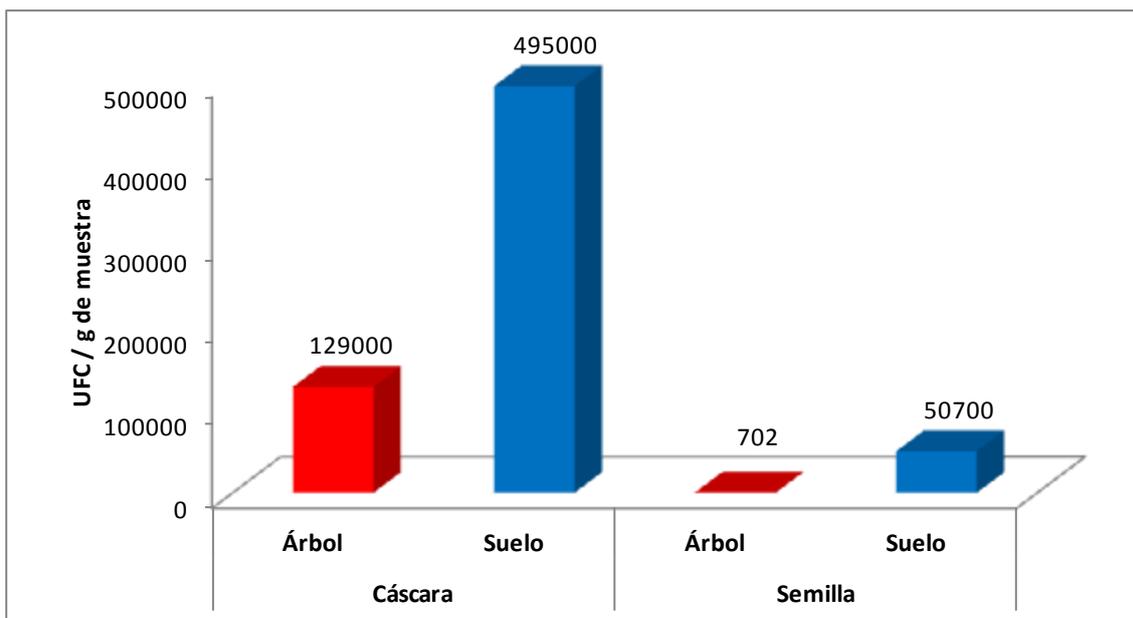
**Figura 1:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. en muestras agrupadas de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega.

Las muestras de cáscara provenientes del suelo presentan la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla, la cantidad de UFC de la primera estructura es mayor que la segunda en todas las procedencias. Tanto en las muestras de cáscara y semilla provenientes de bodega, las UFC son mayores que las que provienen desde los árboles.

## Sector Nº 2.

**Cuadro 2.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol y suelo.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
NA-Compuesto (A1,A2)	Cáscara	Árbol	$1,29 \times 10^5$
NA-Compuesto (A3,A4)			
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta			
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta	Semilla	Suelo	$4,95 \times 10^5$
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta			
NA-Compuesto (A1,A2)		Árbol	$7,02 \times 10^2$
NA-Compuesto (A3,A4)			
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	Semilla	Suelo	$5,07 \times 10^4$
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta			
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta			



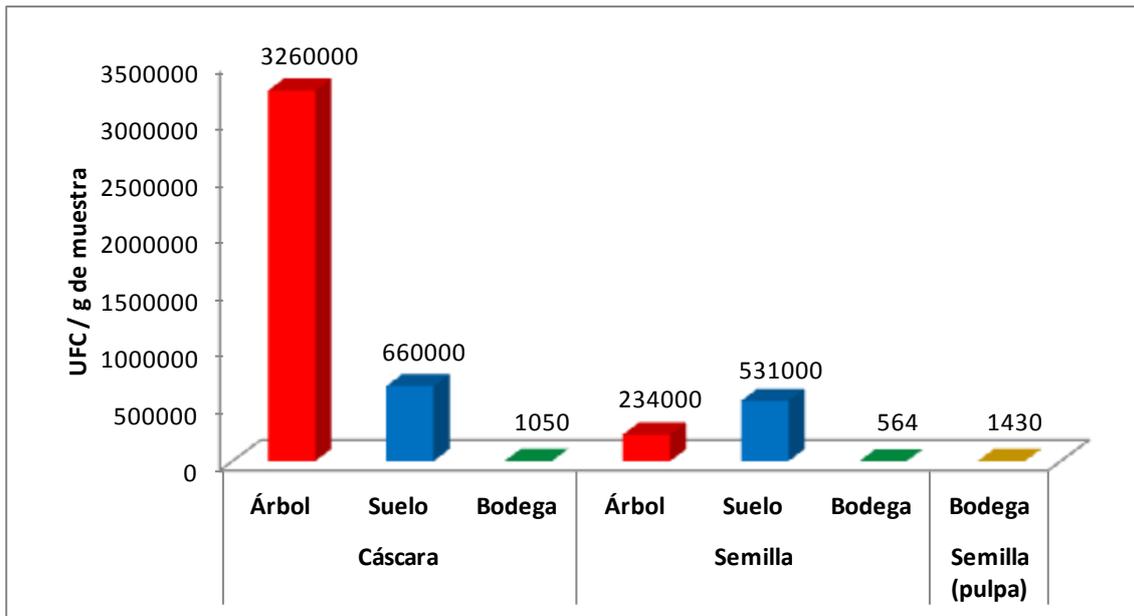
**Figura 2:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. agrupadas por muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol y suelo.

Las muestras de cáscara provenientes del suelo del sector Lo Herrera, al igual que las del sector Chicolco, presentan la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla de las dos procedencias, la cantidad de UFC en la primera estructura es mayor que en la segunda.

### Sector Nº3.

**Cuadro 3.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
Arbol (Bolsa 1y2)	Cáscara	Árbol	$3,26 \times 10^6$
Suelo (Bolsa 1,2y3)		Suelo	$6,60 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)		Bodega	$1,05 \times 10^3$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)			
Arbol (Bolsa 1y2)	Semilla	Árbol	$2,34 \times 10^5$
Suelo (Bolsa 1,2y3)		Suelo	$5,31 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)		Bodega	$5,64 \times 10^2$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)			
Nuez pulpa	Semilla (pulpa)	Bodega	$1,43 \times 10^3$



**Figura 3:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. agrupadas por muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega (sector San Esteban).

En el sector San Esteban se contó con una muestra de Semilla (pulpa), es decir, semilla sin cáscara, la cual provino directamente de una muestra de bodega y no del fruto (cáscara + semilla) como en todas las otras muestras de semilla, de éste y de los diferentes sectores (Chincolco y Lo Herrera).

Las muestras de cáscara provenientes de los árboles presentaron la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla de todas las procedencias, al igual que en los sectores Chincolco y Lo Herrera, la cantidad de UFC en las muestras de cáscara fue mayor que en las semillas. A diferencia del sector Chincolco, tanto en las muestras de cáscara y semilla provenientes de bodega, las UFC son menores que las que provienen desde los árboles. Estas muestras fueron recolectadas en un período donde estuvieron expuestas a una mayor humedad ambiental y temperatura lo que favoreció el desarrollo de los hongos.

Si se observan las muestras de semilla “con cáscara” y las de semilla “sin cáscara”, ambas obtenidas de bodega, la cantidad de UFC es mayor en las semillas “sin cáscara” que en las que la poseen.

## CONCLUSIONES

1. La cantidad de UFC de las muestras de cáscara es mayor que en las semillas en todas las aquellas de la misma procedencia y sector.
2. Se observó en general una mayor cantidad de UFC / g de muestra en estructuras (cáscara y semilla) de frutos provenientes del suelo que de los árboles.
3. Solo se determinó presencia de *Aspergillus* sp. en una muestra de semilla (Nuez pulpa) del sector San Esteban.

De las muestras estudiadas para la producción de micotoxinas, las especies de *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* y *Aspergillus tubingensis* resultaron

positivas para Ocratoxina A (OTA). La cepa de *Penicillium brevicompactum* fue positiva para Aflatoxina B2 (AFLA/B2).

**Análisis de riesgo en el manejo del cultivo:** Los antecedentes arriba indicados fueron considerados para la determinación de los puntos críticos de la contaminación de los productos del nogal con las micotoxinas en estudio.

En consecuencia, las nueces cosechadas desde el suelo están expuestas a la contaminación potencial de hongos provenientes de este sustrato. De esta manera, hemos determinado que el suelo es el punto crítico de mayor importancia en la contaminación de las nueces con micotoxinas.

La cosecha de nueces debe hacerse en forma oportuna, expedita y rápida, para mantener la calidad y la sanidad del producto. Esto obliga a tomar medidas de diversa índole, tanto en el huerto como en los lugares de procesado y acopio

Una cosecha expedita permite que toda la nuez cosechada se despelone y seque en el menor tiempo posible. El mantener un tiempo prolongado de humedad, en condiciones de temperaturas de 20 a 25 °C favorecería el crecimiento de hongos potencialmente tóxicos.

El productor debiera tener presente que la quebradura del pelón ocurre en la nuez hidratada, donde se rompe el pericarpio/mesocarpio del fruto. El polvo proveniente de los suelos del campo de cultivo contamina los frutos que en estas condiciones entregan la humedad y temperatura adecuadas para el desarrollo de los hongos micotóxicos

El momento de la cosecha es crítico, porque se enfrentan dos corrientes: Quienes cosechan lo antes posible para maximizar la calidad, evitar la presencia de hongos y comenzar lo antes posible con el proceso de pos cosecha de la nuez, los cuales deben utilizar más horas de despelonado y de secado del producto, comparados con aquellos que postergan la labor para tener menos nueces con pelón adherido y remover menos humedad en forma artificial, a riesgo de deteriorar la calidad y la sanidad.

Para tomar una decisión adecuada se debe tener presente el tipo de nuez (Chandler se adapta mejor que Serrí a una cosecha más tardía) y las condiciones climática georreferenciadas.

Una adecuada labor de cosecha, en consecuencia, sólo se puede llevar a cabo en buenas condiciones si el predio cuenta con un sistema remecedor, que permita la rápida remoción de los frutos desde el árbol, una despelonadora que permita una rápida eliminación de pelón o de restos de pelón, y un secador que lleve a la estabilización de la humedad y, por ende, de la calidad final del producto. Si bien la cosecha se puede hacer golpeando el follaje con varas, remeciendo la planta o esperando la caída espontánea de la fruta, se debe cautelar el lavado de los frutos para evitar la contaminación de hongos provenientes del suelo.

Se espera obtener más antecedentes del análisis toxicológico de las muestras obtenidas en otras regiones del país.

Resultados del análisis toxicológico de hongos.

**Cuadro 1.** UFC de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.\* de muestras de diferentes estructuras de Nogal.

Muestra y rotulación	Fecha muestreo	Sector	Estructura procesada	UFC/g de muestra
H.A.1	01/06/2016	Lo Herrera	Hojas	Sin UFC
H.A.2	01/06/2016	Lo Herrera	Hojas	Sin UFC
H.A.1	31/05/2016	Chincolco	Hojas	2,68 x 10 <sup>3</sup>
			Cáscara	4,43 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	1,16 x 10 <sup>5</sup>
H.A.2	31/05/2016	Chincolco	Hojas	2,52 x 10 <sup>3</sup>
			Pelón	3,58 x 10 <sup>7</sup>
H.A.3	31/05/2016	Chincolco	Hojas	Sin UFC
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	3,19 x 10 <sup>6</sup>
			Semilla	9,35 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	7,43 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	5,50 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	5,50 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	4,40 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	7,15 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	4,77 x 10 <sup>4</sup>
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	2,20 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	6,05 x 10 <sup>4</sup>
NA-Compuesto (A1,A2)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	1,93 x 10 <sup>4</sup>
			Semilla	5,50 x 10 <sup>2</sup>
NA-Compuesto (A3,A4, A5)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	8,25 x 10 <sup>3</sup>
			Semilla	1,83 x 10 <sup>2</sup>
			Pelón	6,83 x 10 <sup>6</sup>
NB-Compuesto (B1,B2,B3)	31/05/2016	Chincolco	Cáscara	4,40 x 10 <sup>4</sup>
			Semilla	1,82 x 10 <sup>3</sup>
Pelón	31/05/2016	Chincolco	Pelón	3,26 x 10 <sup>7</sup>
			Cáscara	1,47 x 10 <sup>5</sup>
NA-Compuesto (A1,A2)	01/06/2016	Lo Herrera	Semilla	8,25 x 10 <sup>2</sup>
			Pelón	6,30 x 10 <sup>6</sup>
NA-Compuesto (A3,A4)	01/06/2016	Lo Herrera	Cáscara	1,10 x 10 <sup>5</sup>
			Semilla	5,78 x 10 <sup>2</sup>
Hojas Árbol	09/06/2016	San Esteban	Pelón	2,63 x 10 <sup>6</sup>
			Hojas	1,05 x 10 <sup>4</sup>

Nuez pulpa *	09/06/2016	San Esteban	Semilla	$1,43 \times 10^3$
			Cáscara	$3,26 \times 10^6$
Árbol (Bolsa 1y2)	09/06/2016	San Esteban	Semilla	$2,34 \times 10^5$
			Pelón	$2,57 \times 10^7$
Suelo (Bolsa 1,2y3)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$6,60 \times 10^5$
			Semilla	$5,31 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$1,84 \times 10^3$
			Semilla	$1,10 \times 10^3$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)	09/06/2016	San Esteban	Cáscara	$2,57 \times 10^2$
			Semilla	$2,75 \times 10^1$
Pelón molido	09/06/2016	San Esteban	Pelón	$3,03 \times 10^6$

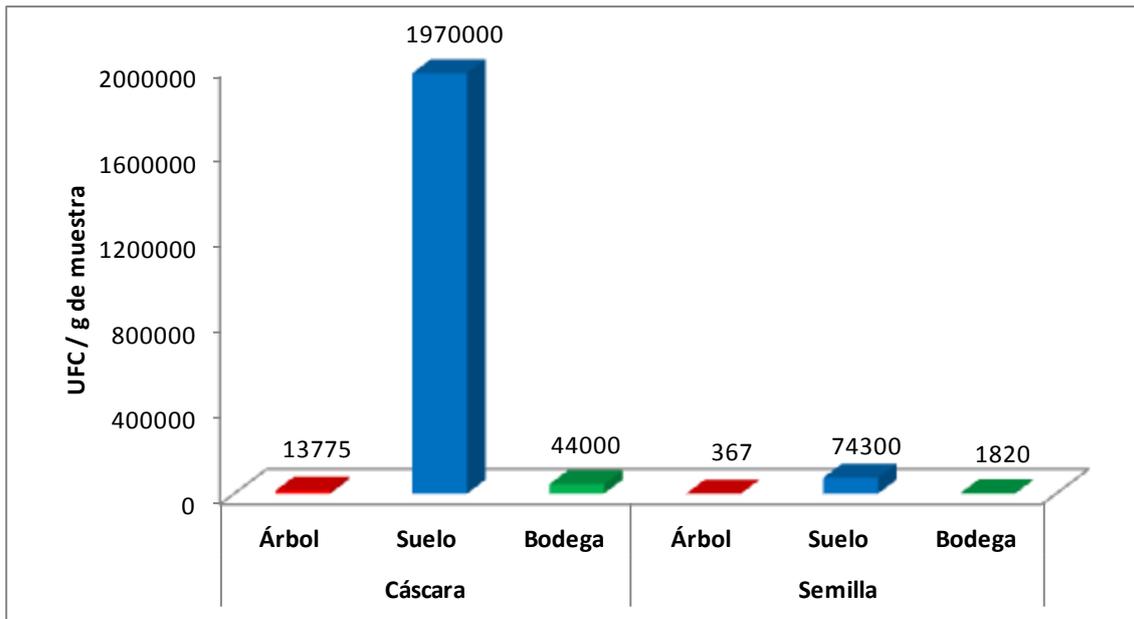
\* Solo en la semilla de la muestra "Nuez pulpa" se desarrolló *Aspergillus* sp. con  $5,50 \times 10^1$  de UFC/g de muestra.

Se realizó un análisis más detallado de los datos por **sector** (Véase Cuadros 1, 2 y 3 y Figuras 1, 2 y 3), en donde se agruparon las estructuras (cáscara y semilla) proveniente de árbol, suelo y bodega, obteniendo los siguientes resultados:

### Sector N°1

**Cuadro 1.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
NA-Compuesto (A1,A2)	Cáscara	Árbol	$1,38 \times 10^4$
NA-Compuesto (A3,A4, A5)		Suelo	$1,97 \times 10^6$
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta (N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta		Bodega	$4,40 \times 10^4$
NA-Compuesto (A1,A2)	Semilla	Árbol	$3,67 \times 10^2$
NA-Compuesto (A3,A4, A5)		Suelo	$7,43 \times 10^4$
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta (N.S.4 + N.S.5) Muestra compuesta		Bodega	$1,82 \times 10^3$
NB-Compuesto (B1,B2,B3)			



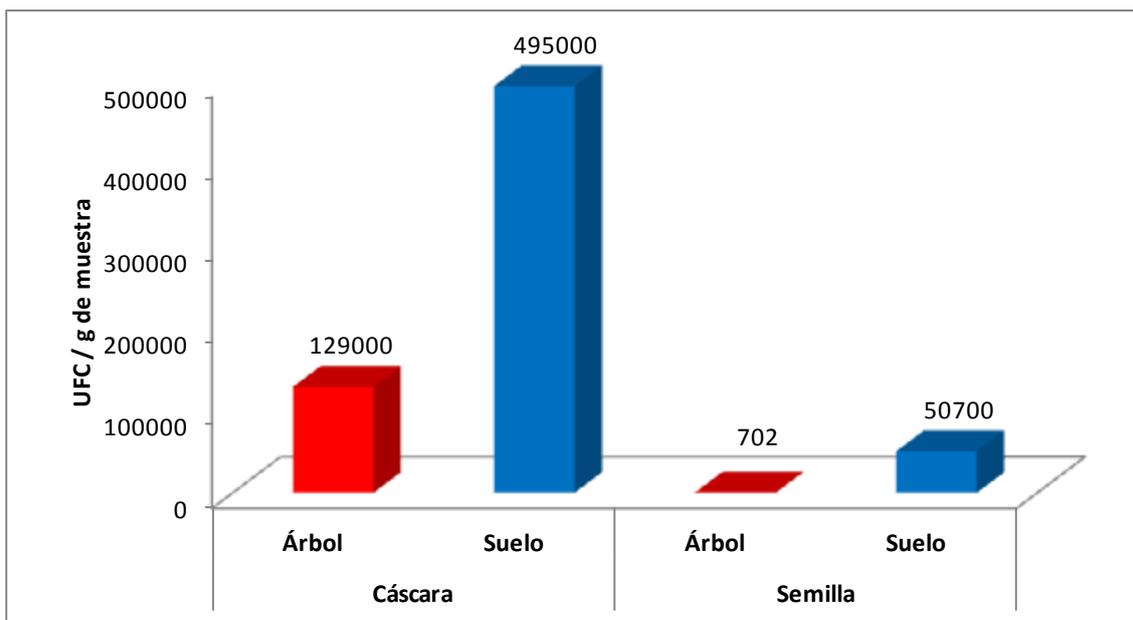
**Figura 1:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. en muestras agrupadas de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega.

Las muestras de cáscara provenientes del suelo presentan la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla, la cantidad de UFC de la primera estructura es mayor que la segunda en todas las procedencias. Tanto en las muestras de cáscara y semilla provenientes de bodega, las UFC son mayores que las que provienen desde los árboles.

## Sector Nº 2.

**Cuadro 2.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol y suelo.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
NA-Compuesto (A1,A2)	Cáscara	Árbol	$1,29 \times 10^5$
NA-Compuesto (A3,A4)			
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta			
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta	Semilla	Suelo	$4,95 \times 10^5$
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta			
NA-Compuesto (A1,A2)		Árbol	$7,02 \times 10^2$
NA-Compuesto (A3,A4)			
(N.S.1 + N.S.2 + N.S.3) Muestra compuesta	Semilla	Suelo	$5,07 \times 10^4$
(N.S.4 + N.S.5 + N.S.6) Muestra compuesta			
(N.S.7 + N.S.8 + N.S.9) Muestra compuesta			



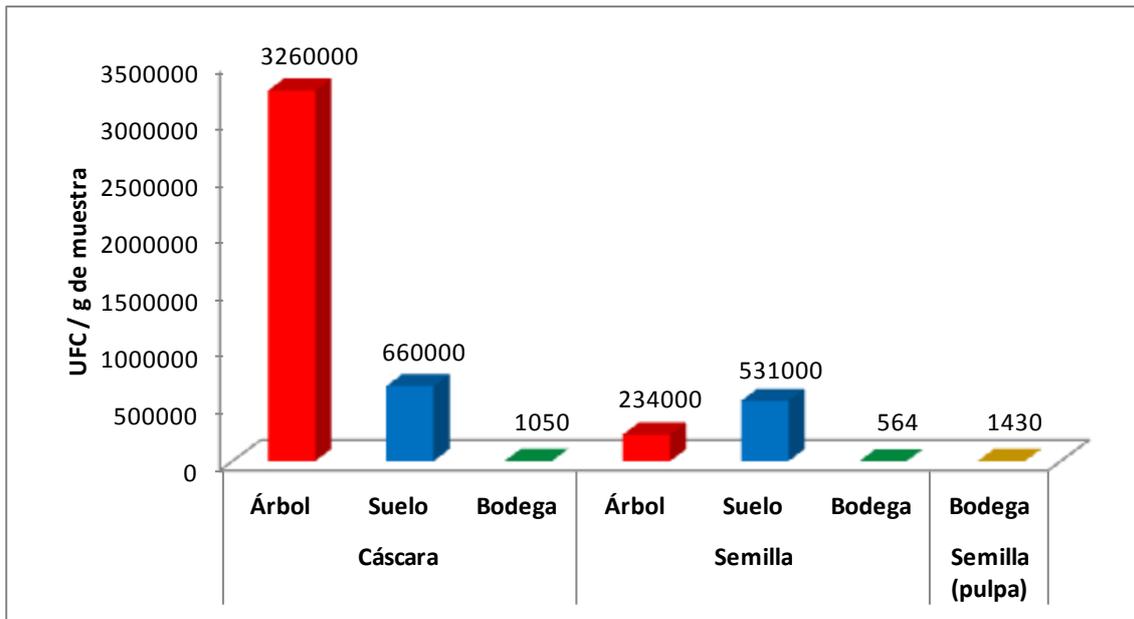
**Figura 2:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. agrupadas por muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol y suelo.

Las muestras de cáscara provenientes del suelo del sector Lo Herrera, al igual que las del sector Chicolco, presentan la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla de las dos procedencias, la cantidad de UFC en la primera estructura es mayor que en la segunda.

### Sector Nº3.

**Cuadro 3.** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. de muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega.

Muestras y rotulación	Estructura procesada	Procedencia	Promedio de UFC/g de muestra
Arbol (Bolsa 1y2)	Cáscara	Árbol	$3,26 \times 10^6$
Suelo (Bolsa 1,2y3)		Suelo	$6,60 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)		Bodega	$1,05 \times 10^3$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)			
Arbol (Bolsa 1y2)	Semilla	Árbol	$2,34 \times 10^5$
Suelo (Bolsa 1,2y3)		Suelo	$5,31 \times 10^5$
Nuez Bodega (Bolsa 4,5y6)		Bodega	$5,64 \times 10^2$
Nuez Bodega (Bolsa 7y8)			
Nuez pulpa	Semilla (pulpa)	Bodega	$1,43 \times 10^3$



**Figura 3:** Promedio de las UFC de *Penicillium* sp. agrupadas por muestras de cáscara y semilla, proveniente de árbol, suelo y bodega (sector San Esteban).

En el sector San Esteban se contó con una muestra de Semilla (pulpa), es decir, semilla sin cáscara, la cual provino directamente de una muestra de bodega y no del fruto (cáscara + semilla) como en todas las otras muestras de semilla, de éste y de los diferentes sectores (Chincolco y Lo Herrera).

Las muestras de cáscara provenientes de los árboles presentaron la mayor cantidad de UFC. Al realizar una comparación entre las muestras de cáscara y semilla de todas las procedencias, al igual que en los sectores Chincolco y Lo Herrera, la cantidad de UFC en las muestras de cáscara fue mayor que en las semillas. A diferencia del sector Chincolco, tanto en las muestras de cáscara y semilla provenientes de bodega, las UFC son menores que las que provienen desde los árboles. Estas muestras fueron recolectadas en un período donde estuvieron expuestas a una mayor humedad ambiental y temperatura lo que favoreció el desarrollo de los hongos.

Si se observan las muestras de semilla “con cáscara” y las de semilla “sin cáscara”, ambas obtenidas de bodega, la cantidad de UFC es mayor en las semillas “sin cáscara” que en las que la poseen.

## CONCLUSIONES

1. La cantidad de UFC de las muestras de cáscara es mayor que en las semillas en todas las aquellas de la misma procedencia y sector.
2. Se observó en general una mayor cantidad de UFC / g de muestra en estructuras (cáscara y semilla) de frutos provenientes del suelo que de los árboles.
3. Solo se determinó presencia de *Aspergillus* sp. en una muestra de semilla (Nuez pulpa) del sector San Esteban.

De las muestras estudiadas para la producción de micotoxinas, las especies de *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* y *Aspergillus tubingensis* resultaron

positivas para Ocratoxina A (OTA). La cepa de *Penicillium brevicompactum* fue positiva para Aflatoxina B2 (AFLA/B2).

**Análisis de riesgo en el manejo del cultivo:** Los antecedentes arriba indicados fueron considerados para la determinación de los puntos críticos de la contaminación de los productos del nogal con las micotoxinas en estudio.

En consecuencia, las nueces cosechadas desde el suelo están expuestas a la contaminación potencial de hongos provenientes de este sustrato. De esta manera, hemos determinado que el suelo es el punto crítico de mayor importancia en la contaminación de las nueces con micotoxinas.

La cosecha de nueces debe hacerse en forma oportuna, expedita y rápida, para mantener la calidad y la sanidad del producto. Esto obliga a tomar medidas de diversa índole, tanto en el huerto como en los lugares de procesado y acopio

Una cosecha expedita permite que toda la nuez cosechada se despelone y seque en el menor tiempo posible. El mantener un tiempo prolongado de humedad, en condiciones de temperaturas de 20 a 25 °C favorecería el crecimiento de hongos potencialmente tóxicos.

El productor debiera tener presente que la quebradura del pelón ocurre en la nuez hidratada, donde se rompe el pericarpio/mesocarpio del fruto. El polvo proveniente de los suelos del campo de cultivo contamina los frutos que en estas condiciones entregan la humedad y temperatura adecuadas para el desarrollo de los hongos micotóxicos

El momento de la cosecha es crítico, porque se enfrentan dos corrientes: Quienes cosechan lo antes posible para maximizar la calidad, evitar la presencia de hongos y comenzar lo antes posible con el proceso de pos cosecha de la nuez, los cuales deben utilizar mas horas de despelonado y de secado del producto, comparados con aquellos que postergan la labor para tener menos nueces con pelón adherido y remover menos humedad en forma artificial, a riesgo de deteriorar la calidad y la sanidad.

Para tomar una decisión adecuada se debe tener presente el tipo de nuez (Chandler se adapta mejor que Serrí a una cosecha más tardía) y las condiciones climática georreferenciadas.

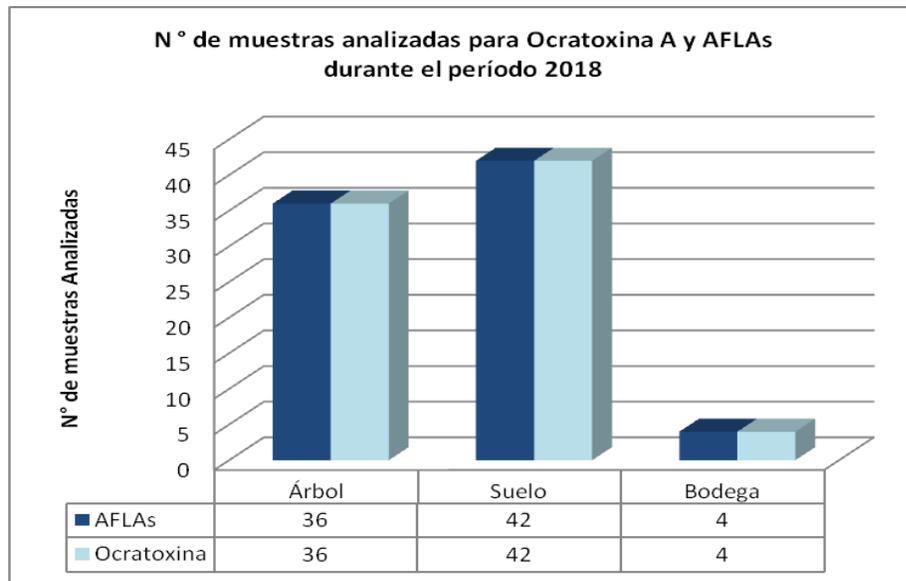
Una adecuada labor de cosecha, en consecuencia, sólo se puede llevar a cabo en buenas condiciones si el predio cuenta con un sistema remecedor, que permita la rápida remoción de los frutos desde el árbol, una despelonadora que permita una rápida eliminación de pelón o de restos de pelón, y un secador que lleve a la estabilización de la humedad y, por ende, de la calidad final del producto. Si bien la cosecha se puede hacer golpeando el follaje con varas, remeciendo la planta o esperando la caída espontánea de la fruta, se debe cautelar el lavado de los frutos para evitar la contaminación de hongos provenientes del suelo.

Se espera obtener más antecedentes del análisis toxicológico de las muestras obtenidas en otras regiones del país.

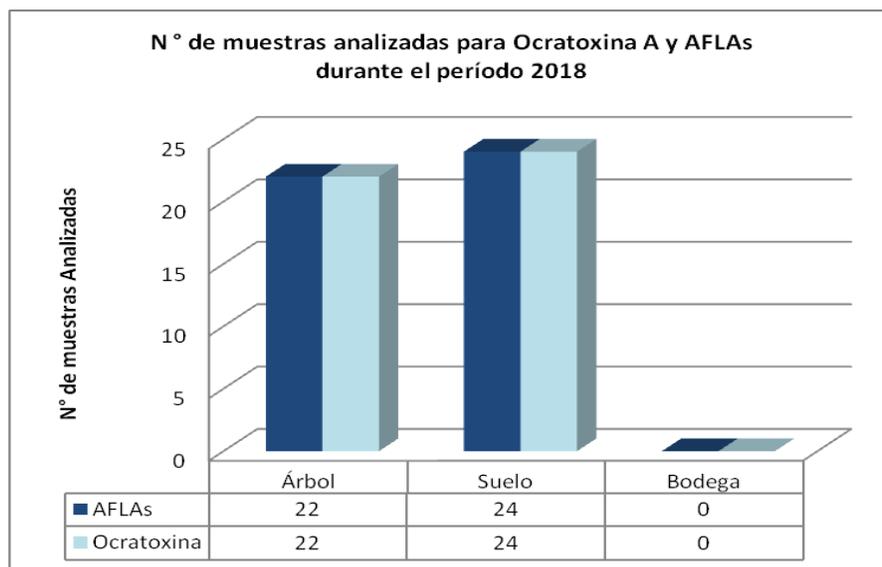
## Número de muestras recolectadas en huerto

Período 2018

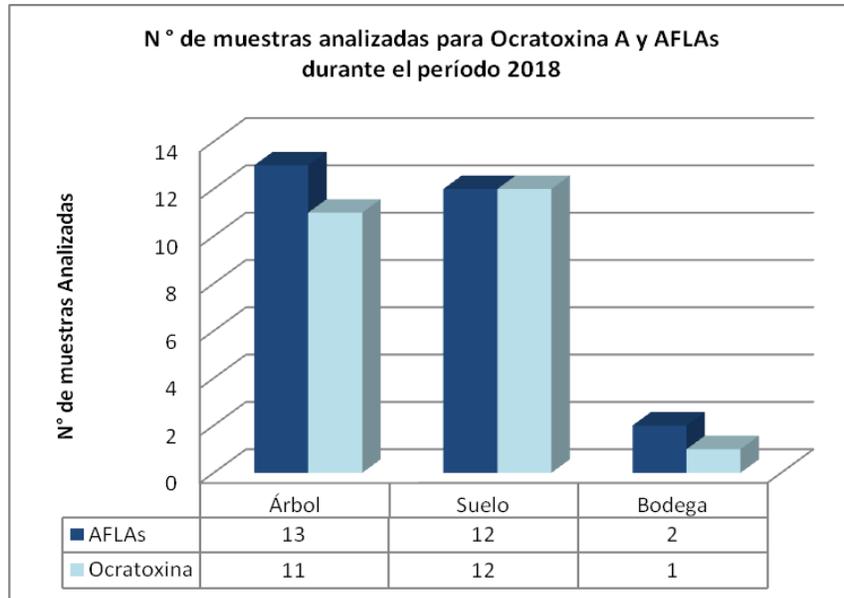
### 1. San Esteban



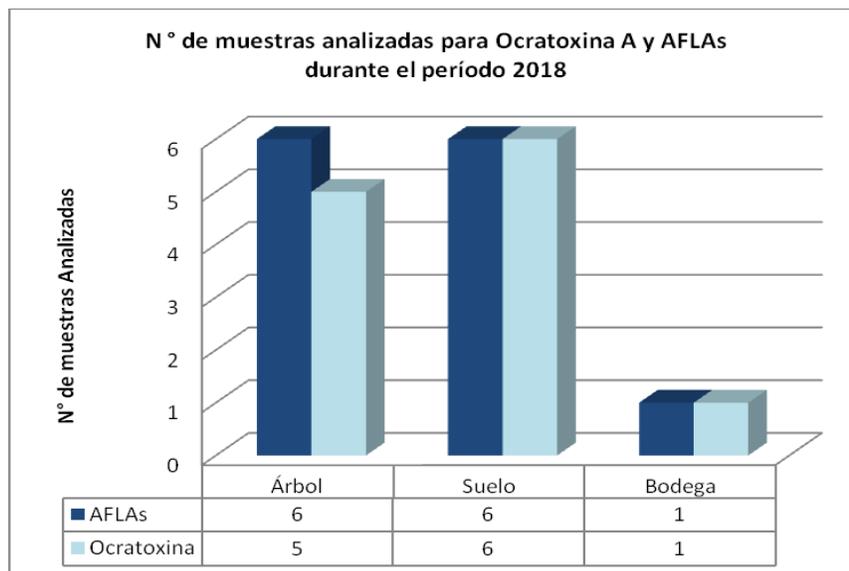
### 2. San Bernardo



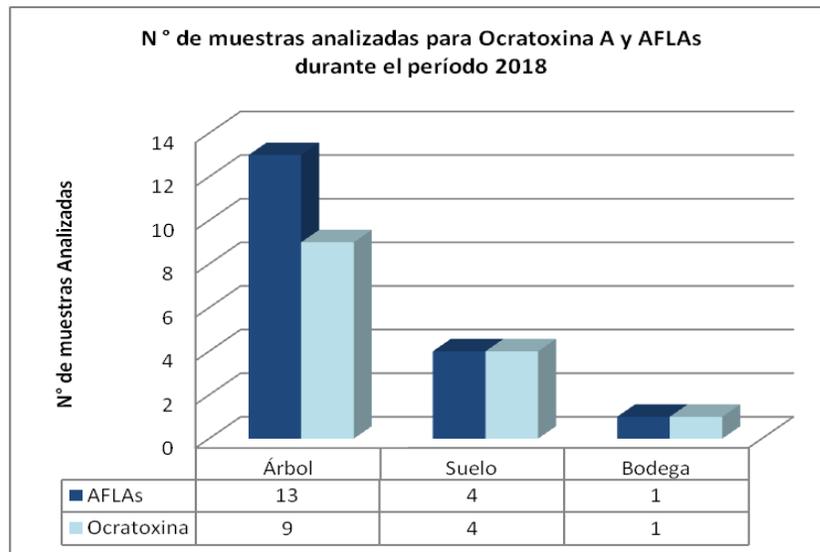
### 3. Mulchen



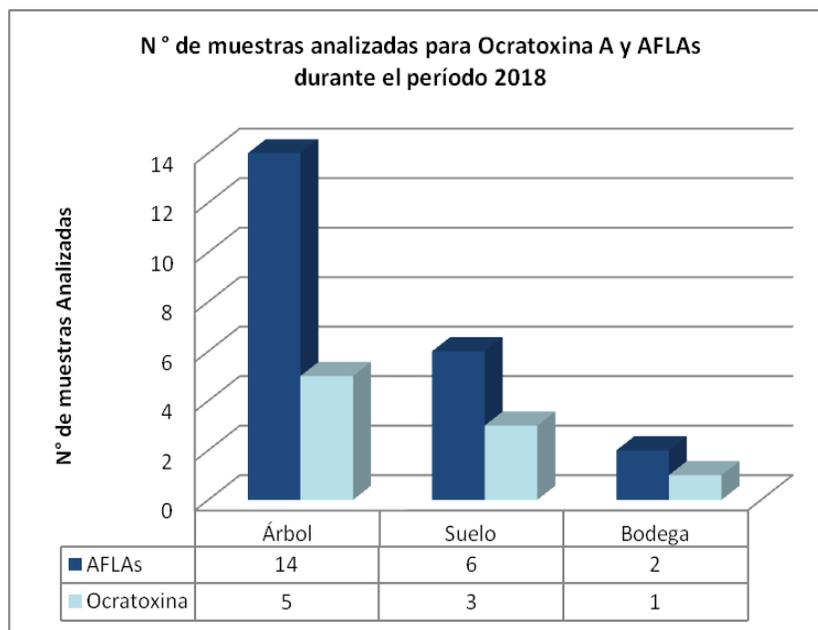
### 4. Longaví 1



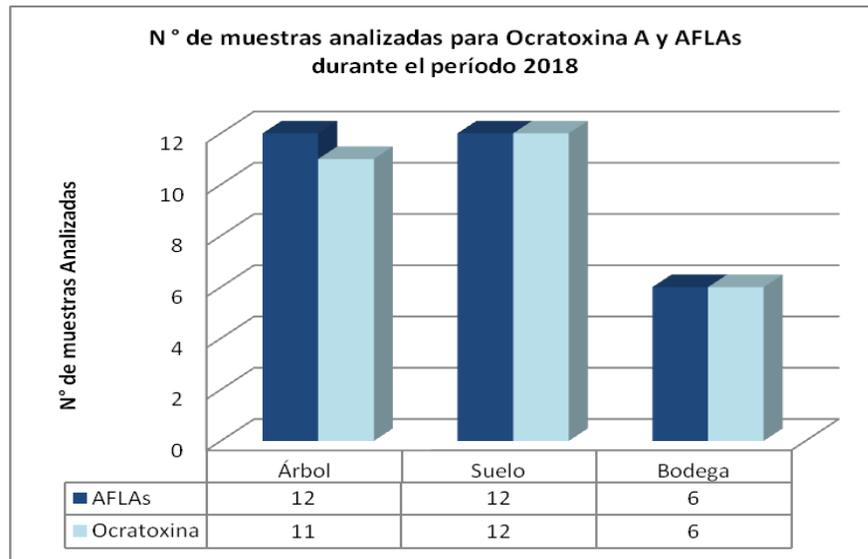
5. Angol



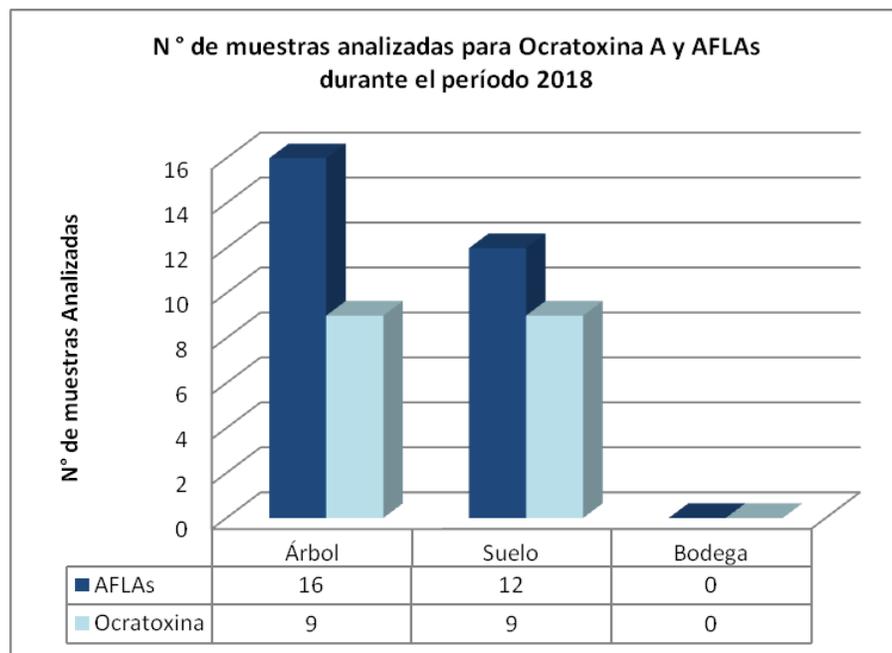
6. Illapel



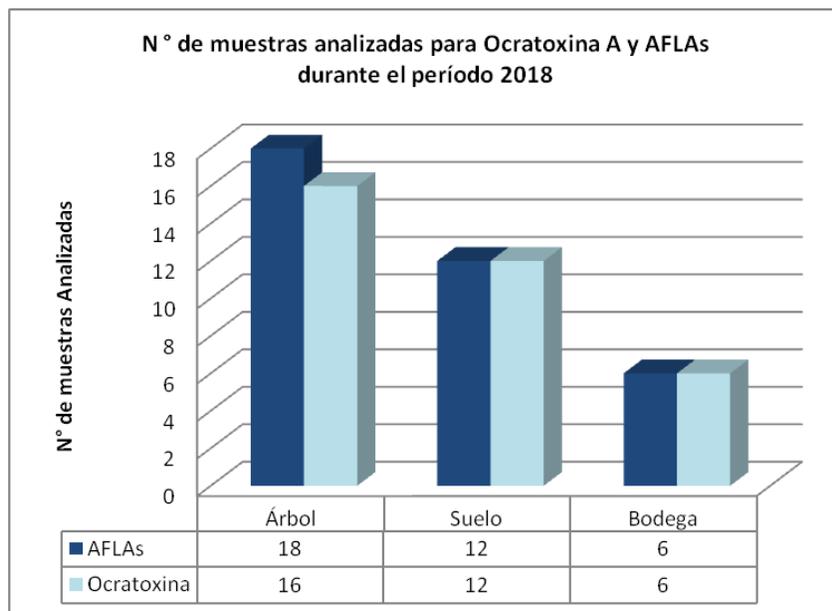
## 7. Los Ángeles



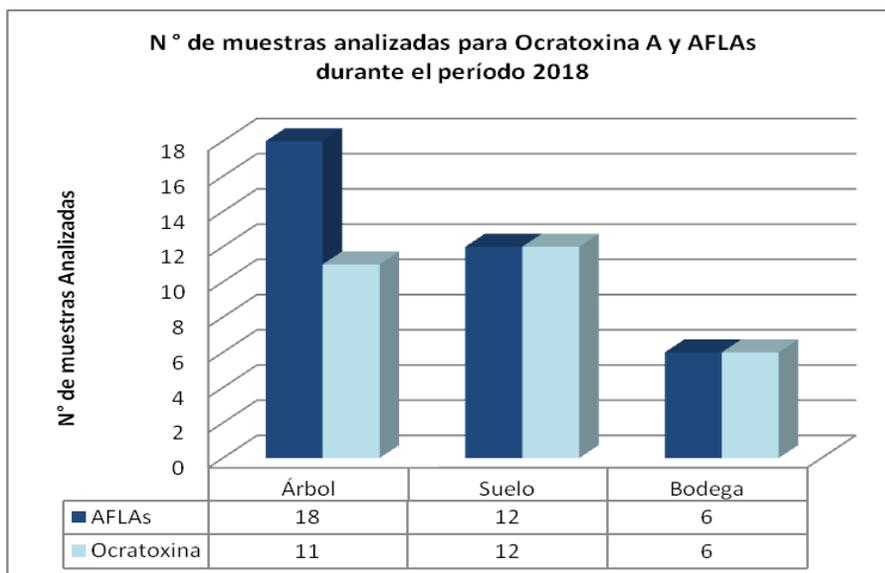
## 8. Linares



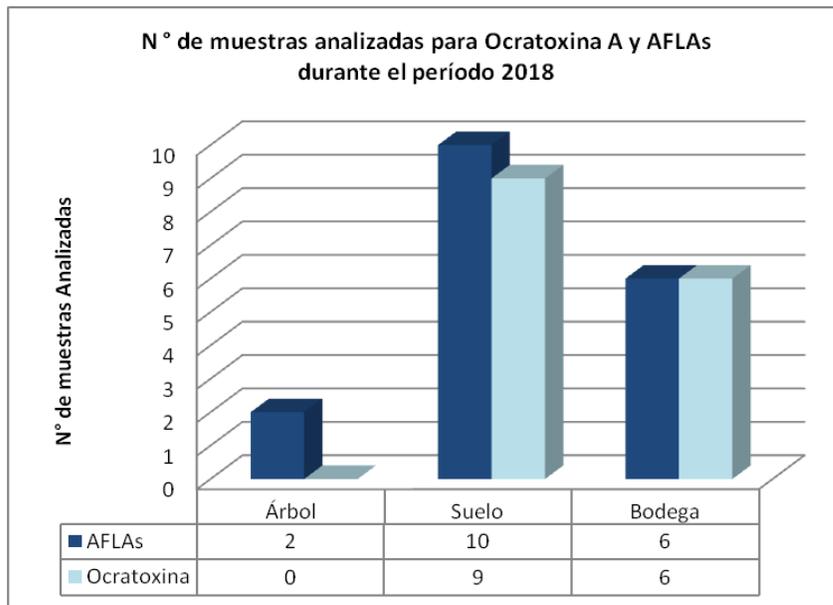
## 9. Mostazal



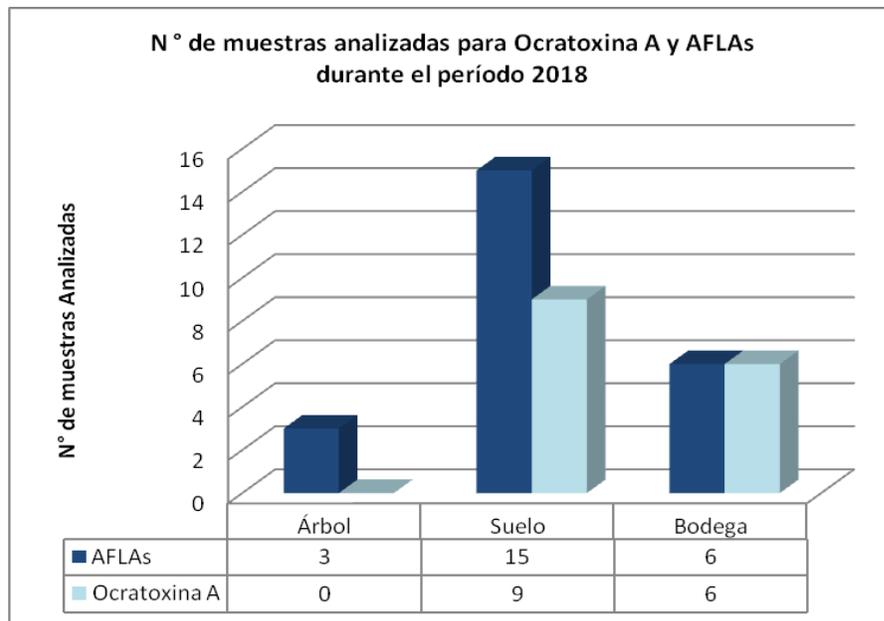
## 10. Requínoa



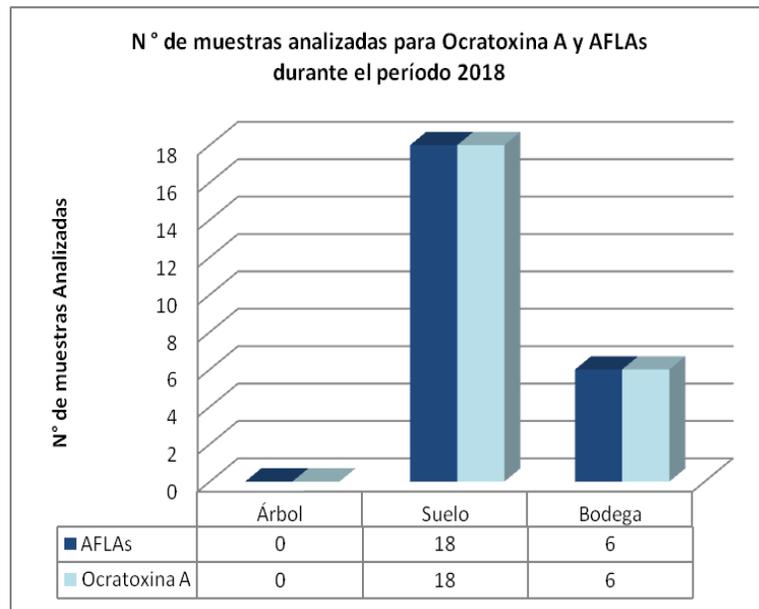
## 11. Longaví 2



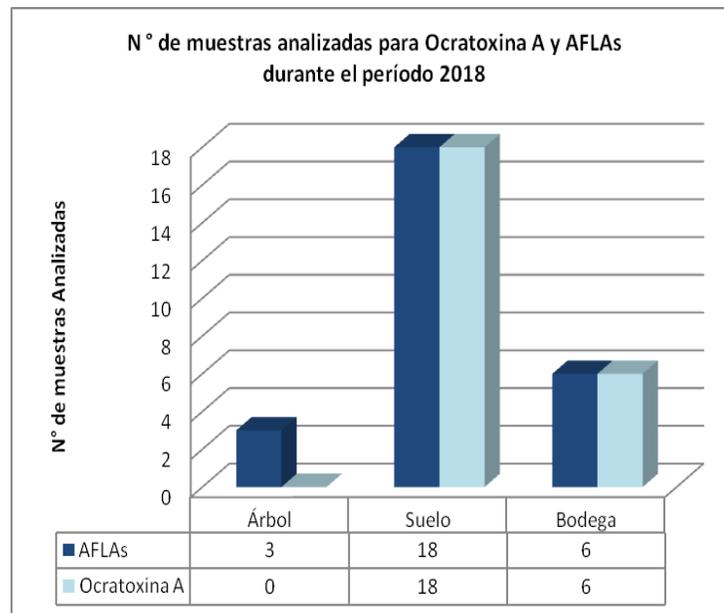
## 12. Pelequén



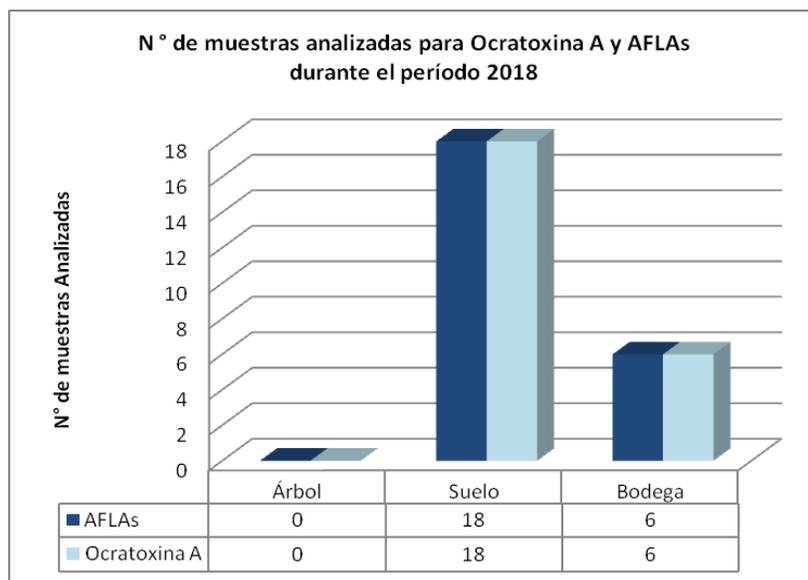
### 13. Pirque



### 14. Melipilla

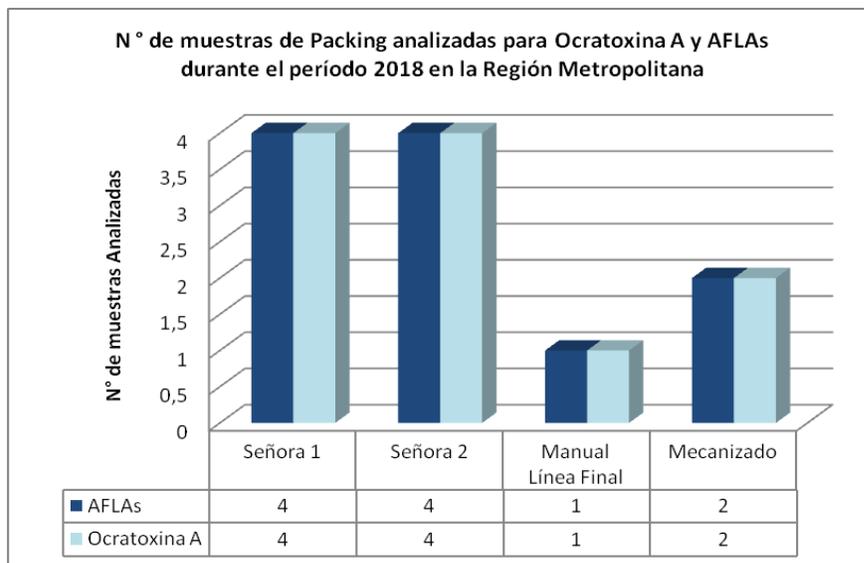


**15. María Pinto**

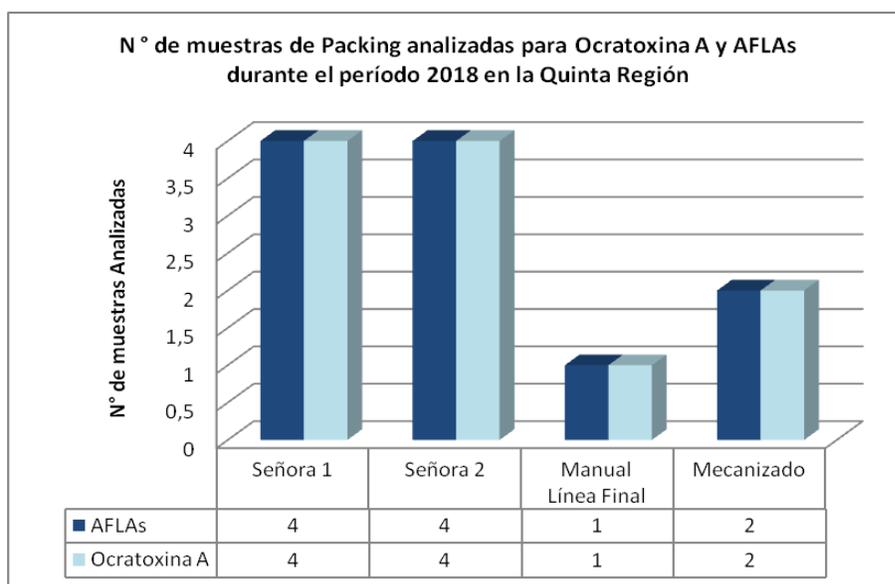


**16. Número de muestras recolectadas en packing, Región Metropolitana y Región de Valparaíso**

**A) Región Metropolitana**



**B) Región de Valparaíso**



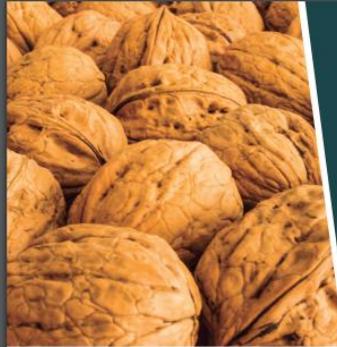
## **Conclusión**

Se han analizado mediante el método HPLC, las muestras provenientes de huertos de los sectores de Illapel, San Esteban, San Bernardo, Pirque, Melipilla, María Pinto, San Francisco de Mostazal, Requínoa, Pelequén, Linares, Longaví, Los Ángeles, Mulchén y Angol, y de packing de la Región de Valparaíso y Región Metropolitana. Las muestras fueron recolectadas en 3 etapas de la línea de producción: huerto (árbol y suelo), bodega y packing, de las cuales se analizaron las distintas partes del fruto (semilla, cáscara y pelón)

Es importante destacar que, todas las muestras analizadas a la fecha han mostrado un resultado negativo (bajo el nivel de detección) en cuanto a la identificación de las Micotoxinas en estudio. Las muestras de nueces recogidas del suelo han sido analizadas en triplicado para corroborar su negatividad en consideración que las muestras recogidas del suelo constituyen un posible punto de riesgo de la contaminación con micotoxinas.

Considerando la importancia que tendría para los fines del Proyecto y dada la posibilidad de largos periodos de almacenaje, considerando cambios de humedad y temperatura, factores que podrían permitir el desarrollo hongos productores de micotoxinas en las nueces, se realizó un estudio de prospección, repitiendo el análisis de algunas muestras almacenadas en el Laboratorio. Todos estos análisis resultaron negativos.

**Todas las muestras analizadas a la fecha son negativas para la identificación de Aflatoxinas y Ocratoxina A.**



Protocolo de  
Buenas Prácticas  
de Manufacturación  
en la Producción  
de Nueces en Centros  
Nacionales



## Anexo N° 9. Checklist Implementación del Programa

<b>INSTALACIONES</b>		
Parámetros	Puntaje	Obs.
Pisos impermeables, no absorbentes, lavables, antideslizantes y atóxicos, sin grietas y fáciles de limpiar (RSA Art.25)		
Paredes impermeables, no absorbentes, lavables y atóxicos y de color claro, lisas y sin grietas, fáciles de limpiar y desinfectar (RSA Art.25)		
Todas las demás estructuras auxiliares están situadas de manera que no son causa de contaminación y en buen estado de conservación (RSA Art.25)		
Superficies en contacto con el alimento no ceden sustancias tóxicas o contaminantes. Sólidas, duraderas y fáciles de limpiar, mantener y desinfectar, hechas de material liso, no absorbente y no tóxico, e inerte a los alimentos, los detergentes y los desinfectantes utilizados en condiciones de trabajo normales (RSA Art.25)		
Los sistemas de evacuación de aguas residuales se encuentran en buen estado de funcionamiento (RSA Art.31)		
Acredita registros de las mantenciones preventivas de las instalaciones, equipos y utensilios (RSA Art. 69, 38,25)		
Abastecimiento de agua potable a presión y temperatura conveniente con instalaciones apropiadas para su almacenamiento, distribución y protección contra la contaminación (RSA Art. 27)		
Ventilación que evite el calor excesivo, condensación y acumulación de polvo y elimine el aire contaminado. La corriente de aire no deberá desplazarse de una zona sucia a una zona limpia. Las aberturas de ventilación provistas de rejillas u otras protecciones de material anticorrosivo y de fácil retiro para su limpieza (RSA Art. 35)		
No se almacena en la zona de manipulación de alimentos ninguna sustancia que pueda contaminar los alimentos ni se deposita ropas u objetos personales (RSA Art. 51)		
Se toman precauciones adecuadas para que los desechos no se utilicen ni evacuen de manera que puedan constituir, a través de los alimentos, un riesgo para la salud. Desechos retirados de zonas de manipulación y otras zonas de trabajo, cuantas veces sea necesario y por lo menos una vez al día. (RSA Art. 17, 39)		
<b>LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN</b>		
Parámetro	Puntaje	Obs.
Existen planes de limpieza y desinfección documentados (indicando frecuencia, responsable, insumo de limpieza utilizado, herramientas utilizadas para llevar a cabo el proceso) POES (RSA Art. 41)		
Uso de sustancias de limpieza y sanitización apropiados y asegurando la eliminación de residuos (RSA Art. 43)		
POES para limpieza y sanitización de áreas de producción luego de la jornada (pisos, desagües, pasillos, paredes, estructuras auxiliares) (RSA Art. 44)		
<b>HIGIENE DEL PERSONAL</b>		
Parámetro	Puntaje	Obs

Personal asea sus manos antes de comenzar sus labores y cada vez después de ir al baño o manipular materia potencialmente contaminada (RSA Art. 55)		
Manipuladores mantiene limpieza personal llevando ropa protectora (cofia o gorro, y delantal). No usan objetos de adorno en las manos y mantiene las uñas de las manos cortas, limpias y sin barniz (RSA Art. 56)		
Se toman medidas que eviten que el personal que padece una ETA o tenga heridas infectadas, infecciones cutáneas, llagas o diarrea, trabaje en las zonas de manipulación (RSA Art. 53)		
<b>CAPACITACIÓN</b>		
Parámetro	Puntaje	Obs.
Instrucción adecuada y continua en manipulación higiénica de alimentos e higiene personal (RSA Art. 52)		
Todo el personal de aseo deberá estar capacitado en técnicas de limpieza (RSA Art. 41)		
<b>MATERIAS PRIMAS</b>		
Parámetro	Puntaje	Obs
Materias primas e ingredientes en buen estado de conservación, debidamente identificados, exentos de microorganismos o sustancias tóxicas en cantidades superiores a las aceptadas en la legislación u otras materias extrañas (RSA Art. 61)		
Especificaciones documentadas de materias primas y envases (NCh 3235)		
<b>PROCESOS Y PRODUCTOS TERMINADOS</b>		
Parámetro	Puntaje	Obs
Flujo del personal, vehículos y materias primas en las distintas etapas del proceso, ordenado y conocido, para evitar contaminación cruzada (RSA Art. 63)		
Registros de producción, distribución y control de los alimentos y conservados 90 días posteriores a la fecha de vencimiento o plazo de duración del producto (RSA Art. 66)		
Productos terminados almacenados y transportados en condiciones adecuadas de temperatura y humedad (RSA Art. 67)		
Procedimientos de laboratorio en el control de calidad, ajustados a métodos normalizados y reconocidos por organismos oficiales nacionales e internacionales (RSA Art. 70)		
<b>EXTERIORES</b>		
Parámetros	Puntaje	Obs
Planta ubicada en zona alejada de focos de insalubridad (RSA Art. 22)		
Vías de acceso y zonas de circulación con superficie dura, pavimentada que controle la presencia de polvo (RSA Art. 23)		
Espacio físico suficiente y adecuado en la empresa para el almacenamiento de productos alimenticios no aptos para el consumo humano (RSA Art. 105)		
Disposición de líneas de producción adecuada (Cuenta con áreas de recepción, selección, limpieza y preparación de materias primas, producción y almacenamiento de mat. Primas y prod. Terminado)		
Vestuarios y servicios higiénicos convenientemente situados y en número conforme con el personal (RSA Art. 32)		

**Anexo Nº10**  
**INFORME DE INSPECCION DE ENTIDADES PRODUCTORAS DE NUECES.**

**NO CONFORMIDADES Y/O OBSERVACIONES**

<b>INSTALACIONES</b>	
<b>Parámetros</b>	<b>Observación</b>
Pisos impermeables, no absorbentes, lavables, antideslizantes y atóxicos, sin grietas y fáciles de limpiar (RSA Art.25)	Se observó pisos en con algunas grietas lo que dificulta la limpieza y que deben ser reparados
Paredes impermeables, no absorbentes, lavables y atóxicos y de color claro, lisas y sin grietas, fáciles de limpiar y desinfectar (RSA Art.25)	Las paredes si bien no son lisas, cumplen con el propósito de una empresa donde se requieren grandes espacios
<b>HIGIENE DEL PERSONAL</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Observación</b>
Manipuladores mantiene limpieza personal llevando ropa protectora (cofia o gorro, y delantal). No usan objetos de adorno en las manos y mantiene las uñas de las manos cortas, limpias y sin barniz (RSA Art. 56)	Manipuladoras de nueces no usan mascarillas
<b>PROCESOS Y PRODUCTOS TERMINADOS</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Observación</b>
Flujo del personal, vehículos y materias primas en las distintas etapas del proceso, ordenado y conocido, para evitar contaminación cruzada (RSA Art. 63)	En general, se observó que el flujo del personal y de las distintas etapas del proceso está ubicados de manera tal de evitar posible contaminación cruzada. Se sugiere mantener vehículos de uso exclusivo dentro del sector o área de trabajo.
<b>EXTERIORES</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Observación</b>
Vías de acceso y zonas de circulación con superficie dura, pavimentada que controle la presencia de polvo (RSA Art. 23)	Se observan zonas de circulación externa sin pavimentación

**NOTA:** Las Observaciones, fueron obtenidas durante la visita dirigida a la Planta, tanto en forma visual como mediante conversaciones con los diferentes encargados de Calidad de las Empresas.

**EVALUACION FINAL**

Todas las otras empresas tienen instalado el sistema HACCP y además poseen acreditación BRC. La norma BRC es un estándar mundial para la seguridad de los alimentos creado por el British Retail Consortm (Consortio Británico de Minoristas), organización a quien debe las iniciales BRC. La norma fue creada con la doble finalidad de, por un lado, asegurar el cumplimiento de los proveedores y, por otra parte, proporcionar a los minoristas una herramienta con la cual garantizar la calidad y seguridad de los productos alimenticios que comercializan.

En la actualidad, la norma BRC es **conocida y utilizada a nivel mundial** tanto por minoristas como por empresas procesadoras en la producción de alimentos seguros y en la selección de proveedores confiables.

El Estándar Mundial BRC para la seguridad de los alimentos cumple con el criterio de la Iniciativa global de Seguridad de los Alimentos del CIES, el Foro de Negocios de Alimentos, la organización global de CEOs y por directores ejecutivos de alrededor de 400 minoristas y miembros manufactureros de todos los tamaños. Por lo tanto, es un **estándar aceptado por la mayoría de los minoristas de alimentos** como el equivalente de otros estándares de seguridad en los alimentos establecidos también como puntos de referencia, como el IFS, el SQF o el holandés HACCP.

Además del HACCP, la Norma Global BRC para Inocuidad de los Alimentos posee enfoque en:

- Compromiso de la gestión
- Sistemas de gestión de calidad
- Auditoría de buenas prácticas de fabricación
- Auditoría en áreas que tienen los mayores índices de devolución de productos
- Desarrollo de sistemas para reducción de la exposición a fraudes de alimentos
- Garantizar consistencia en procesos de auditoría
- Promover mayor resistencia, transparencia y rastreo de la cadena de suministros

Se trata de una **herramienta global** basada en los más recientes y actualizados estándares y metodologías de seguridad en los alimentos. Los requerimientos del estándar se relacionan con el **Sistema de Gestión de Calidad y con el sistema HACCP**.

En consecuencia, las empresas con este sistema de acreditación han cumplido con las normas de **calidad de las empresas**, basada en los siguientes principios o fundamentos:

- Asegurar la **transparencia** a lo largo de toda la cadena de suministro.
- Dotar de una **prueba evidente a las empresas certificadas** del cumplimiento de la legislación en temas de seguridad alimentaria.
- Permitir el **acceso a mercados** extranjeros.
- Aumentar el **nivel de seguridad de clientes y proveedores**.
- Facilitar el **control de las distintas fases** o etapas durante el proceso de elaboración de productos.
- Conciliar la **seguridad alimentaria y el control de calidad**.
- Construir y operar un **sistema de gestión** capaz de ayudarle a **satisfacer** de la mejor manera posible la **calidad de los alimentos**.
- Ayudar al cumplimiento de los **requisitos de seguridad y de la ley**, con especial referencia a la legislación aplicable en los países donde se consume el producto terminado.
- Facilitar las **reducciones en desperdicio de productos**, re-trabajo de productos y retiro de productos del mercado.
- Lograr una **gestión eficiente de la cadena de suministro** mediante la reducción de auditorías y el aumento de su fiabilidad en la cadena de suministro.

Las empresas que han obtenido una certificación de la norma BRC, además de adquirir un alto grado de compromiso por parte de la dirección y los trabajadores, han establecido objetivos y determinado fechas concretas para su implementación y evaluación.

## **OPORTUNIDAD DE MEJORAS**

### **1.- ALERTA TEMPRANA:**

1.1. Realizar análisis de identificación morfológica de hongos toxigénicos: *Aspergillus* y *Penicillium*: Este resultado serviría para predecir el riesgo de contaminación toxicológica temprana

### **2.- CONTROL DE LA INOCUIDAD DEL PRODUCTO**

2.1. El análisis de Micotoxinas debe hacerse por productor y no realizar un mix de productos de distintos orígenes y con ello determinar la presencia o ausencia de toxinas mediante un solo análisis.

2.2. El análisis de Micotoxinas debe realizarse en la cáscara y en la semilla por separado para evitar así la contaminación cruzada

2.3. Realizar análisis de hongos toxigénicos y micotoxinas en los siguientes pasos de la producción del producto terminado:

Al término de la cosecha

Antes del envase

Antes del envío a destino

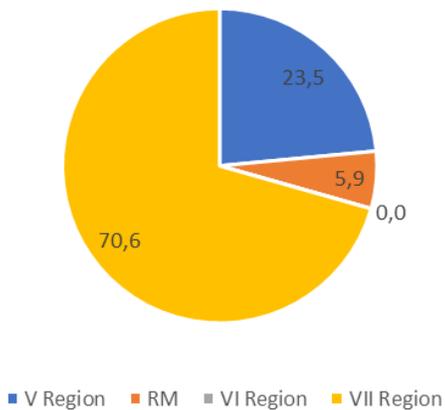
## ANEXO N°11

En el siguiente anexo se observan los resultados de análisis de encuesta realiza a productores.

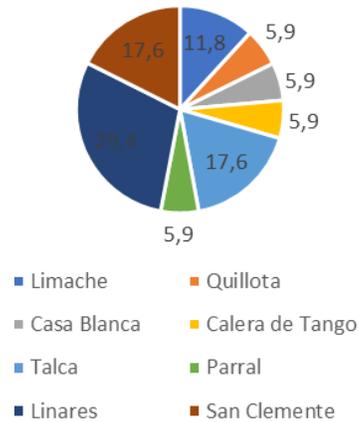
### Sección I: Antecedentes generales

Región	
Localidad	
Empresa/ Agrícola	
Cargo en la empresa o agrícola	
Tamaño de empresa/agrícola	
¿Son los nogales la primera fuente de ingreso de la empresa/agrícola?	

Encuestados por Región



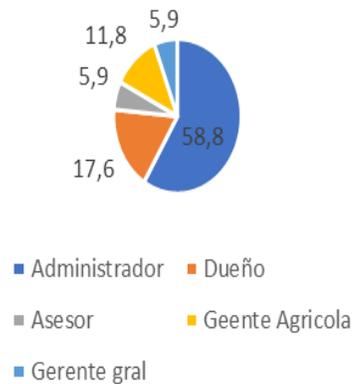
Encuestados por localidad

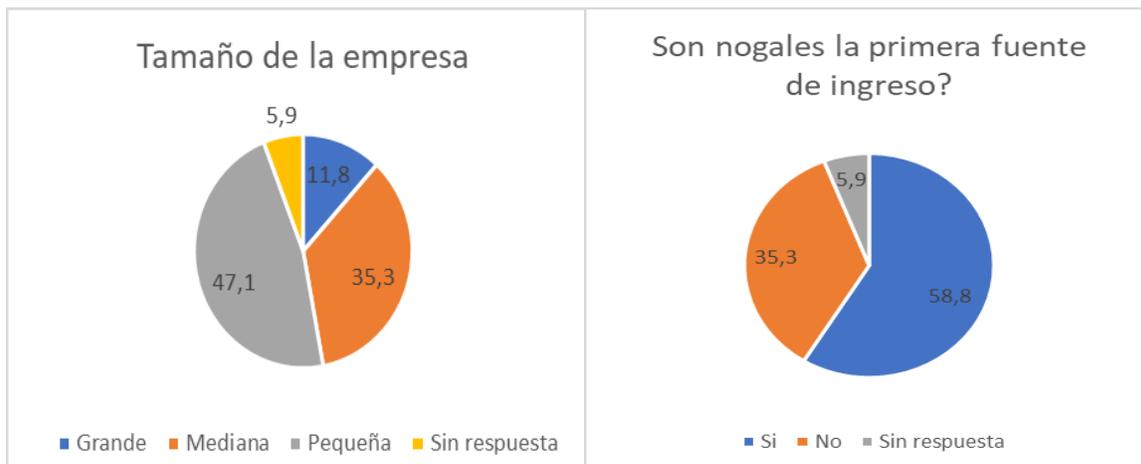


Empresa/Agrícola



Cargo en la empresa





En la sección I se manifiesta el análisis de los antecedentes generales contenidos en la encuesta, mostrándose el número de encuestados por Región (IV a VIII), localidad, si es una empresa o agrícola, el tamaño de esta, el cargo que ejerce el encuestado y por último si la plantación de nogales es su primera fuente de ingresos.

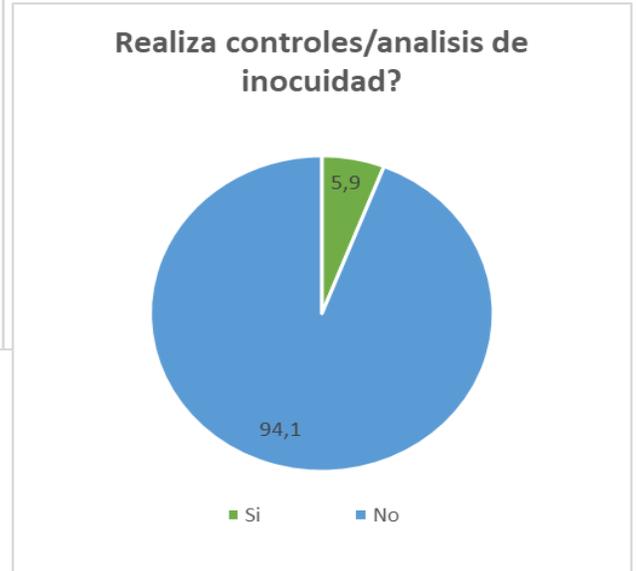
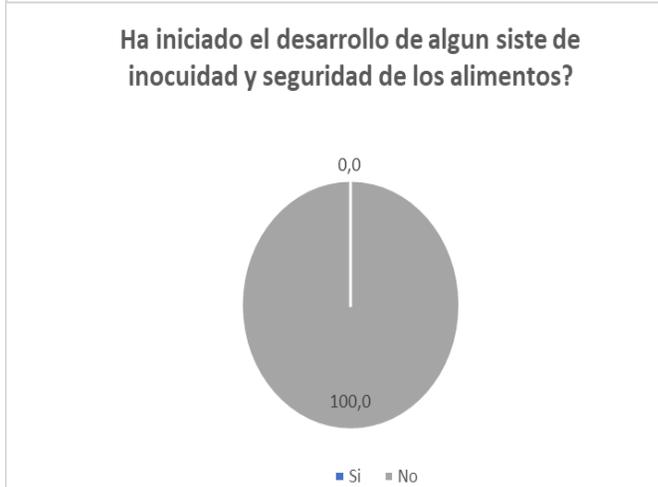
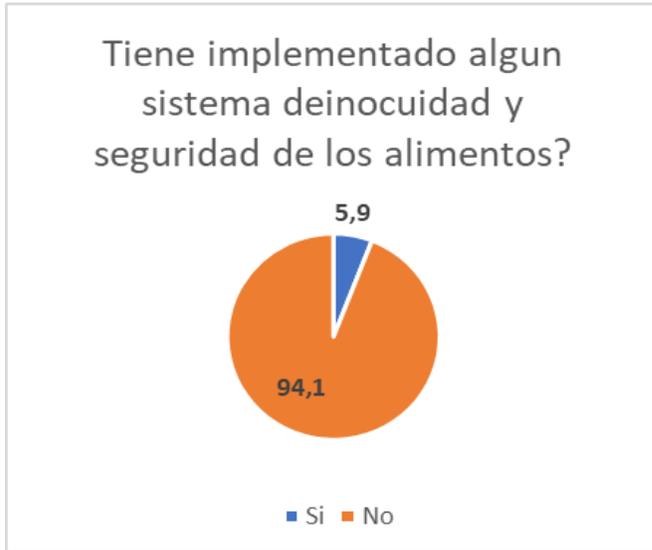
Del 100% de los encuestados el 70,6% era perteneciente a la VII Región predominando la ciudad de Linares con un 29,4% de los encuestados. De los cuales un 70,6% eran de agrícolas y el 58,8% con cargo de administradores de estas.

Otro antecedente recogido fue que el 47,1% corresponde a pequeñas empresas y que su primera fuente de ingresos corresponde a la plantación de nogales, representados con un 58,8%.

## **Sección II: Aseguramiento de la inocuidad**

	SI	NO
1. ¿Tiene implementado algún sistema de Inocuidad y Seguridad de los Alimentos?		
2. ¿Ha iniciado el desarrollo algún sistema de Inocuidad y Seguridad de los Alimentos?		
3. Dentro del ámbito de su empresa, ¿realiza controles/análisis relacionados con inocuidad?		

Resultados preguntas 1, 2 y 3:



En los gráficos de la sección II se manifiesta el análisis del aseguramiento de la inocuidad, este se basó en cuatro preguntas referentes al aseguramiento de la inocuidad.

El 94,1% de los encuestados No tiene implementado algún sistema de inocuidad y seguridad de los alimentos y el 100% no iniciado el desarrollo de algún sistema de inocuidad. En el caso de la realización de controles/análisis relación un 94,1% asegura No contar con estas medidas.

4. Si corresponde, indique las normas / estándares / protocolos que su empresa tienen certificados o están en vías de certificar.			
	En proceso de Implementación	Implementado	Certificado
BPM			
HACCP			
ISO 22000			
FSSC 22000			
TRAZABILIDAD			
Exigencias de FDA (Ley para la modernización de la inocuidad alimentaria)			
Estándares internos/proprios de inocuidad			

#### Resultados pregunta 4:

4.- Si corresponde, indique las normas/standares/protocolos que su empresa tienen certificados o estan en vias de certificar											
BPM			HACCP			ISO 22000			FSSC 22000		
Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%
En proceso de implementacio	7	41,2	En proceso de implementaci	4	23,5	En proceso de implementaci	2	11,8	En proceso de implementaci	1	5,9
Implementado	0	0,0	Implementado	0	0,0	Implementado	0	0,0	Implementado	0	0,0
Certificado	0	0,0	Certificado	0	0,0	Certificado	0	0,0	Certificado	0	0,0
Sin resp	10	58,8	Sin resp	13	76,5	Sin resp	15	88,2	Sin resp	16	94,1
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>100,0</b>	<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>23,5</b>	<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>11,8</b>	<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>100,0</b>

#### 4.- Si corresponde, indique las normas/standares/protocolos que su empresa tienen certificados o estan en vias de certificar

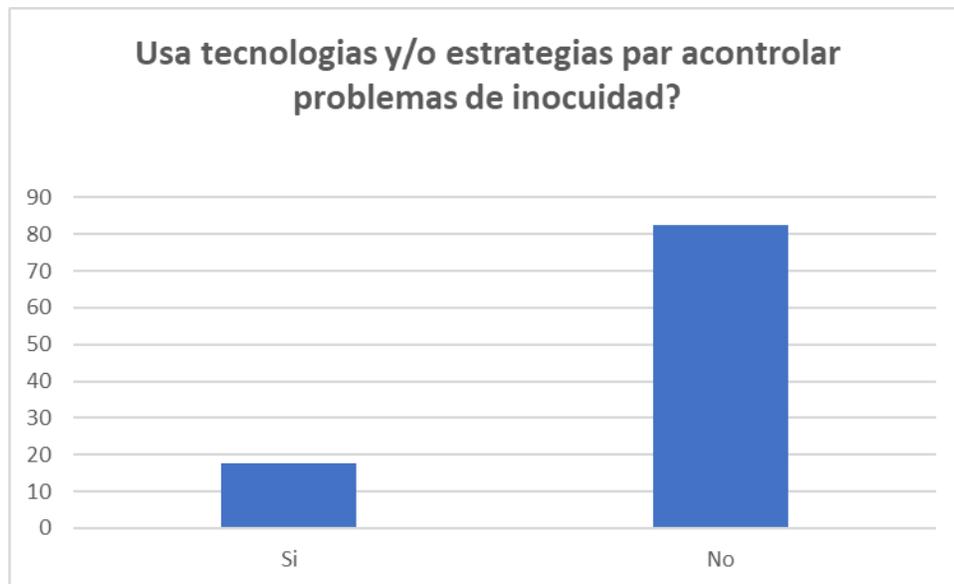
TRAZABILIDAD			Exigencias de FDA			Estándares internos/proprios de inocuidad		
Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%
En proceso de implementaci	1	5,9	En proceso de implementaci	1	5,9	En proceso de implementacio	1	5,9
Implementado	0	0,0	Implementado	0	0,0	Implementado	0	0,0
Certificado	0	0,0	Certificado	0	0,0	Certificado	0	0,0
Sin resp	16	94,1	Sin resp	16	94,1	Sin resp	16	94,1
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>5,9</b>	<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>5,9</b>	<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>5,9</b>

En el análisis de la pregunta 4 de la encuesta podemos determinar que del total del 100% de los encuestados el 60.9% cuenta con algún tipo de certificación mencionada, ya sea BPM; HACCP; ISO2000 y FSSC 22000.

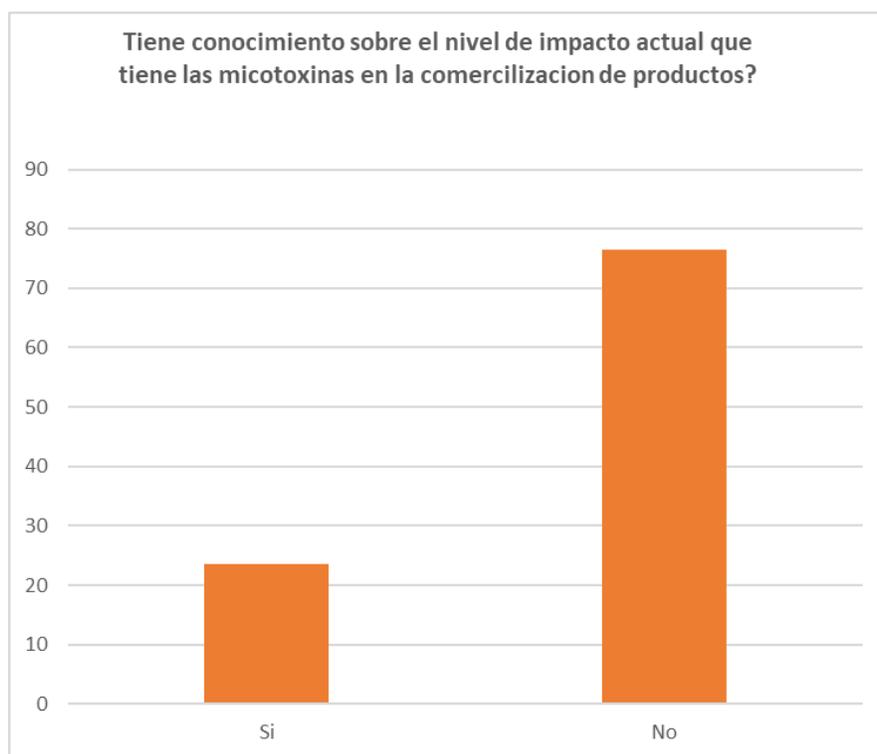
Si SU EMPRESA utiliza estándares internos/proprios de inocuidad u otros no especificados en el cuadro anterior, especifíquelos a continuación:

	SI	NO
5. ¿Su empresa usa tecnologías y/o estrategias para controlar los problemas de inocuidad?		
6. ¿Tiene conocimiento sobre el nivel de impacto actual que tienen las micotoxinas en la comercialización de sus productos?		

Resultados preguntas 5:



Resultados preguntas 6:



Sección III: Fuentes de información

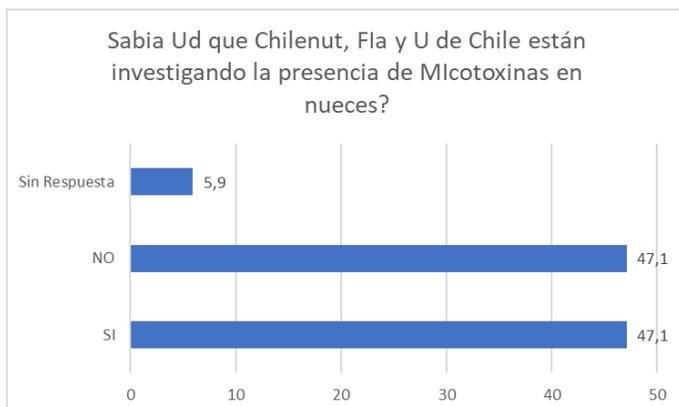
<b>Si tiene una pregunta sobre inocuidad alimentaria, ¿a quién consulta? (Indicar fuente principal)</b>	
<b>Además de la persona que mencionó, ¿recibe información de alguno de otras fuentes?</b>	
<b>¿Cuáles considera Ud. ¿Son las mejores fuentes de información?</b>	
<b>¿Participa en algún programa que le provee información o recursos para establecer en su empresa la trazabilidad e inocuidad de sus productos?</b>	
<b>¿Sabía Usted que Chilenut, FIA y la Universidad de Chile, están investigando la presencia de Micotoxinas en nueces?</b>	
<b>¿Desea recibir información de esta investigación?</b>	
<b>¿Le gustaría participar en un proyecto similar?</b>	

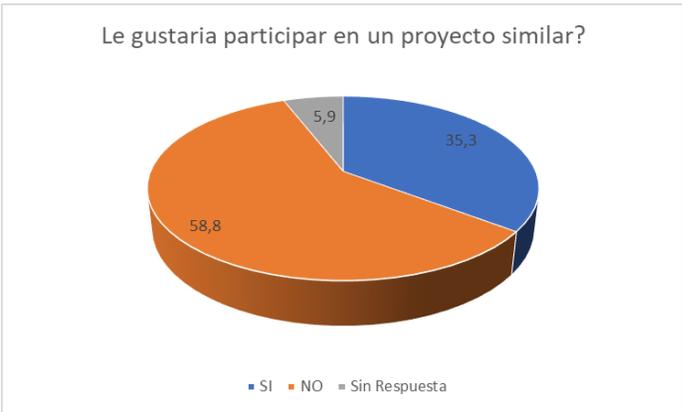
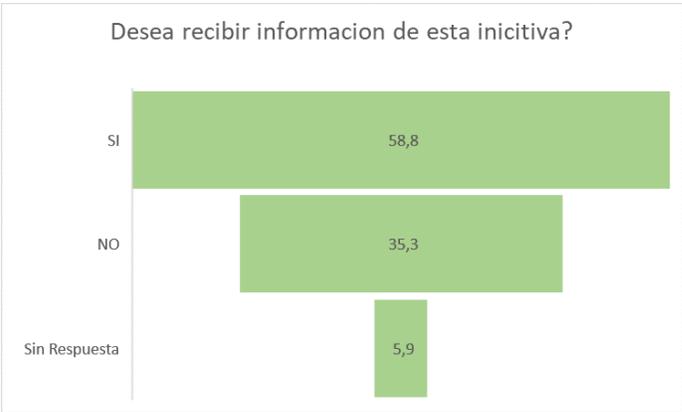
## Resultados:

Si tiene alguna pregunta sobre inocuidad alimentaria ¿a quien consulta?			Ademas de la persona que menciona ¿recibe informacion de alguna de otra fuentes?			Cual considera usted ¿son las mejores fuentes de informacio?			Participa en algun programa que lo prevee informacion o recursos para establcer en su empesa la trazabilidad e inocuidad de sus productos?		
Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%
Asesor	8	47,1	Si	1	5,9	Organismos de	2	11,8	Si	0	0,0
Chilenut	3	17,6	No	9	52,9	Internet	3	17,6	No	15	88,2
Internet	4	23,5	NSF	2	11,8	Asesores	2	11,8	Sin respuesta	2	11,8
Sin respuesta	2	11,8	Infonut	2	11,8	Charlas	2	11,8			
			Sin respuesta	3	17,6	Sin respuesta	8	47,1			
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>100</b>		<b>17</b>	<b>100,0</b>		<b>17</b>	<b>100</b>		<b>17</b>	<b>100</b>

De la tabla anterior podemos concluir que del 100% de los encuestados el 47.1% establece su plan de trabajo sobre inocuidad alimentaria en base a la informacion entregada por un asesor, ademas de News letter de Chilenut y paginas web. Ademas refleja uqe las charlas e internert on las mejores fuentes de mantenerse informado en relacion a la industria.

Sabia usted que Chilenut, FIA y La U de CHILE, esta investigando la presencia de Micotoxinas en nueces?			Desea recibir informacion de esta iniciativa?			Le gustaria participar en un proyecto similar?		
Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%	Opciones	N° respuestas	%
Si	8	47,1	Si	10	58,8	Si	6	35,3
No	8	47,1	No	6	35,3	No	10	58,8
Sin respuesta	1	5,9	Sin respuesta	1	5,9	Sin respuesta	1	5,9
	<b>17</b>	<b>100</b>		<b>17</b>	<b>100</b>		<b>17</b>	<b>100</b>







CHILENUT



**PROYECTO CHILENUT FIA**  
**“MICOTOXINAS: Diseño y desarrollo de un programa integrado de monitoreo y análisis para la calidad e inocuidad alimentaria (PRIMACIA) aplicado a frutos secos”**  
**PYT-2016-0064**

¿Sabe qué son las micotoxinas?

¿Quiénes las producen?,

¿Cómo llegan las micotoxinas a los alimentos?

¿Qué es un punto de riesgo de contaminación? ¿Cómo se controlan?

¿Cuál sería el impacto económico y social que tiene la contaminación de micotoxinas en la comercialización de sus productos?

¿TIENE INTERES EN PARTICIPAR DE ESTE PROYECTO?

NO

SI

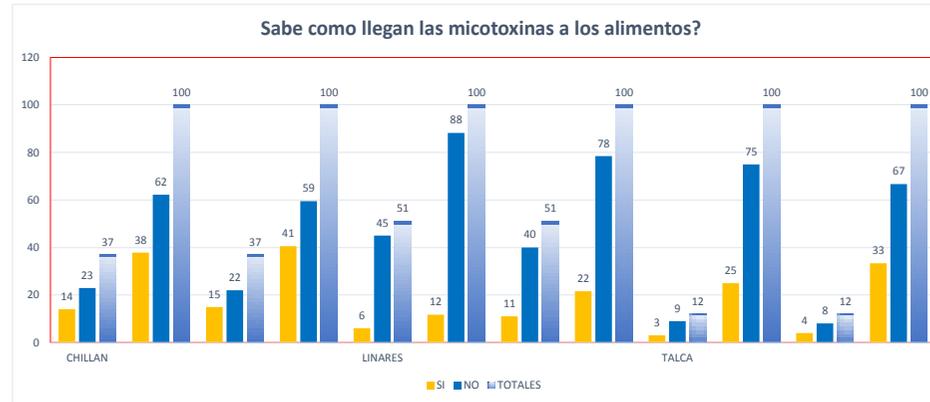
DATOS DE CONTACTO

RESULTADOS PREGUNTA 5:

¿Tiene interes en participar de este proyecto?

SI  
NO  
TOTALES  
TOTAL ENCUESTADOS

CHILLAN				LINARES				TALCA			
QUIZ ENTRADA		QUIZ SALIDA		QUIZ ENTRADA		QUIZ SALIDA		QUIZ ENTRADA		QUIZ SALIDA	
Nº ENC	%	Nº ENC	%	Nº ENC	%	Nº ENC	%	Nº ENC	%	Nº ENC	%
14	38	15	41	6	12	11	22	3	25	4	33
23	62	22	59	45	88	40	78	9	75	8	67
37	100	37	100	51	100	51	100	12	100	12	100
100											



26

Conclusiones:

Según el numero de encuestados para la pregunta N°6: ¿Tiene interes en participar de este proyecto?, en los 3 talleres realizados en el quiz de entrada solo 23 de los encuestados manifestaron quere participar en un proyecto como este, luego de la presentacion al hacer la consulta en el quiz de salida este numero se ve incremnetado en 3 encuestados que manifisetan su deseo de participar. Todos estos resultados se grafican para una mayor comprensión.



## PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016



### **Micotoxinas: Diseño y Desarrollo de un Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA) aplicado a frutos secos.**

Código del Proyecto: [PYT-2016-0064](#)

**Institución Ejecutora:** Asociación Gremial de Productores y Exportadores de Nueces de Chile A.G.

**Asociados:** Facultad de Medicina – Instituto de Ciencias Biomédicas Universidad de Chile

**Prof. Américo López Rivera**  
**Director alterno**





## JUSTIFICACION DE LA VIGENCIA CIENTIFICA – TECNOLOGICA DEL PROYECTO

### Regulaciones más exigentes por parte de los mercados importadores de productos agrícolas: Métodos de Análisis y Niveles Regulatorios.

El fantasma de las crisis en seguridad alimentaria ha venido recurrentemente alarmando al mundo. Los brotes de hongos toxigénicos han sido frecuentes en países de gran importancia agrocomercial. La salud humana y la economía de las industrias de este sector productivo han recibido los mayores impactos negativos.

Europa es un mercado emergente para agroproductos chilenos.



## JUSTIFICACION DE LA VIGENCIA CIENTIFICA – TECNOLÓGICA DEL PROYECTO

Las normas relativas a micotoxinas en la CE revela que la vigilancia sanitaria debe incluir sistemas de alarma, detección de micotoxinas, hongos, contaminantes y el apoyo a BPA en los programas de monitoreo incluyendo la evaluación de riesgo

El eventual incumplimiento de las normas conduciría al bloqueo de entrada de productos agropecuarios chilenos al mercado Europeo, disminución en nuestras exportaciones, pérdida de prestigio como país exportador y disminución de la fuerza laboral asociada

Chile está obligado a cumplir con estándares de calidad equivalentes a los exigidos por UE y USA. Así urge implementar acciones para control en toda la cadena productiva del sector frutícola nacional.



## JUSTIFICACION DE LA VIGENCIA CIENTIFICA – TECNOLOGICA DEL PROYECTO

Inexistencia en Chile de un sistema de evaluación del riesgo toxicológico que proporcione un alto nivel de garantías sobre la seguridad de los productos agrícolas y que permita reforzar la protección de la salud pública y el manejo de la producción de la agricultura nacional.

El análisis del riesgo propuesto en el proyecto, es un proceso preventivo (estudio de causas y efectos que producen) para garantizar la inocuidad toxicológica. Se identificará, evaluará y preverá el riesgo de contaminación de las nueces a nivel químico y biológico.



## OBJETIVO GENERAL

Diseñar y desarrollar un Programa Integrado de Monitoreo y Análisis de Calidad e Inocuidad Alimentaria (**PRIMACIA**) que permita detectar y monitorear micotoxinas (Aflatoxinas y Ocratoxina A) a lo largo de toda la cadena productiva en el clusters de Frutos secos (nueces), con la misma sensibilidad utilizada actualmente en la Unión Europea (UE).

El Programa permitirá identificar los puntos críticos de contaminación en las líneas de producción, para determinar tendencias en la proliferación de los hongos tóxicos asociados y construir así una base de datos, de utilidad en la toma decisiones regulatorias.

Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)	
		Nombre del indicador	Fecha alcance meta
1	Caracterización morfológica de hongos	Cultivo y aislamiento de cepas de hongos Identificación de hongos	30-10-2016
2	Determinación toxicidad del hongo	Capacidad de producción de toxinas	30-04-2017
3	Método HPLC Validado para la determinación de AFLAs y OTA	Curvas de Calibración y Análisis de Recuperabilidad	30-10-2016
4	Determinación puntos de riegos de contaminación en línea de producción	Presencia de contaminación por muestra Puntos de Riegos	30-10-2017
5	Desarrollo Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA)	Manual del PRIMACIA	30-11-2018
6	Tecnología transferida	Agricultores capacitados	30-11-2018



# IDENTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS y OCRATOXINA A EN MUESTRAS DE NUECES RECOLECTADAS EN CENTROS DE PRODUCCIÓN NACIONAL: TRAZABILIDAD DE LA CONTAMINACIÓN



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

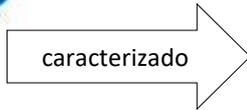
**LABORATORIO DE TOXICOLOGIA - FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

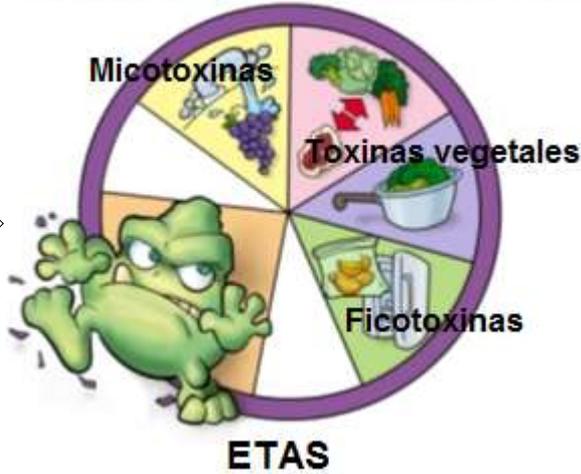


# Micotoxinas

# INTRODUCCIÓN



## Contaminantes de los alimentos



25% de cosecha  
contaminada





# ¿Qué son las micotoxinas?



- Son sustancias **producidas por varios especies de mohos** que pueden crecer sobre los alimentos en determinadas condiciones de humedad y temperatura.

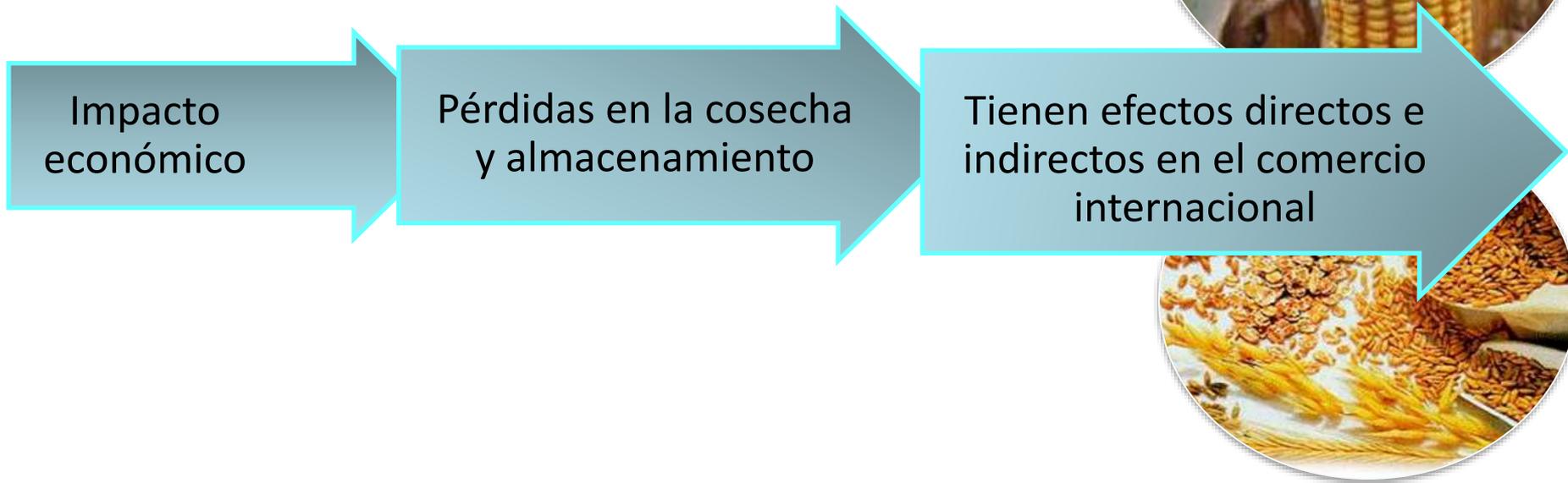


**Representan un riesgo serio para la salud humana y animal.**

**Más de 200 tipos de micotoxinas, producidas por unos 150 hongos diferentes**



# MICOTOXINAS



Impacto económico

Pérdidas en la cosecha y almacenamiento

Tienen efectos directos e indirectos en el comercio internacional





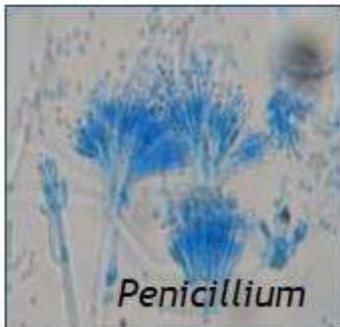
***Las micotoxinas afectan al 25% de las cosechas mundiales cada año  
(FAO, 2004)***

Debido al **cambio climático**, en la última década se ha observado un aumento de micotoxinas presentes en los alimentos y piensos, aunque sólo un mínimo porcentaje suele superar los límites máximos establecidos por la legislación vigente.



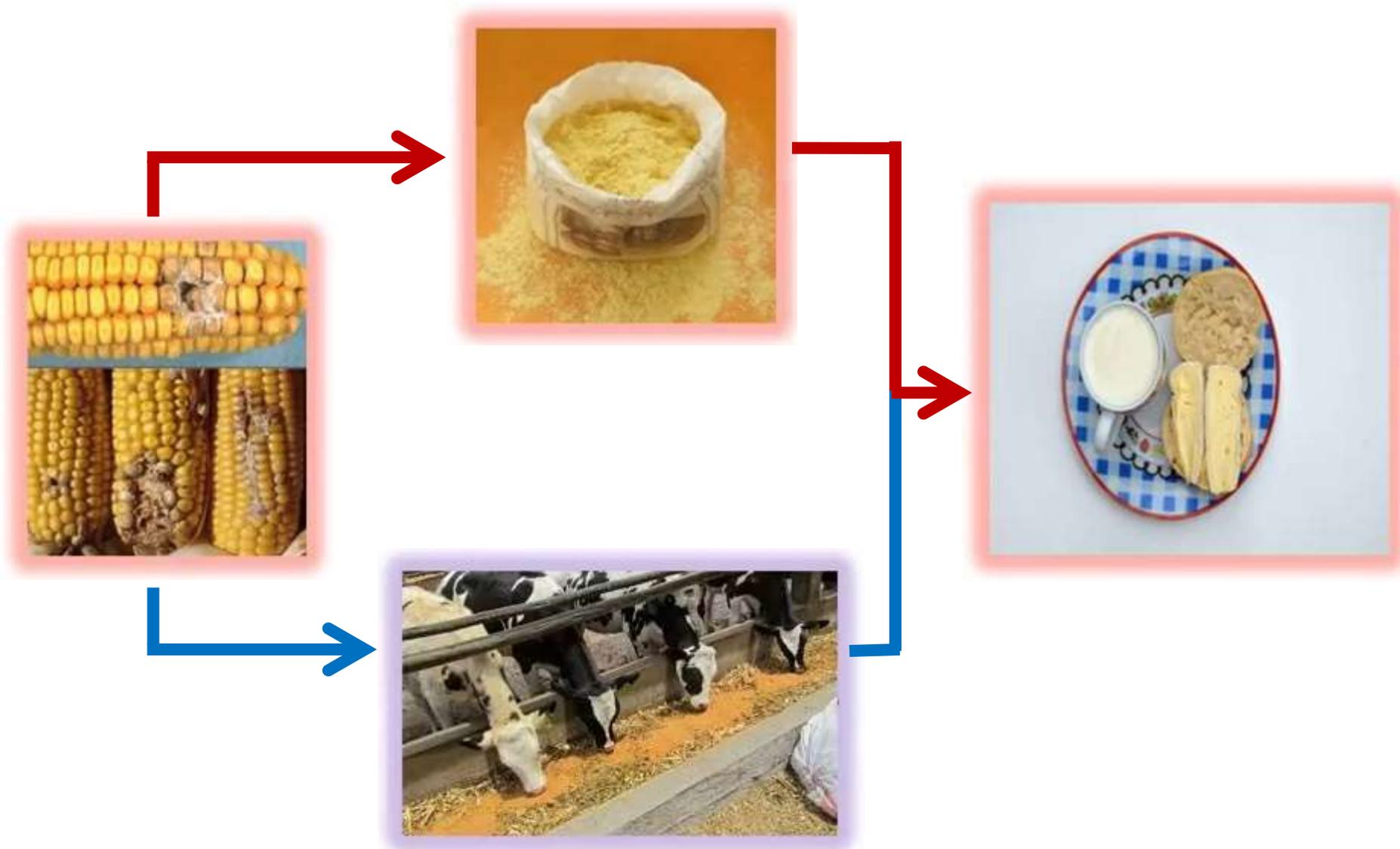


# ¿Cuáles son las micotoxinas más importantes?



Especies de mohos	Micotoxinas
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub>
<i>Fusarium sporotrichiodes</i>	Toxina T-2
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol, zearalenona
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisina B <sub>1</sub>
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina

Entran en la cadena alimentaria normalmente a través de cultivos contaminados, principalmente cereales, que son destinados a alimentos y pienso





# ¿Qué alimentos son los más implicados?

- **Alimentos sin procesar:**
  - Cereales, las semillas oleaginosas, frutas, verduras, frutos secos, frutas desecadas
  - Habas de café, habas de cacao y especias.
- **Alimentos procesados**
  - Productos a base de cereales (pan, pasta, cereales de desayuno, etc.)
  - Bebidas (vino, café, cacao, cerveza, zumos)
  - Alimentos de origen animal (leche, queso)
  - Alimentos infantiles.





# ¿Por qué aparecen en los alimentos?



Cultivo



Cosecha



Almacenamiento



Entre los 24°C y los 28°C  
Humedad Relativa elevada

# FACTORES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

- Factores climáticos.
- Susceptibilidad del cultivo.
- Daños mecánicos.

En general:

- La disponibilidad de agua ( $a_w$ )
- Temperatura se considera los principales factores que inciden en la proliferación del hongo y producción de micotoxinas

Condiciones de crecimiento de *A. ochraceus* y *P. verrucosum*

Hongos productores	T° óptima	Aw
<i>A. ochraceus</i>	24 - 31 °C	0.95 – 0.99
<i>P. verrucosum</i>	20 °C	0.90



Una vez que los Hongos están presentes ,  
en el alimento, ya no se puede descontaminar



**Resisten los procesos de secado, molienda e incluso el cocinado ya que tienen una elevada estabilidad térmica**





# ¿Qué efectos tienen las micotoxinas?

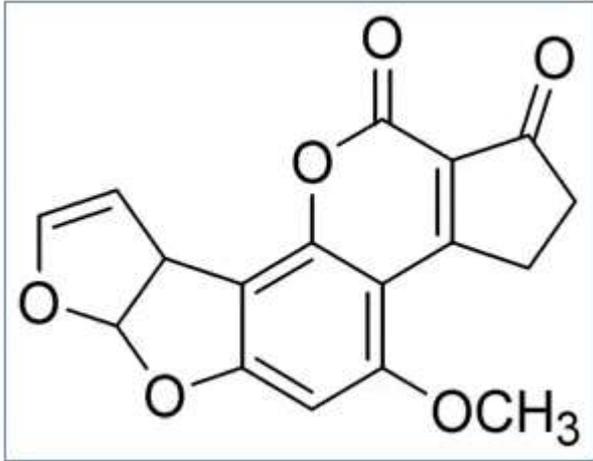
## Efectos **agudos**: dosis altas

- Hemorragias.
- Daño agudo del hígado.
- Edema.
- Alteraciones en la digestión, absorción y/o metabolismo de alimentos.
- Muerte.



## Efectos **crónicos**: dosis bajas a largo plazo

- Efectos carcinogénicos.
- Efectos teratogénicos.
- Efectos embriotoxigénicos.
- Actúan sobre el Sistema Inmunológico, causando inmunosupresión.

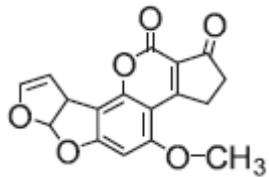


*Aflatoxina B<sub>1</sub>*



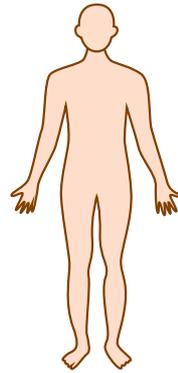
*Aspergillus flavus*

**Carcinógeno natural más  
potente que se conoce**



Aflatoxina B1

Ingestión



AF > 80%  
OTA 40-65%

Absorción  
Distribución



Microflora bacteriana (intestino),  
Hígado y Riñón

**Residuos del  
Hígado y Riñón**

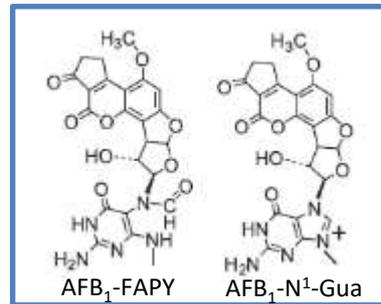
-Bilis/Heces  
-Orina

Excreción

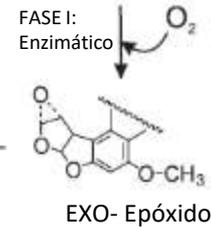
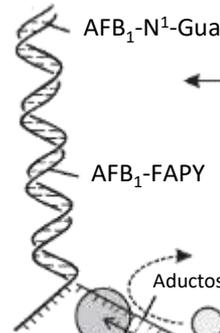


**Células de Hígado**

Aductos con ADN



ADN



Aductos } Daño al ADN  
                  } Respuestas

Polimerasas

Proteínas reparadoras

Apoptosis  
Necrosis

Espectro mutacional 2

Espectro mutacional 1

Espectro mutacional 3

Adicional proceso mutacional

**Carcinoma**

Espectro mutacional del tumor

A green combine harvester is shown in the process of harvesting a vast field of golden wheat. The harvester is positioned in the upper left quadrant of the frame, moving towards the right. The field is filled with rows of wheat, with some rows already harvested and others still standing. The sky is a clear, bright blue. The overall scene depicts a typical agricultural harvest scene.

Las micotoxinas no se pueden eliminar de los alimentos una vez que están contaminados.

**Aplicación de códigos de buenas prácticas de higiene (CBP)**



**Aplicación de códigos de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)**



## ¿Qué medidas se han tomado para reducir la exposición a las micotoxinas?

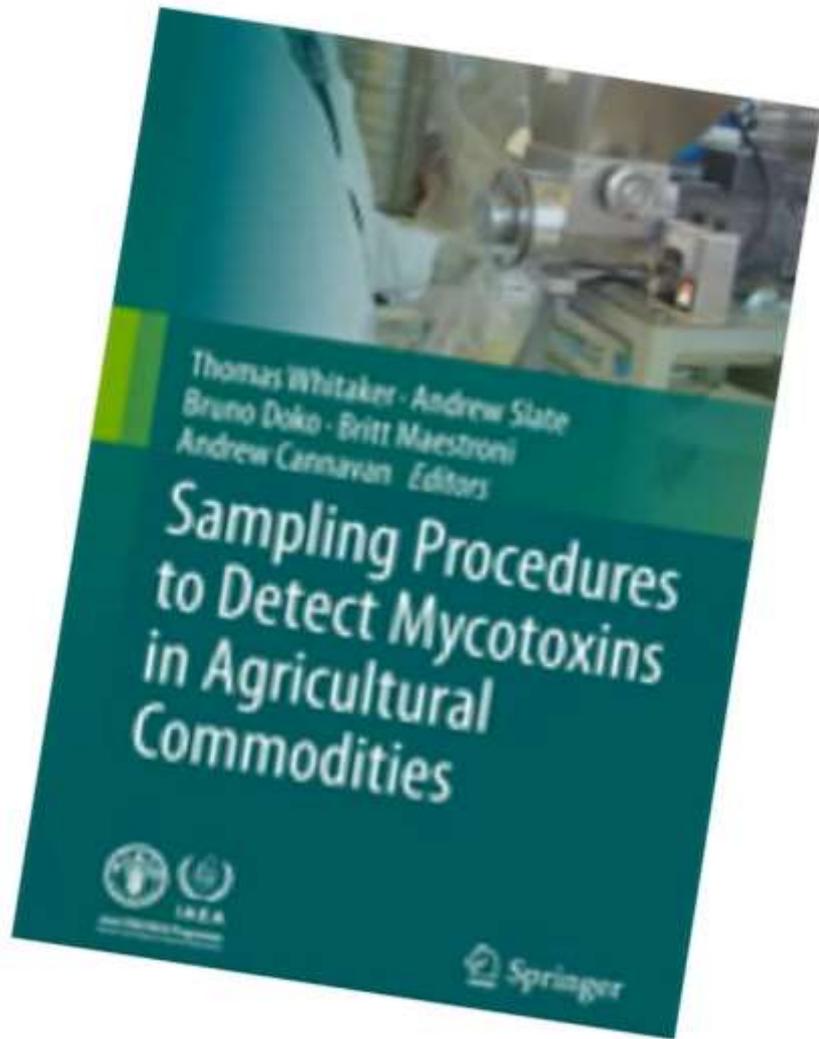
- A nivel europeo se recogen en el [Reglamento 1881/2006, de 19 de Diciembre de 2006.](#) los **límites máximos** vigentes de algunas micotoxinas en los alimentos.
- En la UE hay varios **Códigos de buenas prácticas** (cBPs) recomendados para la prevención y reducción de micotoxinas.
- A nivel internacional, además del establecimiento de límites máximos para algunas micotoxinas, existe un Código de Prácticas de higiene en el ***Codex Alimentarius.***



**¿Cómo controlar los niveles de micotoxinas en los alimentos?**



**Distribución heterogénea de las micotoxinas**





## ¿Cómo controlar los niveles de micotoxinas en los alimentos?

- La UE se han armonizado los **métodos de muestreo y el análisis** de las micotoxinas en los alimentos a través del [Reglamento CE nº 401/2006, de 23 de Febrero de 2006.](#)



# ¿Cómo se realiza el análisis de Micotoxinas?

MUESTREO

Obtención de una muestra representativa del lote

EXTRACCIÓN

Separación de la micotoxina de compuestos insolubles en la disolvente de extracción.

CLEAN-UP

Separar la micotoxina de otras sustancias acompañantes en el extracto

Columnas de Inmunofinidad



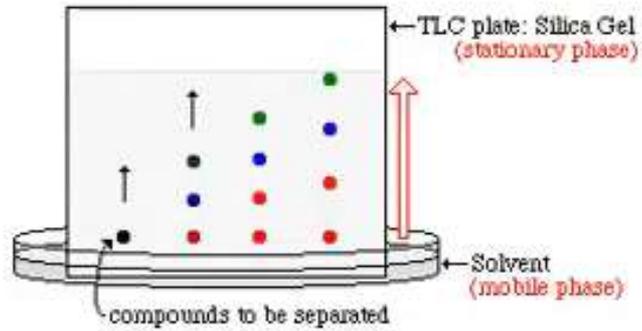
CONCENTRACIÓN

Concentrar la micotoxina presente en el extracto



# Métodos de análisis

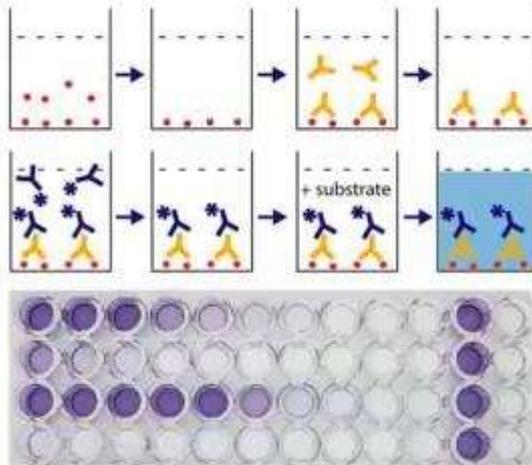
**TLC**



**HPLC**



**ELISA**



# METODOLOGÍA ANALÍTICA

## ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS



## ETIQUETADO Y ALMACENADO DE MUESTRAS DE NUECES Y ALMENDRAS

# PREPARACIÓN DE MUESTRAS

50 nueces con cáscara pesan aproximadamente 500 gramos, de los cuales se obtuvo 200-250 gr pulpa de nuez



# EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO





# UNIVERSIDAD DE CHILE

## LABORATORIO DE TOXICOLOGIA

### FACULTAD DE MEDICINA

**FIN**



**EL NEGOCIO SEGUIRA BUENO PARA LOS QUE ESTEN DISPUESTOS  
A HACER LAS COSAS BIEN.**

**LA CARRERA YA NO ES SOLAMENTE LA ALTA PRODUCCION,  
TAMBIÉN LA CALIDAD.**

**MIRAR LA NECESIDAD DEL MERCADO**

**PUNTO DE EQUILIBRIO ENTRE ALTAS  
PRODUCCIONES Y BUENOS  
CALIBRES.**