

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## ***IDENTIFICACIÓN DE OCRATOXINA A EN MUESTRAS DE ALMENDRAS Y NUECES EN CENTROS DE PRODUCCIÓN NACIONAL: TRAZABILIDAD DE LA CONTAMINACIÓN***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos por:

***CELIA ROCIO YAURIS SILVERA***

Director de Tesis : Dr. Américo López Rivera  
CO- Director de Tesis: Dr. Remigio López Solís

Santiago-Chile

Diciembre 2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**CELIA ROCIO YAURIS SILVERA**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Prof. Américo López R.**

---

**Co-director de Tesis:**

**Prof. Remigio López S.**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Prof. Jaime Ortíz V.**

---

**Prof. Cielo Char A.**

---

**Prof. Iván Saavedra S.**

---

## **DEDICATORIA**

*A ti Dios por no abandonarme en momentos difíciles. Gracias por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por darme fuerza, sabiduría y salud para lograr cada una de mis metas.*

*A mis padres Maximina y Cirilo por su inmenso amor, comprensión, palabras de aliento y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, tanto en lo personal como en lo profesional.*

*A mis hermanas Gabriela, Andrea y Lisette por estar conmigo aun cuando están tan lejos, gracias por soportar mis momentos de debilidad.*

*A mi sobrina Mariana por regalarme tantas alegrías y ser motivo de felicidad para toda la familia.*

*A Ronald por su amor, comprensión y paciencia, dándome ánimos para seguir adelante en este nuevo reto.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al director de tesis Dr. Américo López Rivera por su dirección, apoyo y darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio durante esta etapa, por apoyarme constantemente y transmitir sus conocimientos de forma desinteresada.*

*Al co-director de tesis Dr. Remigio López Solís por su buena disposición, cordialidad y generosidad.*

*A todos quienes conforman el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por brindarme todo su apoyo y confianza para llevar a cabo el presente trabajo.*

*A mi amiga y compañera de laboratorio Milagros por compartir momentos inolvidables en un país diferente al nuestro.*

*A todos mis amigos por transmitirme sus buenos deseos para realizar este objetivo en mi vida.*

*A todas las personas quienes me apoyaron a culminar este trabajo.*

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. ....	4
2.1. Hongos.....	4
2.2. Micotoxinas.....	5
2.3. Ocratoxina A. ....	6
2.3.1. Factores implicados en la producción de ocratoxina A. ....	10
2.3.2. Toxicología.....	11
2.3.3. Control y prevención de la contaminación en productos agrícolas por ocratoxina A. ....	13
2.4. Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia HPLC-FL.....	14
2.4.1. Columnas de extracción en fase sólida (SPE) ....	15
2.5. Producción de almendras y nueces en Chile.....	16
2.5.1. Nuez.....	16
2.5.2. Almendra.....	19
3. HIPOTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo General. ....	22
4.2. Objetivos Específicos.....	22
5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	23

5.1. Lugar e infraestructura.....	23
5.2. Materiales.....	23
5.3. Equipos.....	23
5.4. Reactivos.....	24
6. METODOLOGIA.....	25
6.1. Localización geográfica:.....	25
6.1.1. Trabajo en campo.....	25
6.1.2. Trabajo en laboratorio.....	25
6.2. Particularidades del cultivo de la nuez.....	27
6.3. Descripción muestreo de nuez.....	28
6.3.1. Muestreo en árbol.....	29
6.3.2. Muestreo en cosecha.....	30
6.3.3. Muestreo en almacén.....	30
6.3.4. Muestras de laboratorio.....	31
6.4. Particularidades del cultivo de almendra.....	33
6.5. Descripción de muestreo en almendras.....	34
6.5.1. Muestreo en árbol.....	36
6.5.2. Muestreo en cosecha.....	36
6.5.3. Muestreo en almacén.....	37
6.5.4. Muestras de laboratorio.....	37
6.6. Acondicionamiento de muestras.....	39
6.7. Análisis de las muestras.....	42

7. RESULTADOS.....	43
7.1. Linealidad del método.....	43
7.1.1. Linealidad del método en la matriz de nuez.....	43
7.1.2. Linealidad del método en la matriz de almendra.....	45
7.2. Recuperación.....	46
7.3. Resultados de la determinación de ocratoxina A en nuez. ....	47
7.3.1. Resultados de los análisis en semilla, cáscara y pelón de nuez del muestreo en árbol. ....	48
7.3.2. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de nuez del muestreo en cosecha.....	50
7.3.3. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de nuez del muestreo en almacén.....	51
7.3.4. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de nuez de las muestras de laboratorio bajo temperatura controlada.....	52
7.4. Resultados de la determinación de ocratoxina A en almendra. ....	53
7.4.1. Resultados de los análisis en semilla, cáscara y pelón de almendra del muestreo en árbol. ....	54
7.4.2. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de almendra del muestreo en cosecha.....	56
7.4.3. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de almendra del muestreo en almacén.....	56
7.4.4. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de almendra de las muestras de laboratorio bajo temperatura controlada.....	57

8. DISCUSIÓN.....	59
9. CONCLUSIÓN.....	61
10. BIBLIOGRAFIA.....	63
11. ANEXOS.....	68



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales hongos y micotoxinas encontradas en diversos alimentos.....	6
Tabla 2: Nivel regulatorio permitido de ocratoxina A.....	8
Tabla 3: Número de muestras analizadas en cada alimento .....	9
Tabla 4: Límites de crecimiento de <i>A. ochraceus</i> .....	10
Tabla 5: Límites de producción de toxina por <i>A. ochraceus</i> .....	10
Tabla 6: Condiciones de crecimiento para <i>P. verrucosum</i> .....	11
Tabla 7: Valores de dosis letal (DL <sub>50</sub> ) de OTA. ....	12
Tabla 8: Requerimiento de fertilizante. ....	27
Tabla 9: Productos utilizados en el control de plagas y enfermedades .....	27
Tabla 10: Cantidad de análisis según segmento (árbol). ....	30
Tabla 11: Cantidad de análisis según segmento (cosecha).....	31
Tabla 12: Cantidad de análisis según segmento (almacén).....	31
Tabla 13: Análisis realizados en muestras de laboratorio.....	32
Tabla 14: Resumen de análisis en muestras de nueces.....	32
Tabla 15: Requerimiento de fertilizante. ....	33
Tabla 16: Productos utilizados en el control de plagas y enfermedades .....	34
Tabla 17: Cantidad de muestra analizada según segmento (árbol).....	36

Tabla 18: Cantidad de muestra analizada según segmento (cosecha). .....	37
Tabla 19: Cantidad de muestra analizada según segmento (almacén). .....	37
Tabla 20: Análisis realizados en muestras de laboratorio.....	38
Tabla 21: Resumen de análisis en muestras de almendras.....	38
Tabla 22: Respuesta cromatográfica de nuez fortificada con OTA. ....	43
Tabla 23: Componentes de linealidad del método. ....	44
Tabla 24: Respuesta cromatográfica de almendra fortificada con OTA. ....	45
Tabla 25: Componentes de linealidad del método. ....	46
Tabla 26: Cálculo de la recuperación de OTA en nuez fortificada. ....	47
Tabla 27: Cálculo de la recuperación de OTA en almendra fortificada. ....	47
Tabla 28: Resultados de la determinación de OTA en semilla.....	48
Tabla 29: Resultados de la determinación de OTA en cáscara de nuez. ...	49
Tabla 30: Resultados de la determinación de OTA en pelón de nuez. ....	50
Tabla 31: Resultados de la determinación de OTA en semilla de nuez.....	51
Tabla 32: Resultados de la determinación de OTA en cáscara de nuez. ...	51
Tabla 33: Resultados de la determinación de OTA en semilla de nuez.....	52
Tabla 34: Resultados de la determinación de OTA en cáscara de nuez. ...	52
Tabla 35: Resultados de la determinación de OTA en laboratorio.....	53
Tabla 36: Resultados de la determinación de OTA en nuez. ....	53

Tabla 37: Resultados de la determinación de OTA en semilla.....	54
Tabla 38: Resultados de la determinación de OTA en cáscara. ....	55
Tabla 39: Resultados de la determinación de OTA en pelón. ....	55
Tabla 40: Resultados de la determinación de OTA en semilla.....	56
Tabla 41: Resultados de la determinación de OTA en cáscara. ....	56
Tabla 42: Resultados de la determinación de OTA en semilla.....	57
Tabla 43: Resultados de la determinación de OTA en cáscara. ....	57
Tabla 44: Resultados de la determinación de OTA en laboratorio.....	58
Tabla 45: Resultados de la determinación de OTA en almendra.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Hongos productores de micotoxinas.....	4
Figura 2: Estructura química de ocratoxina A. ....	8
Figura 3: Etapas de la extracción en fase sólida.....	15
Figura 4: Nuez para ser cosechada. ....	17
Figura 5: Fruto de nuez.....	17
Figura 6: Exportación de nuez. ....	19
Figura 7: Almendra para ser cosechada. ....	20
Figura 8: Fruto de almendra.....	20
Figura 9: Exportación de almendra. ....	21
Figura 10: Secuencia de actividades. ....	26
Figura 11: Distribución esquemática del nocedal “Santa Amalia de lo Vicuña” .....	29
Figura 12: Distribución esquemática del fundo “El Rosario de Llope” .....	35
Figura 13: Información contenida en la etiqueta de las muestras. ....	41
Figura 14: Curva de calibración de nuez fortificada con OTA.....	44
Figura 15: Curva de calibración de almendra fortificada con OTA.....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Parámetros de control del método HPLC .....	68
Anexo 2: Resultados de los parámetros de validación .....	71
Anexo 3 Reglamento (CE) N° 401/2006 .....	72
Anexo 4: Protocolo de determinación de OTA.....	75
Anexo 5: Protocolo de aseguramiento de la calidad .....	84
Anexo 6: Cromatogramas. ....	91

## RESUMEN

Los principales géneros de hongos asociados a la producción de ocratoxina A (OTA) son *Aspergillus* y *Penicillium*. OTA es una micotoxina con propiedades nefrotóxicas e inmunosupresora sobre animales, además ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer preventivamente como un posible cancerígeno en humanos (del grupo 2B). En la estructura de OTA se combina un aminoácido (fenilalanina) con la cumarina. Es estable en el tiempo y frente a altas temperaturas, fue detectada en numerosos alimentos, como cereales, maíz, especias, legumbres, café, cacao, pasas, coco, cerveza y vino.

El objetivo del presente estudio fue determinar la contaminación de OTA en muestras de almendras y nueces, recolectadas en centros de producción de la región de O'Higgins y Valparaíso respectivamente. Las muestras se recolectaron de acuerdo a tres niveles: árbol, cosecha y almacén, con la finalidad de establecer la trazabilidad de la contaminación utilizando el método de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia, desarrollado e implementado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Los resultados presentados, corresponden a las muestras de almendras y nueces en las que se analizó (semilla, cáscara y pelón) que se encontraron por debajo del límite de detección (BLD), es decir no se evidenció ningún pico cromatográfico en el tiempo de retención correspondiente para OTA.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha caracterizado tres tipos fundamentales de contaminantes en los alimentos: micotoxinas, ficotoxinas y toxinas vegetales; que provocan enfermedades transmitidas por los alimentos (OMS, 2002). De éstas, las micotoxinas son las que provocan mayores daños a nivel económico y de salud, lo que ha provocado un importante interés de investigación en el campo de la alimentación. En varios países las micotoxinas representan un tema de vital importancia relacionado con la inocuidad de los alimentos. Por tanto se ha puesto especial atención a las condiciones de producción, almacenamiento, transporte y distribución que desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y proliferación de los hongos productores de micotoxinas.

De acuerdo con la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO), aproximadamente un 25% de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de toxina de origen fúngico. Aunque resulta difícil de cuantificar, las pérdidas económicas causadas por las micotoxinas representan una carga enorme tanto a nivel de salud pública como de productividad animal. Es por eso que el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos se ha constituido en los últimos años en una meta importante de acción internacional y nacional (FAO, 2004).

OTA es una micotoxina producida por hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Fue detectada en numerosos alimentos, como cereales, maíz, especias, legumbres, café, cacao, pasas, coco, cerveza y vino, además de otros productos de origen animal como los riñones de cerdo (Cabañes, 2006).

El cultivo, producción, comercialización e industrialización de almendras y nueces, constituye un sector relevante de la economía de nuestro país, además Chile siendo exportador debe regirse de acuerdo a los niveles regulatorios para OTA lo que obliga al país a tener un plan permanente de control de la presencia de esta micotoxina, a fin de proteger la salud de los consumidores y evitar las graves pérdidas económicas por la contaminación de almendras y nueces.

En Chile el Reglamento Sanitario de los Alimentos Dto. N° 977/96 (D.OF. 13.05.97) ha establecido 5 ppb como nivel regulatorio de OTA en cacao, pasas, jugos, néctares, concentrado de uva, café en grano, cereales y sus derivados, sin considerar límites máximos regulatorios para frutos secos. Por tanto se ha tomado como referencia la Legislación de la Unión Europea, que establece 20 ppb como límite máximo permitido de OTA en frutos secos.

En el presente estudio se determinó la contaminación con OTA en muestras de almendras recolectadas en el fundo “El Rosario de Llope” ubicado en la región de O’Higgins y en muestras de nueces recolectadas en el nocedal de “Santa Amalia de lo Vicuña” ubicado en la región de



Valparaíso. Todas las muestras fueron acondicionadas en el laboratorio de Toxicología, para su posterior análisis y cuantificación de OTA.

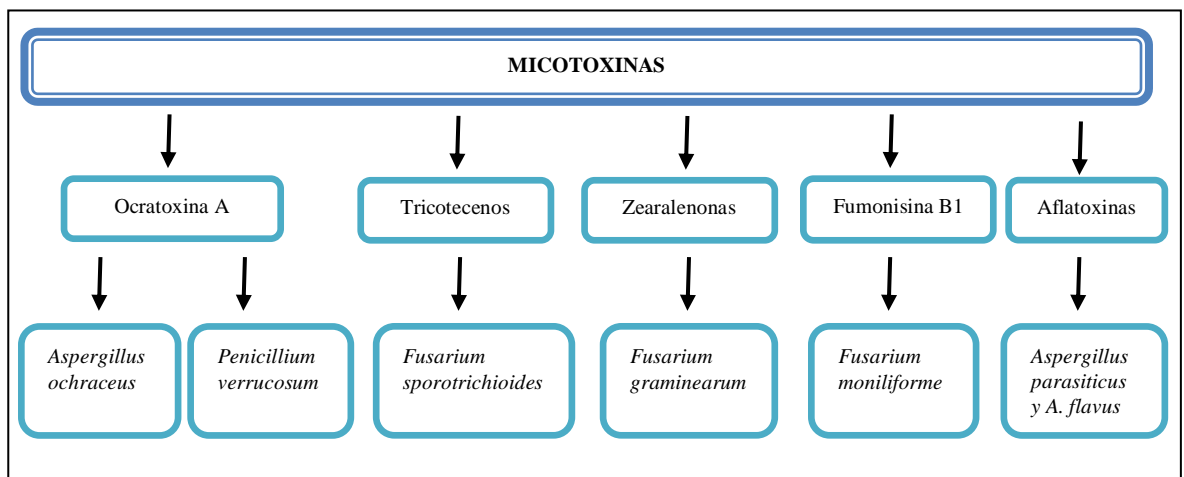
Las muestras fueron analizadas de acuerdo al Anexo 4 titulado Protocolo de Determinación de OTA, utilizando columnas de extracción de fase sólida (SPE) de 3 mL, 500 mg, fase reversa unida a gel de sílica (Octadecyl C<sub>18</sub>). Las ventajas de estas columnas es su bajo costo y los antecedentes previos del Laboratorio de Toxicología en el uso de la extracción de OTA en otras matrices con excelentes resultados.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1. Hongos.

Los principales hongos productores de micotoxinas, conocidos como micotocigénicos, corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Figura 1). Cada uno de estos géneros puede generar diferentes tipos de micotoxinas, de la misma forma que un determinado tipo de micotoxina puede ser producida por diferentes especies de hongos (Miller, 1994).

**Figura 1: Hongos productores de micotoxinas.**



Fuente: Miller, 1994.

El desarrollo de los hongos productores de micotoxinas está condicionado por factores físicos (actividad de agua, temperatura, integridad física del alimento), químicos (pH, composición del sustrato) y biológicos (insectos y ácaros) (Gimeno, 2001).

Estos hongos son los principales responsables de pérdidas económicas que sufren anualmente los cultivos agronómicos, tanto antes como después de su recolección (Benítez, 2005).

## **2.2. Micotoxinas.**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos que se encuentran en forma natural en diversos cultivos agrícolas, que producen efectos perjudiciales en seres humanos y animales (Soriano, 2007).

Los efectos sobre la salud se conoce como micotoxicosis, su gravedad depende de la vía y grado de exposición, edad y estado nutricional del individuo, siendo considerada carcinógena, teratógena, mutágena, nefrotóxica e inmunosupresora, debido al consumo de alimentos contaminados (Valle, 2010).

Las micotoxinas han sido identificadas en una variedad de alimentos como cereales, granos de cebada, centeno, maíz, trigo, café, frutas, nueces y especias. Actualmente se conocen más de 400 micotoxinas diferentes, siendo las principales, ocratoxina A, aflatoxinas y patulina; asociadas a problemas de toxicidad alimentaria (Díaz, 2005).

La mejor manera de conocer el nivel de las diferentes micotoxinas que se ingieren en la dieta, es la determinación de éstas en materias primas y alimentos derivados, listos para consumo. Para la determinación adecuada

de éstos compuestos tóxicos es necesaria la utilización de métodos analíticos sensibles, robustos y reproducibles (Valle, 2010).

Los impactos económicos son pérdidas en la cosecha y almacenamiento, que tienen efectos directos e indirectos en el comercio internacional de productos y alimentos procesados (ICMSF, 1996).

De acuerdo a la Tabla 1 se describen alimentos contaminados con micotoxinas, tales como ocratoxina A, aflatoxinas, citrinina, patulina y ácido ciclopiazónico.

**Tabla 1: Principales hongos y micotoxinas encontradas en diversos alimentos.**

<b>Mohos</b>	<b>Micotoxinas</b>	<b>Alimentos</b>
<i>Aspergillus</i> spp.	Ocratoxina A	Cereales, trigo, cebada, avena, habas, arvejas, maíz, arroz, frutos secos, nueces, almendras semillas, legumbres, pasas, vino, tejidos de animales y derivados lácteos.
	Aflatoxinas	
<i>Penicillium</i> spp.	Ocratoxina A	Frutas y zumos, arroz, queso y cereales.
	Citrinina	
	Patulina	
	Ácido ciclopiazónico	

Fuente: Miller, 1994.

### **2.3. Ocratoxina A.**

OTA es una micotoxina producida por ciertos hongos filamentosos, fue descubierta en África en 1965, por Van der Merwe, al observar su

presencia en muestras de maíz y descrita originalmente como un metabolito de *Aspergillus ochraceus* (Soriano, 2007).

Asimismo en 1973, se confirmó otra especie productora de OTA, *Penicillium verrucosum*, que presenta una distribución amplia en zonas frías y/o templadas, su hábitat son productos almacenados y es capaz de crecer a baja actividad de agua (Larsen *et al.*, 2001).

De acuerdo con la International Commission on Microbiological Specification For Foods (ICMSF) la OTA es la principal toxina producida por *A.ochraceus*, cuyo hábitat natural es la vegetación seca o en descomposición (ICMSF, 1996).

Fue detectada en numerosos alimentos como, cereales, maíz, especias, legumbres, café, cacao, pasas, coco, cerveza y vino, además otros productos de origen animal como los riñones de cerdo (Cabañes, 2006).

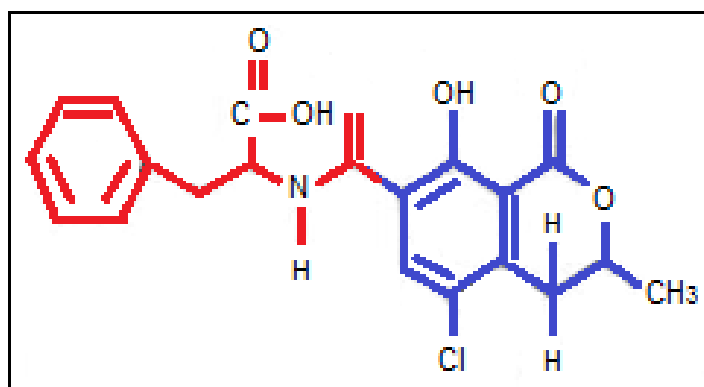
Tiene efecto nefrotóxico e inmunosupresor en ratones, ratas, pollos, perros y cerdo. En consideración a la evaluación realizada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) se concluye que la OTA debe considerarse en la clasificación de riesgo 2B (Camean, 2006).

Es una molécula pequeña, cuyo peso molecular es de 403 g/mol, su estabilidad térmica hasta 180 °C, la toxina pura es un polvo cristalino blanco, soluble en agua, y químicamente está constituida por la combinación de un

aminoácido (fenilalanina) y un policétido al carbono 10 (del metabolismo de las grasas) contiene un átomo de cloro necesario para su actividad biológica (Figura 2).

Es un compuesto fluorescente, muy soluble en disolvente orgánico polar y soluble en bicarbonato sódico (Valenta, 1998). En la Tabla 2 se muestra el nivel regulatorio permitido para OTA.

**Figura 2: Estructura química de Ocratoxina A.**



Fuente: Yoshisawa, 1998.

**Tabla 2: Nivel regulatorio permitido de ocratoxina A.**

Producto	Valor límite (ng/g)
Frutos Secos	20

Fuente: Legislación de la Unión Europea sobre Contenidos Máximos de Micotoxinas en Productos Alimenticios, 2014.

En 1995 se publicó el primer informe sobre la evaluación de la cantidad de OTA presente en los alimentos. Este informe se completó y actualizó en el año 2002 con la participación de 13 países que agruparon los

alimentos en: Cereales (trigo, centeno, cebada, maíz, avena, mijo y arroz), café (verde y procesado), cerveza, vino, productos de cacao, frutos secos, productos cárnicos y especias (Scott, 2002). En la Tabla 3 se detallan el número de muestras analizadas para evaluar la cantidad de OTA en los alimentos.

**Tabla 3: Número de muestras analizadas en cada alimento**

<b>Alimento</b>	<b>N° de muestras</b>	<b>Muestras positivas</b>	<b>Máximo (ug/Kg)</b>	<b>País</b>
<b>Cereales</b>				
Trigo	979	273	31.60	Dinamarca
Centeno	444	236	33.00	Dinamarca
Cebada	142	34	6.40	Reino Unido
Maíz	267	35	4.90	Italia
Avena	164	49	5.90	Reino Unido
Mijo	34	24	0.83	Grecia
Arroz	63	4	1.40	Francia
<b>Café</b>				
Café verde	1704	620	200.90	Grecia
Café procesado	1184	549	11.50	Italia
Cerveza	496	192	0.29	Alemania
Vino	1470	872	15.60	Italia
Cacao	547	445	3.60	Alemania
Frutos secos	800	582	53.60	Reino Unido
Cárnicos	1828	328	9.33	Alemania
Especias	361	188	16.43	Alemania
Otros	4927	2472	16.43	Alemania

Fuente: Scott, 2002.

### 2.3.1. Factores implicados en la producción de ocratoxina A.

En general las especies de hongos productoras de OTA y la producción de la toxina, están influidas por factores climáticos, susceptibilidad del cultivo y daños mecánicos. La actividad de agua ( $a_w$ ) y temperatura se consideran los principales factores que inciden en la proliferación y producción de OTA (Varga *et al.*, 1996). Así mismo, parece tener influencia significativa el pH del medio.

Los límites de crecimiento de *A. ochraceus* y producción de la toxina se detallan en la Tabla 4 y 5 respectivamente:

**Tabla 4: Límites de crecimiento de *A. ochraceus*.**

Descripción	Mínimo	Óptimo	Máximo
pH	2,2	3,8	13
Actividad de agua	0,83	0,95-0,99	>0,99
Temperatura (°C)	8	24-31	37

Fuente: ICMSF, 1996.

**Tabla 5: Límites de producción de toxina por *A. ochraceus*.**

Descripción	Mínimo	Óptimo	Máximo
Actividad de agua	0,77-0,80	0,95-0,99	>0,99
Temperatura (°C)	12	31	37

Fuente: ICMSF, 1996.

También se identifican las condiciones de crecimiento para *Penicillium verrucosum* (Tabla 6).



**Tabla 6: Condiciones de crecimiento para *P. verrucosum*.**

<b>Descripción</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Óptimo</b>	<b>Máximo</b>
Actividad de agua	0,80	0,90	0,99
Temperatura (°C)	0	20	31

Fuente: Pitt y Hocking, 1997.

### **2.3.2. Toxicología.**

La OTA a concentraciones moderadas es nefrotóxica e inmunosupresora. Su toxicidad ha sido estudiada especialmente en porcinos y ratas (Perusia y Rodríguez, 2007).

**a) Patogenia:** El mecanismo de acción toxica de OTA se realiza mediante:

- Alteración de las actividades fundamentales de las mitocondrias, particularmente del tubo contorneado proximal del riñón, que es capaz de desencadenar cambios ultraestructurales y fisiopatológicos, desembocando en severas y mortales nefropatías.
- Inhibición de la glucógenolisis hepática lo cual acarrea acumulación de glucógeno.
- Inhibición de la respuesta inmune humoral y celular.

La ocratoxina A tiene efecto inhibitorio sobre la síntesis proteica y actúa sobre la enzima fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (FPCQ) a nivel renal, degradando el mRNA codificado.

La ocratoxina A es nefrotóxica y muy poco hepatotóxica puesto que el riñón posee más linfocitos que el hígado, siendo éstos considerados más sensibles a la micotoxina en relación a la inhibición de la síntesis proteica.

Las vías de eliminación de OTA se realiza a través de las heces y orina. En esta última, las concentraciones descienden luego de 72 hs.

#### **b) Límite máximo tolerable para OTA en seres humanos.**

Reconociendo la alta toxicidad de OTA, la Comisión Internacional para la Evaluación de Riesgos por Exposición a Micotoxinas estableció provisionalmente el límite máximo tolerable para OTA en seres humanos es de 112 ng/Kg pc/semana. Esta conclusión se basó en el nivel máximo de OTA tolerable en cerdos sin deterioro de la función renal. La Tabla 7 muestra los valores de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de OTA en algunas especies de animales.

**Tabla 7: Valores de dosis letal (DL50) de OTA.**

<b>Especie</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg/Kg de peso corporal)</b>
Perro	0,2
Ratón	46 – 58,3
Pollo	3,3
Pato	0,5
Rata	20 – 30,3
Rata recién nacida	3,9
Cerdo	1,0

Fuente: Mallmann y Dikin, 2007.

### **2.3.3. Control y prevención de la contaminación en productos agrícolas por ocratoxina A.**

OTA afecta un amplio rango de productos agrícolas, que son la base de la economía de muchos países en desarrollo. Esta contaminación se produce como resultado de desfavorables condiciones medioambientales (Comisión del Codex Alimentarius, 2004).

Por esta razón se describen las medidas preventivas antes, durante y después de la cosecha:

**a) Control pre-cosecha:** El manejo adecuado de los cultivos agrícolas implica estrategias agronómicas que se considera el mejor método de control de la contaminación:

- Reducción del estrés sufrido por las plantas (sequía, frío, falta de nutrientes) por medio de irrigación y fertilización de los campos.
- Control de insectos.
- Tratamientos con antifúngicos.

**b) Control durante la cosecha:** Es necesario disponer de equipos para cosechar que funcionen de manera adecuada y causar el menor daño mecánico al producto.

Secado rápido para bajar los niveles de humedad, se considera un punto crítico cuyo control reduce las condiciones favorables de crecimiento y proliferación de hongos.

**c) Control post-cosecha:** Las estrategias post-cosecha (buenas prácticas de almacenaje y manufactura) son fundamentales para garantizar productos seguros al consumidor.

El control de la humedad y la temperatura de almacenamiento de los productos alimenticios determinan el grado de actividad fúngica (Amezqueta *et al.*, 2009).

#### **2.4. Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia HPLC-FL.**

El Instituto de Salud Pública implementó el año 2006, el método de análisis de ocratoxina A por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (High Performance Liquid Chromatography) con detección por fluorescencia HPLC-FL para realizar el estudio en muestras de cereales y derivados (Cornejo y Villarroel, 2006).

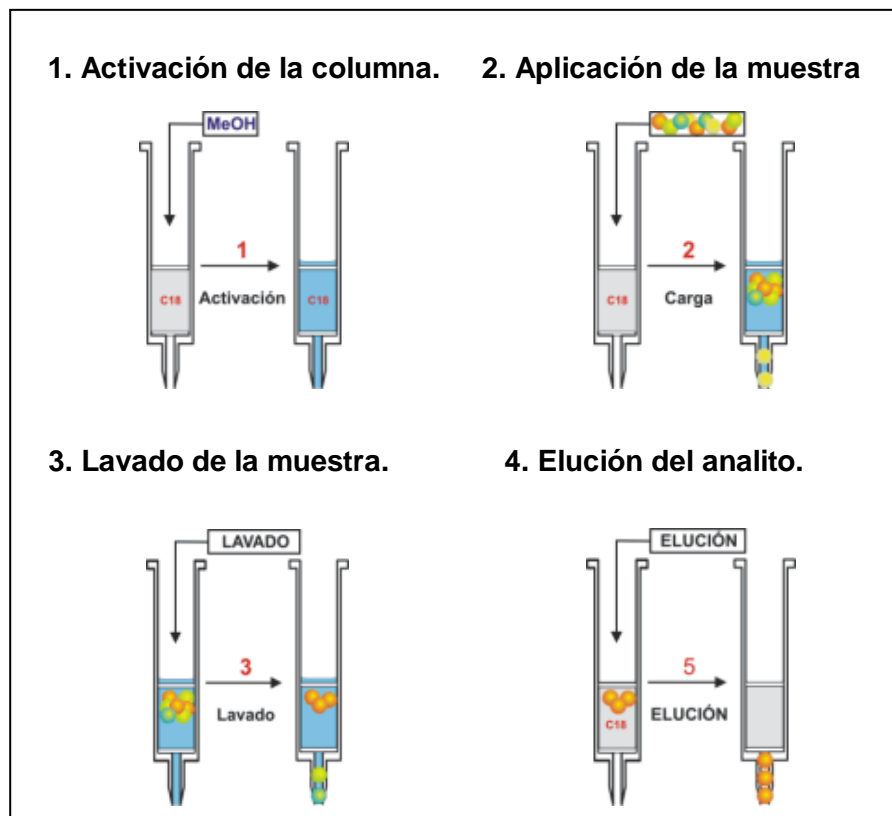
La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es la técnica analítica de separación más utilizada en la actualidad. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su especificidad, lo que permite utilizarla para la identificación de compuestos de primordial interés en la industria. Algunos ejemplos de estos compuestos son: aminoácidos, proteínas, ácidos

nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, toxinas, plaguicidas, antibióticos, esteroides entre otros (Chamberlain, 2000).

### 2.4.1. Columnas de extracción en fase sólida (SPE).

El objetivo principal de la extracción en fase sólida es separar los analitos de la muestra original, consiguiendo una mejor selectividad al eliminar posibles interferentes en la muestra. Estos analitos son adsorbidos y posteriormente recuperados empleando pequeñas cantidades de solvente orgánico para la elución, permitiendo concentrar el analito (Figura 3) (Snyder *et al.*, 1997).

Figura 3: Etapas de la extracción en fase sólida.



Fuente: Snyder *et al.*, 1997.

## **2.5. Producción de almendras y nueces en Chile.**

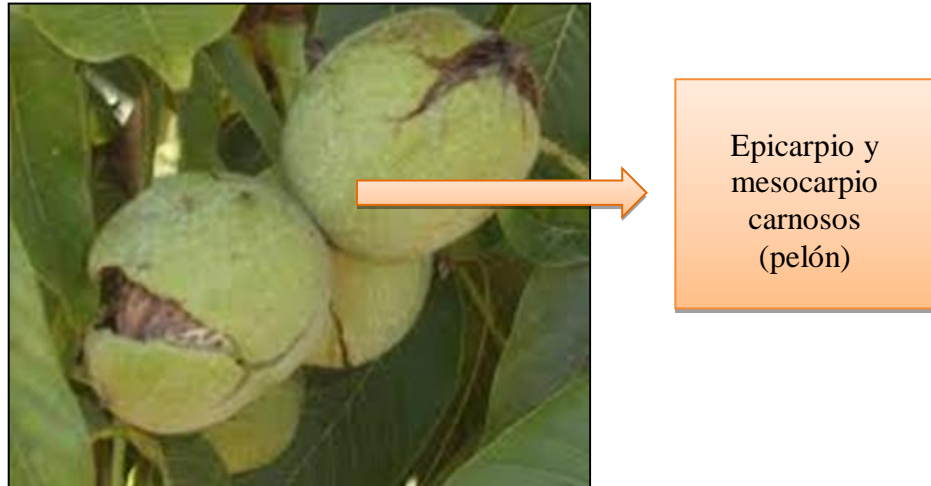
Chile se ha convertido en un importante productor y exportador de almendras y nueces. Una evidencia del rol que tiene en el mercado mundial de frutas secas y deshidratadas es la realización del XXVII Congreso Mundial del Comité Mundial de Frutas Secas del INC (International Nut and Dried Fruit), que se llevó a cabo en Santiago de Chile el año 2008. Este logro responde a una fecunda labor de posicionamiento de todo el sector productor y exportador, lo que ha permitiéndolo ocupar el tercer lugar como exportador de nueces con 8% de las exportaciones mundiales, entre 2002 y 2006, le siguen en importancia Francia, Rumania, India, Alemania e Italia.

Cabe resaltar que Chile no tiene competidores en el hemisferio sur, es capaz de llegar con nueces más frescas y de alta calidad justo para la ventana de mayor demanda en Europa, antes de Navidad. La calidad y momento de llegada al mercado justifican el posicionamiento y buenos precios en los mercados de varios países europeos y asiáticos, además de Brasil, que es un importante consumidor (Reyes, 2008).

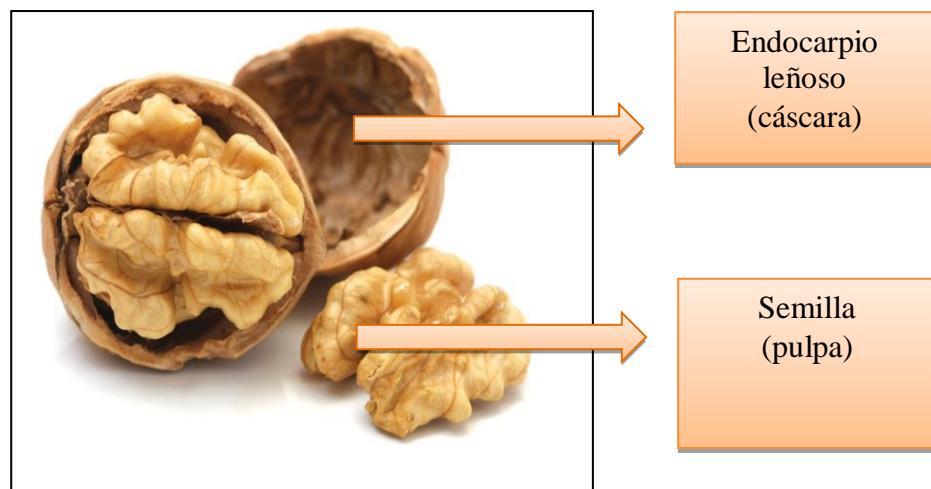
### **2.5.1. Nuez.**

Los frutos de nuez son conocidos genéricamente como frutos secos. La nuez es muy rica en ácidos grasos no saturados, en consecuencia existe riesgo de enranciamiento si la conservación no es adecuada. En la Figura 4 y 5 se muestra la estructura de la nuez.

**Figura 4: Nuez para ser cosechada.**



**Figura 5: Fruto de nuez.**



El cultivo corresponde a una inversión a largo plazo ya que los árboles pueden mantenerse productivos entre 30 a 60 años. La entrada a plena producción es más lenta ya que los primeros frutos comienzan a aparecer entre el tercer y cuarto año, alcanzando su plena producción entre el séptimo y octavo año con una producción promedio de huerto de 5.000 kilos por ha.

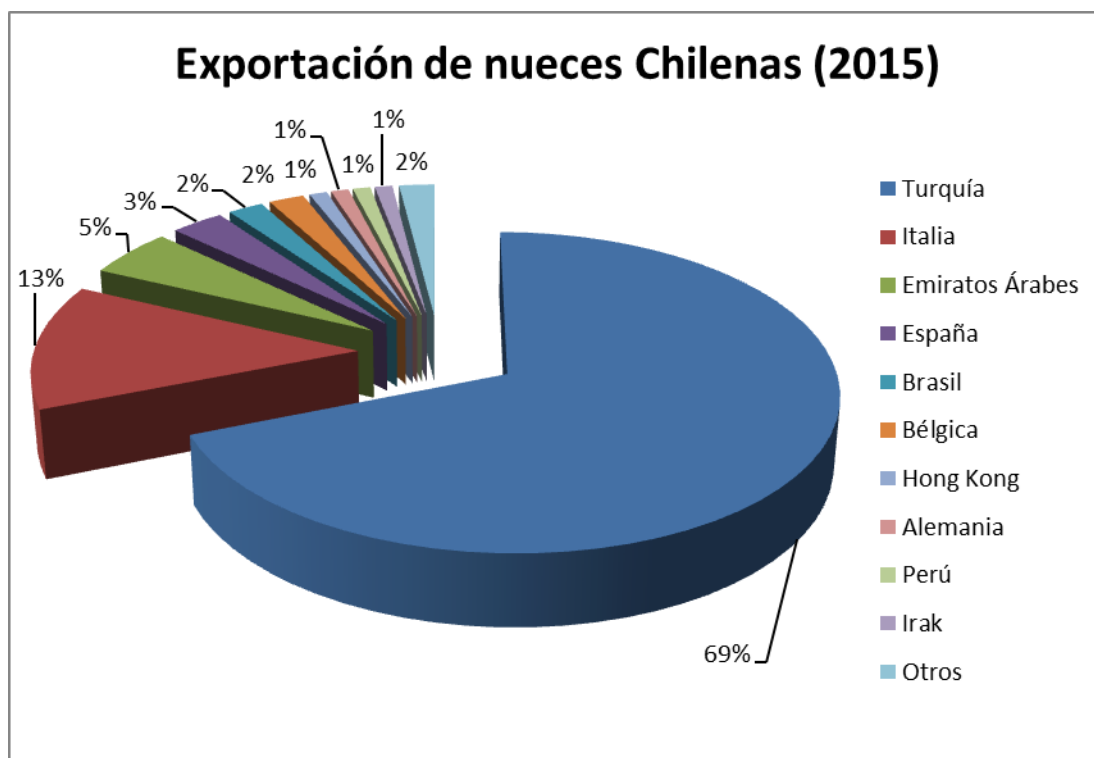
La mayoría de las plantaciones están localizadas en las regiones V, VI y Metropolitana, en sectores de clima templado que favorecen la producción de alta calidad. En relación a la calificación del producto, los principales criterios para definir su calidad son una cáscara bien sellada, un volumen comestible fresco y un color claro.

La nuez se encuentra lista para ser cosechada una vez que la cubierta comienza a abrirse, recién cosechadas contienen una humedad aproximada de 25-30% y es necesario que se disminuya hasta cerca del 4% antes de almacenarlas, para poder ser preservadas adecuadamente. La temporada de las nueces en Chile es a partir de Marzo/Abril hasta Octubre, las variedades más comercializadas son Chandler, Serr.

El Ministerio de Relaciones Exteriores encargada de la promoción de la oferta exportable en Chile, reconoce que el valor de las exportaciones de nueces se ha movido entre USD 31 millones y USD 110 millones en los últimos cinco años, mostrando una tendencia continua al alza. Este último año las exportaciones de nueces de nogal con cáscara, van destinadas en primer lugar a Turquía, seguida por Italia, Emiratos Árabes, entre otros (Figura 6) (CHILENUT, 2014b).



**Figura 6: Exportación de nuez.**



Fuente: CHILENUT, 2015.

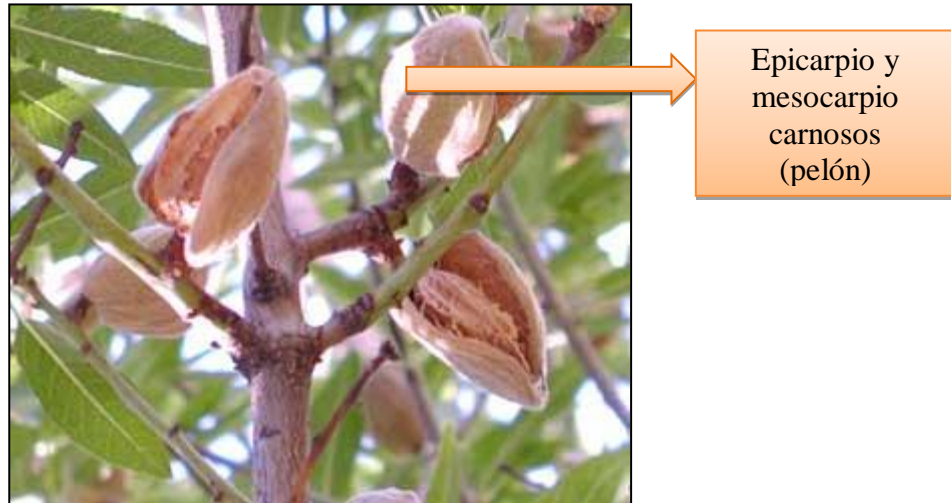
### **2.5.2. Almendra.**

El almendro es un árbol frutal, la distribución por regiones muestra que la principal región productora es la Metropolitana, con un 46,4%, seguida por las regiones O'Higgins, Valparaíso y Coquimbo con un 34,04%, 10,41% y 7,29%, respectivamente.

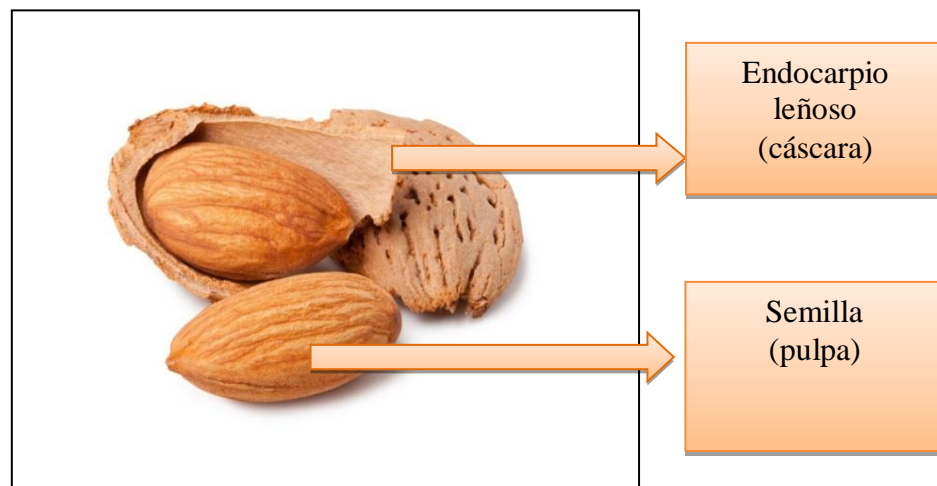
Actualmente las producciones aproximadas son de 2.800 a 3.200 kilos por hectárea a partir del séptimo año (plena producción). Las variedades existentes en Chile son de origen californiano y europeo, se encuentran variedades de cáscara blanda (Non Pareil, Merced, Carmel), de cáscara dura (Drake Seedling) y de cáscara semi dura (Texas, Ruby). El 47% de la

superficie plantada es de cáscara blanda, seguida por cáscara semi dura. En la Figura 7 y 8 se muestra la estructura de la almendra.

**Figura 7: Almendra para ser cosechada.**



**Figura 8: Fruto de almendra.**

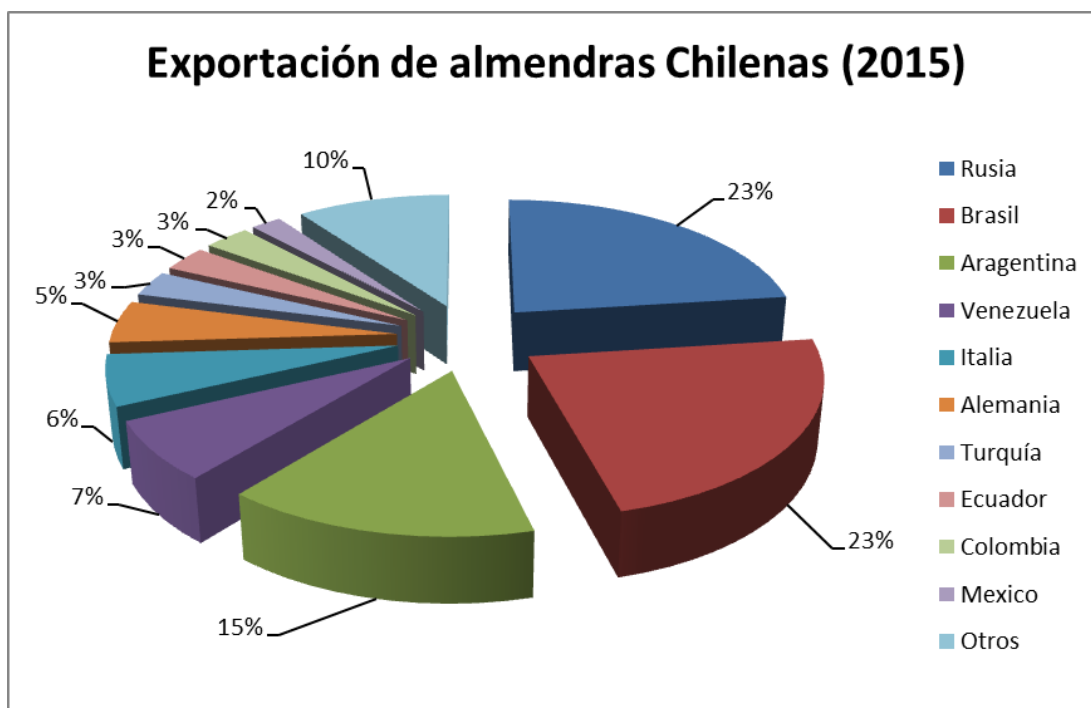


La almendra se encuentra lista para ser cosechada una vez que la cubierta externa comienza a abrirse, recién cosechadas contienen una humedad aproximada de 15-25% y es necesario disminuir hasta cerca de

4% antes de almacenarlas, para poder ser preservadas adecuadamente. La temporada de las almendras en Chile es a partir de Marzo hasta Octubre.

El valor de las exportaciones chilenas de almendras se ha movido entre USD 34 millones y USD 60 millones en los últimos cinco años, lo que muestra el desarrollo que ha tenido el mercado internacional de almendras y de los frutos secos en general. Este último año, las exportaciones de almendras van destinadas en primer lugar a Rusia, seguida por Brasil, Argentina, entre otros (Figura 9) (CHILENUT, 2014a).

**Figura 9: Exportación de almendra.**



Fuente: CHILENUT, 2015.

### **3. HIPOTESIS.**

- La concentración de ocratoxina A presente en almendras y nueces recolectadas, supera el límite máximo permisible por la Legislación de la Unión Europea.

### **4. OBJETIVOS.**

#### **4.1. Objetivo General.**

- Determinar la contaminación con ocratoxina A, en la producción primaria de almendras y nueces obtenidas en dos centros de producción nacional.

#### **4.2. Objetivos Específicos.**

- Validar la reproducibilidad del método analítico en Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia (HPLC-FL) del laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.
- Determinar mediante el uso de metodología HPLC-FL la contaminación por OTA, en muestras de almendras y nueces recolectadas.
- Determinar los puntos de contaminación con OTA, en el proceso de recolección de muestras de almendras y nueces.

## **5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.**

### **5.1. Lugar e infraestructura.**

El desarrollo de la presente tesis se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **5.2. Materiales.**

- Probetas de 50 mL a 1000 mL.
- Balón volumétrico de 5 mL a 10 mL.
- Embudos de filtración de vidrio.
- Pipetas volumétricas de 5 mL a 10 mL.
- Vaso de vidrio para licuadora de 500 mL.
- Micropipetas Gilson, 100-1000 $\mu$ L y 10-100 $\mu$ L.
- Puntas para micropipetas automáticas.
- Papel filtro de 12,5 cm de diámetro Whatman 4.

### **5.3. Equipos.**

- 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.

- Columnas de Extracción de Fase Solida SPE de 3 mL. (Bakerbond, Octadecyl C<sub>18</sub>) 500 mg unida a gel Silica.
- Columna analítica marca Phenomenex: Luna C<sub>18</sub>, 250 x 2.00 mm 5μ.
- Centrifuga Thermo Electron Corporation.
- Balanza de capacidad para 4200 g y precisión ± 0.01 g (Shimadzu UW 4200H).
- Baño maria (Kotterman)
- Licuadora (Osterizzer).
- Molino de grano, acero inoxidable

#### **5.4. Reactivos.**

- Standard Ochratoxin A from *Aspergillus ochraceus*. (Sigma), (1 mg), ≥ 98% pureza.
- Acetonitrilo y metanol J.T. Baker, grado HPLC.
- Ácido acético, pureza de 99.8%
- Gas nitrógeno de 99.9% de pureza

## **6. METODOLOGIA.**

### **6.1. Localización geográfica:**

Se recolectaron muestras de almendras y nueces en los centros de producción de las Regiones de O'Higgins y Valparaíso respectivamente (Figura 10).

#### **6.1.1. Trabajo en campo:**

##### **Toma de muestras.**

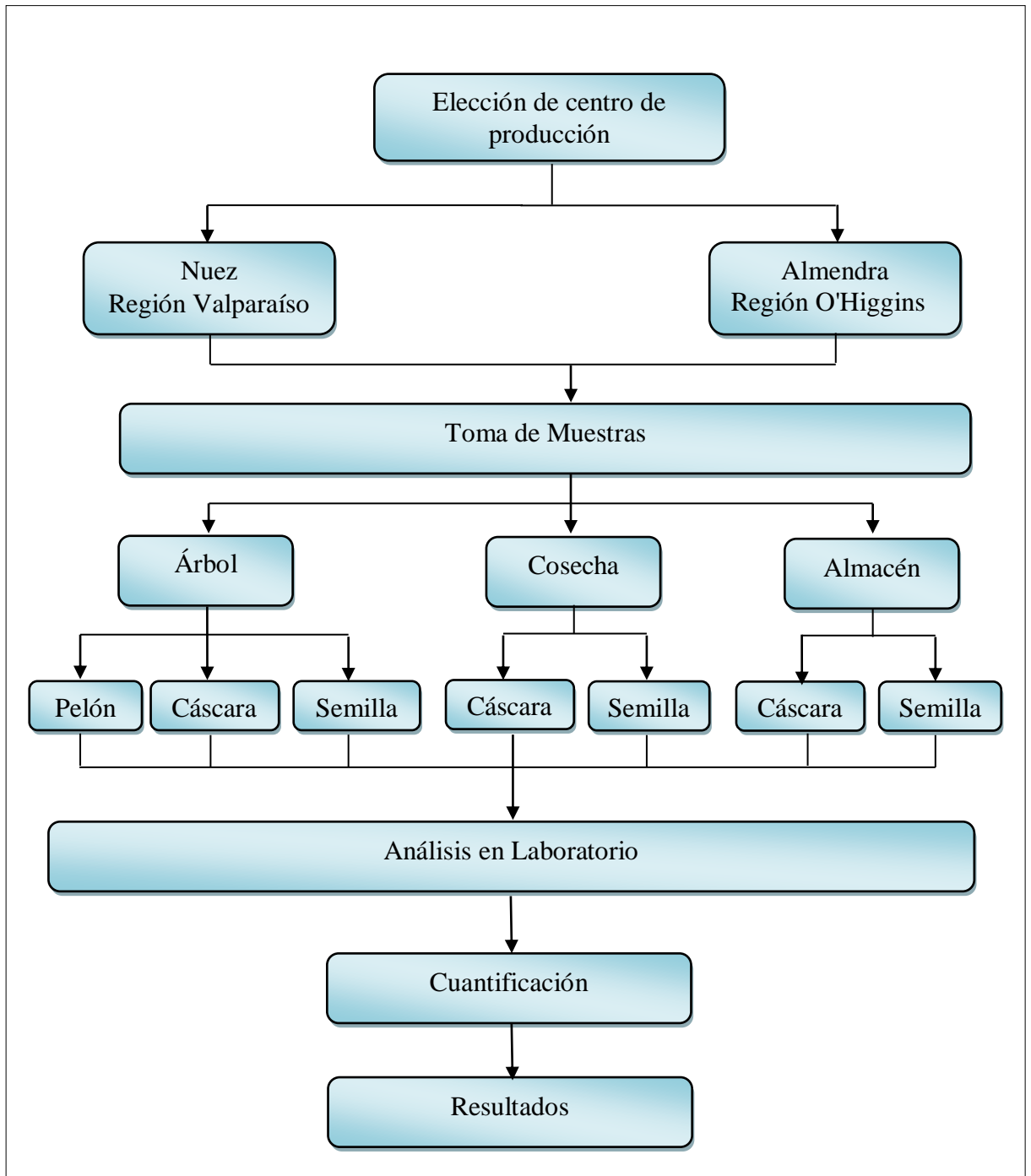
El muestreo se realizó en 3 segmentos (árbol, cosecha y almacén) de los cuales se analizaron semilla, cáscara y pelón, de cada matriz en estudio.

#### **6.1.2. Trabajo en laboratorio:**

Todas las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, las condiciones de análisis fueron la siguiente: temperatura de trabajo de 24 °C, un solo equipo HPLC, todos los instrumentos utilizados están controlados bajo Norma Nch-ISO 17025/2005.

Los resultados finales se cuantificaron mediante el Software Shimadzu Estación de Trabajo LC [Labsolutions/ LCsolution].

**Figura 10: Secuencia de actividades.**





## 6.2. Particularidades del cultivo de la nuez.

**6.2.1. Fertilización:** El nogal es muy exigente en nitrógeno y más moderado en cuanto a fósforo y potasio, Tabla 8. Es preciso fertilizar con regularidad para obtener una buena producción de nueces.

**Tabla 8: Requerimiento de fertilizante.**

Nutrientes	Fertilización
Nitrato	1,80 Kg/árbol y año
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,495 Kg/árbol y año
K <sub>2</sub> O	0,440 Kg/árbol y año
Estiércol	40 – 60 Tm/ha

Fuente: Nocedal Santa Amalia de lo Vicuña, 2015.

**6.2.2. Control de plagas y enfermedades:** Las aplicaciones fitosanitarias se realizan siguiendo el programa de control de plagas y enfermedades. Los principales productos utilizados se detallan en la Tabla 9.

**Tabla 9: Productos utilizados en el control de plagas y enfermedades**

Control	Materia activa	Dosis	Presentación producto
Plaga	Dimetoato 10% + MetilAzinfos 20%	0,20%	Polvo mojable
	Fosmet 20 %	0,30%	Concentrado emulsionable
	Tebufenocida 24%	0,05–0,06%	Suspensión concentrada
Enfermedades	Mancozeb 45%	0,35-0,55%	Suspensión concentrada
	Zibeb 80%	0,25%	Polvo mojable
	Ziram 76%	0,25-0,35%	Granulado dispersable en agua

Fuente: Nocedal Santa Amalia de lo Vicuña, 2015.

**6.2.3. Secado de nuez:** Las nueces recién cosechadas tienen una humedad entre 25-30%. Antes de ser almacenadas es necesario reducir hasta cerca del 4% con un sistema de aire caliente y se va realizando mediciones en un equipo de marca Steinlite modelo SB900 que es un analizador de humedad dieléctrico rápido y preciso.

### **6.3. Descripción muestreo de nuez.**

Las muestras de nuez se recolectaron en el nocedal denominado “Santa Amalia de lo Vicuña” ubicado en la localidad de Putaendo, Región de Valparaíso cuyas características geográficas son:

Provincia	: San Felipe de Aconcagua
Latitud	: -32.6278
Longitud	: -70.7167
Coordenadas	: 32° 37' 40" Sur, 70° 43' 0" Oeste
Altitud	: 803 m
Superficie	: 1.474,00 km <sup>2</sup>
Clima	: Clima mediterráneo

Este centro de producción tiene una extensión total de 11 ha, distribuidos en 9 cuartos (Figura 11) y toda la producción de nueces son de la variedad Serr. La recolección de las muestras se realizó el 7 de Abril del 2015 y las condiciones climáticas durante el muestreo fueron:

°T máx. = 22 °C y °T mín. = 13 °C.

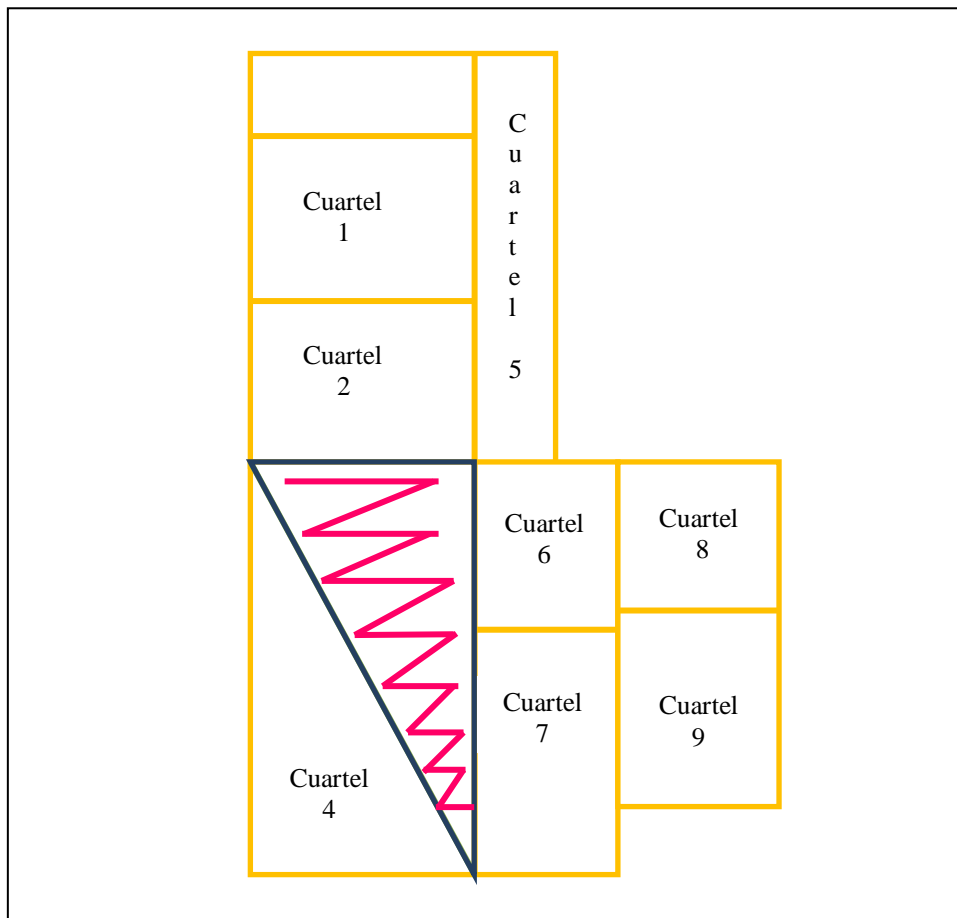
Humedad: 44-100%

### 6.3.1. Muestreo en árbol.

Se seleccionó el cuartel 3, que tiene una extensión de 1,4 ha aplicándose un muestreo en forma de “W o Z” según Food and Veterinary Office, 2008.

El muestreo se realizó de 28 árboles, recolectando 60-65 nueces con pelón por cada árbol seleccionado (Tabla 10).

**Figura 11: Distribución esquemática del nocedal “Santa Amalia de lo Vicuña”**



Fuente: Nocedal Santa Amalia de lo Vicuña, 2015.

**Tabla 10: Cantidad de análisis según segmento (árbol).**

<b>Variedad</b>	<b>Estructura de la nuez</b>	<b>N° de análisis</b>	<b>Descripción</b>
Serr	Pelón	15	De un total de 28 árboles seleccionados aleatoriamente, se tomaron 15 muestras de pelón.
	Cáscara	15	De un total de 28 árboles seleccionados aleatoriamente, se tomaron 15 muestras de cáscara.
	Semilla	28	De un total de 28 árboles seleccionados aleatoriamente, se tomaron 28 muestras de semilla.
Número de análisis		58	Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### **6.3.2. Muestreo en cosecha.**

La recolección de muestras de nuez sin pelón se realizó de un lote de 80 sacos cosechados procedente del cuartel 6 (Tabla 11).

Del lote de 80 sacos de 20 Kg, se tomaron de manera aleatoria 4 muestras representativas de aprox. 1,5 Kg cada una, según Reglamento CE N° 401/2006.

### **6.3.3. Muestreo en almacén.**

Solo se encontró un saco de nuez rezagado de la cosecha de Abril del 2014, del cual se tomó una muestra representativa de nueces con cáscara de aprox. 1 Kg (Tabla 12).

La temperatura y humedad relativa de almacenamiento fueron condiciones ambientales.

**Tabla 11: Cantidad de análisis según segmento (cosecha).**

Variedad	Estructura de la nuez	N° de análisis	Descripción
Serr	Semilla	4	De un total de 80 sacos cosechados, se tomó 4 muestras aleatoriamente de 1,5 Kg cada una.
	Cáscara	4	
Número de análisis		8	Todos los análisis se realizaron por duplicado.

**Tabla 12: Cantidad de análisis según segmento (almacén).**

Variedad	Estructura de la nuez	N° de análisis	Descripción
Serr	Semilla	1	Del único saco de nuez con cáscara, se tomó 1 muestra de 1 Kg.
	Cáscara	1	
Número de análisis		2	Todos los análisis se realizaron por duplicado.

#### 6.3.4. Muestras de laboratorio.

Para determinar la presencia de OTA en el tiempo, se tomó 60 nueces con cáscara que sobraron del muestreo en cosecha y se almacenó en el Laboratorio de Toxicología durante 3 meses a temperatura controlada de 24 °C, para realizar 3 análisis en semilla y cáscara con intervalo de 15 días cada uno (Tabla 13) con la finalidad de encontrar la presencia de la toxina.

**Tabla 13: Análisis realizados en muestras de laboratorio.**

Variedad	Estructura de la nuez	Número de muestra	Número de análisis	Día de análisis
Serr	Semilla	10 nueces	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días
		10 nueces	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días
		10 nueces	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días
	Cáscara	10 nueces	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días
		10 nueces	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días
		10 nueces	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días

La Tabla 14, muestra el resumen de análisis para los distintos segmentos (árbol, cosecha y almacén).

**Tabla 14: Resumen de análisis en muestras de nueces.**

Segmento de muestreo	Estructura de la nuez	Nº de muestras	Nº de análisis	Análisis en duplicado.
<b>Árbol</b>	Semilla	28	28	56
	Cáscara	15	15	30
	Pelón	15	15	30
<b>Cosecha</b>	Semilla	4	4	8
	Cáscara	4	4	8
<b>Almacén</b>	Semilla	1	1	2
	Cáscara	1	1	2
<b>Muestras de laboratorio</b>	Semilla	1	3	6
	Cáscara	1	3	6
<b>Total de análisis</b>		<b>69</b>	<b>71</b>	<b>142</b>

#### 6.4. Particularidades del cultivo de almendra.

**6.4.1. Fertilización:** La aplicación de fertilizantes sigue un plan de fertilización, elaborado en base a resultados del balance nutricional, mediante el uso de información de análisis de suelo, agua, foliares, edad de los árboles, antecedentes de fertilización y cosecha de los últimos cuatro ciclos (Tabla 15).

**Tabla 15: Requerimiento de fertilizante.**

Nutrientes	Fertilización
Nitrato	250 g/árbol y año
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	150 g/árbol y año
K <sub>2</sub> O	130 g/árbol y año

Fuente: Fundo El Rosario de Llope, 2015.

**6.4.2. Control de plagas y enfermedades:** En el fundo el Rosario de Llope se aplican controles fitosanitarios. En la Tabla 16 se describen los principales productos, para que la almendra se mantenga sana y la hoja trabaje en forma efectiva en el proceso final de maduración.

**6.4.3. Secado de almendra:** Las almendras recién cosechadas tienen una humedad entre 15-25%. Son secadas hasta cerca del 4% por un sistema de aire caliente, la temperatura de secado es alrededor de 70 °C en la parte superior y 50 °C en la parte inferior. Se va realizando mediciones con el medidor de humedad (Higrómetro) de marca FACMA, fabricación Italiana.

**Tabla 16: Productos utilizados en el control de plagas y enfermedades**

<b>Control</b>	<b>Materia activa</b>	<b>Dosis</b>	<b>Presentación producto</b>
<b>Plaga</b>	Carbanil 48%	0,25-0,30%	Suspensión concentrada
	Metidation 30%+Piridafention 20%	0,10-0,20%	Concentrado emulsionable
	Napropamida 50%	0,20-0,25%	Polvo mojable
	Fosalon 30%	0,20%	Polvo mojable
<b>Enfermedades</b>	Captan 40%+Carbendazima 8%	0,30%	Polvo mojable
	Mancozeb 42%	0,35-0,605	Suspensión concentrada
	Procimidona 50%	0,10%	Polvo mojable
	Benomilo	0,05-0,10%	Polvo mojable

Fuente: Fundo El Rosario de Llope, 2015.

### **6.5. Descripción de muestreo en almendras.**

Las muestras de almendra se recolectaron en el fundo denominado “El Rosario de Llope” ubicado en la localidad de Pumanque, Región Libertador Bernardo O'Higgins cuyas características geográficas son:

Provincia : Colchagua  
 Latitud : -34.6,  
 Longitud : -71.6667  
 Coordenadas : 34° 36' 0" Sur, 71° 40' 0" Oeste  
 Altitud : 93 m  
 Clima : Clima mediterráneo



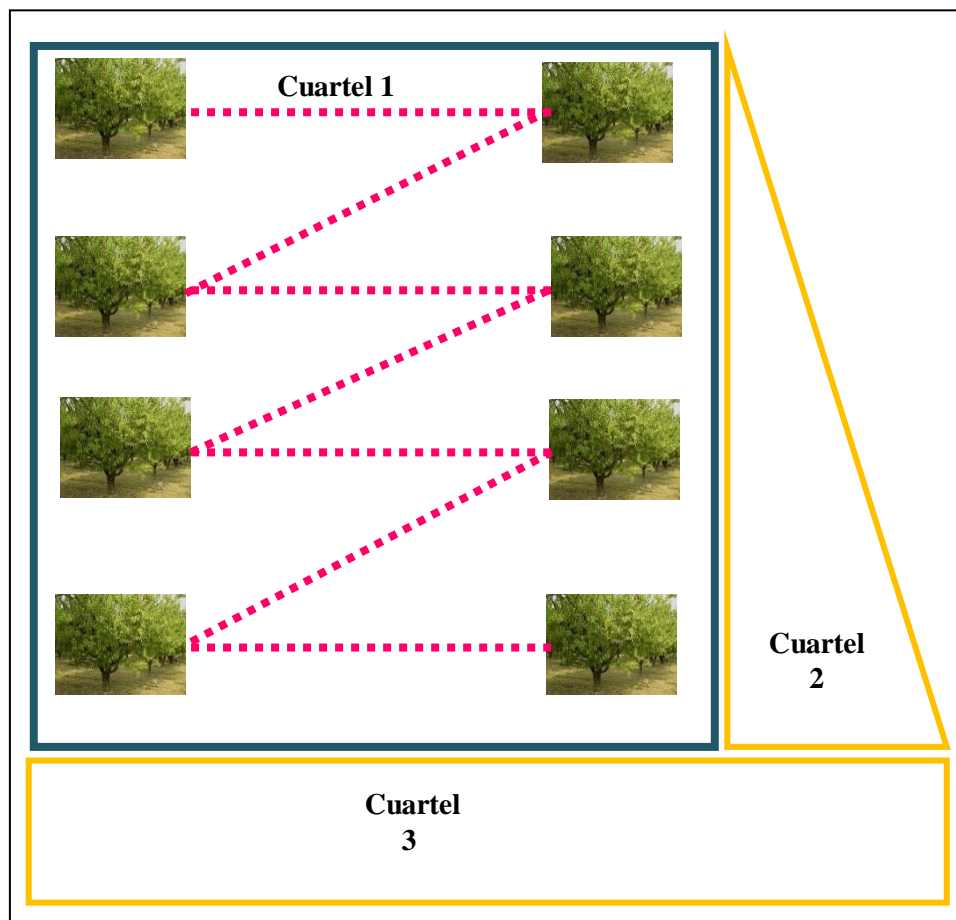
Este centro de producción tiene una extensión total de 6 ha, distribuidos en 3 cuartel (Figura 12) y toda la producción de almendras son de la variedad Non Pareil.

La recolección de las muestras se realizó el 20 de mayo del 2015 y las condiciones climáticas durante el muestreo fueron:

°T máx. = 13 °C y °T mín. = 2 °C.

Humedad: 43-100%.

**Figura 12: Distribución esquemática del fundo “El Rosario de Llope”**



Fuente: Fundo El Rosario de Llope, 2015.

### 6.5.1. Muestreo en árbol.

Se seleccionó el cuartel 1, que tiene una extensión de 1,2 ha aplicándose un muestreo en forma de “W o Z” según Food and Veterinary Office, 2008. El muestreo se realizó en 15 árboles, recolectando una cantidad representativa entre (100-120) almendras con pelón por cada árbol seleccionado (Tabla 17).

**Tabla 17: Cantidad de muestra analizada según segmento (árbol).**

Variedad	Estructura de almendra	N° de análisis	Descripción
Non Pareil	Pelón	10	De un total de 15 árboles seleccionados aleatoriamente, se tomaron 10 muestras de pelón.
	Cáscara	10	De un total de 15 árboles seleccionados aleatoriamente, se tomaron 10 muestras de cáscara.
	Semilla	15	De un total de 15 árboles seleccionados aleatoriamente, se tomaron 15 muestras de semilla.
Número de análisis		35	Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### 6.5.2. Muestreo en cosecha.

La recolección de muestras de almendras cosechadas sin pelón se realizó de un lote de 12 sacos procedente del cuartel 2 de la producción del 2015 (Tabla 18). Del lote de 12 sacos de 15 Kg, se tomaron de manera aleatoria 4 muestras representativas de aprox. 1Kg según Reglamento CE N° 401/2006.

**Tabla 18: Cantidad de muestra analizada según segmento (cosecha).**

<b>Variedad</b>	<b>Estructura de la nuez</b>	<b>N° de análisis</b>	<b>Descripción</b>
Non Pareil	Semilla	4	De un total de 12 sacos cosechados, se tomó 4 muestras aleatoriamente de 1 Kg cada una.
	Cáscara	4	
Número de análisis		8	Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### **6.5.3. Muestreo en almacén.**

La recolección se realizó de un lote de 4 sacos que se encontraba cosechado procedente del cuartel 2 de la producción del 2015. De éste lote de 4 sacos de 15 Kg cada uno, se tomaron 2 muestras representativas de aprox. 0,5 Kg cada una (Tabla 19) y la temperatura de almacenamiento fueron condiciones ambientales.

**Tabla 19: Cantidad de muestra analizada según segmento (almacén).**

<b>Variedad</b>	<b>Estructura de la nuez</b>	<b>N° de análisis</b>	<b>Descripción</b>
Non Pareil	Semilla	2	De 4 sacos almacenados, se tomó 2 muestras aleatoriamente de 0.5 Kg cada una.
	Cáscara	2	

### **6.5.4. Muestras de laboratorio.**

Para determinar la presencia de OTA en el tiempo, se tomó 60 nueces con cáscara que sobraron del muestreo en cosecha y se almacenó en el Laboratorio de Toxicología durante 3 meses a temperatura controlada de 24

°C, para realizar 3 análisis en semilla y cáscara con intervalo de 15 días cada uno (Tabla 20) con la finalidad de encontrar la presencia de la toxina.

**Tabla 20: Análisis realizados en muestras de laboratorio.**

<b>Variedad</b>	<b>Estructura de la nuez</b>	<b>Número de muestra</b>	<b>Número de análisis</b>	<b>Día de análisis</b>
Non Pareil	Semilla	15 almendras	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días
		15 almendras	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días
		15 almendras	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días
	Cáscara	15 almendras	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días
		15 almendras	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días
		15 almendras	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días

La Tabla 21, muestra el resumen de análisis para los distintos segmentos (árbol, cosecha y almacén).

**Tabla 21: Resumen de análisis en muestras de almendras.**

<b>Segmento de muestreo</b>	<b>Estructura almendra</b>	<b>Nº de muestras</b>	<b>Nº de análisis</b>	<b>Análisis en duplicado.</b>
<b>Árbol</b>	Semilla	15	15	30
	Cáscara	10	10	20
	Pelón	10	10	20
<b>Cosecha</b>	Semilla	4	4	8
	Cáscara	4	4	8
<b>Almacén</b>	Semilla	2	2	4
	Cáscara	2	2	4
<b>Análisis en laboratorio</b>	Semilla	1	3	6
	Cáscara	1	3	6
<b>Total de análisis</b>		<b>49</b>	<b>53</b>	<b>106</b>

## 6.6. Acondicionamiento de muestras.

Una vez culminado el trabajo en campo y previo al análisis, todas las muestras de almendras y nueces fueron acondicionadas en el Laboratorio de Toxicología.



**Recepción de muestras:** Se verificó que todas las muestras se encuentren con la etiqueta claramente identificadas.



**Pelado del pelón:** Se realizó de forma manual utilizando guantes, evitando posible contaminación cruzada. Se pesó 160 gr de pelón por cada muestra para los análisis correspondientes.



**Lavado y secado de cáscara:** El lavado se realizó con agua a chorro continuo para eliminar materias extrañas e inmediatamente se secó para evitar que la humedad penetre a la semilla.



**Descascarado:** Con la ayuda de un martillo se realizó el pelado de la cáscara, la etapa anterior evitó que se produzca contaminación cruzada de cáscara a semilla.



**Limpieza de semilla:** Se eliminó los trozos de cáscara. Se pesó 180 gr de semilla por cada muestra para los análisis correspondientes.



**Etiquetado:** Todas las muestras separadas (semilla, cáscara y pelón) fueron etiquetadas para tener un control y trazabilidad. La información que contiene la etiqueta se describe en la Figura 13.



**Almacenado:** Todas las muestras de ambas matrices fueron almacenadas bajo refrigeración entre (2 - 5 °C) hasta realizar los respectivos análisis.

**Figura 13: Información contenida en la etiqueta de las muestras.**

Código/ Nombre:-----
Fecha de cosecha:-----
Fecha de toma de muestra:-----
Nombre del recolector:-----
Observación organoléptica:
-Color:-----
-Aspecto:-----
-Otros:-----
Identificación geográfica:
-Nombre del lugar:-----
-Nombre empresa:-----

### **6.7. Análisis de las muestras.**

La determinación de la contaminación por OTA de las matrices en estudio, se realizó de acuerdo al Procedimiento de Extracción de Ocratoxina A, descrito en el Anexo 4. Este procedimiento fue desarrollado y validado por el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El resultado final de este trabajo de investigación aún no ha sido publicado.



## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Linealidad del método.

#### 7.1.1. Linealidad del método en la matriz de nuez.

- El método fue lineal en un rango de concentración de 1,5 a 10,0 ng/g.
- La Tabla 22 muestra los resultados de la respuesta cromatográfica expresada en área obtenida en cada punto de concentración.

**Tabla 22: Respuesta cromatográfica de nuez fortificada con OTA.**

Concentración	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
1,5	293058	303163	310649	302290
2,5	478430	505272	517748	500483
5,0	959185	970914	996810	975636
7,0	1350343	1413757	1458421	1407507
10,0	2009062	2083458	2019653	2037391

Con el promedio de las áreas y las concentraciones de trabajo se realizó el gráfico de la curva de calibración para OTA en extracto de nuez fortificada (Figura 14); el cual demuestra que es directamente proporcional en consecuencia el método es lineal.

**Figura 14: Curva de calibración de nuez fortificada con OTA.**

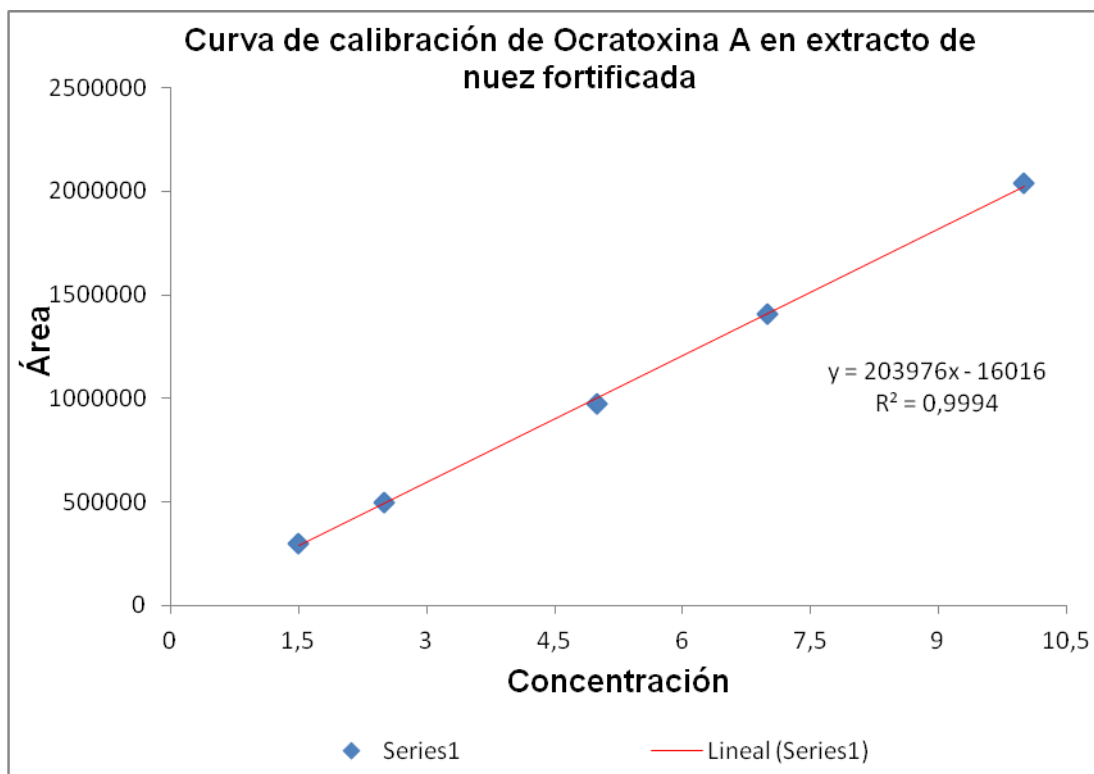


Tabla 23 muestra los resultados de los cálculos para determinar el coeficiente de correlación ( $r$ ), límite de detección (LD) y cuantificación (LC) de acuerdo a las ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente, que se describen en el Anexo 1.

**Tabla 23: Componentes de linealidad del método.**

Coeficiente de correlación ( $r$ )	Coeficiente de determinación ( $r^2$ )	Límite de Detección LD (ng/g)	Límite de Cuantificación LC (ng/g)
0,99977	0,99953	0,16	0,35

### 7.1.2. Linealidad del método en la matriz de almendra.

- El método fue lineal en el rango de concentración de 1,5 a 10,0 ng/g.
- La Tabla 24 muestra los resultados de la respuesta cromatográfica expresada en área obtenida en cada punto de concentración.

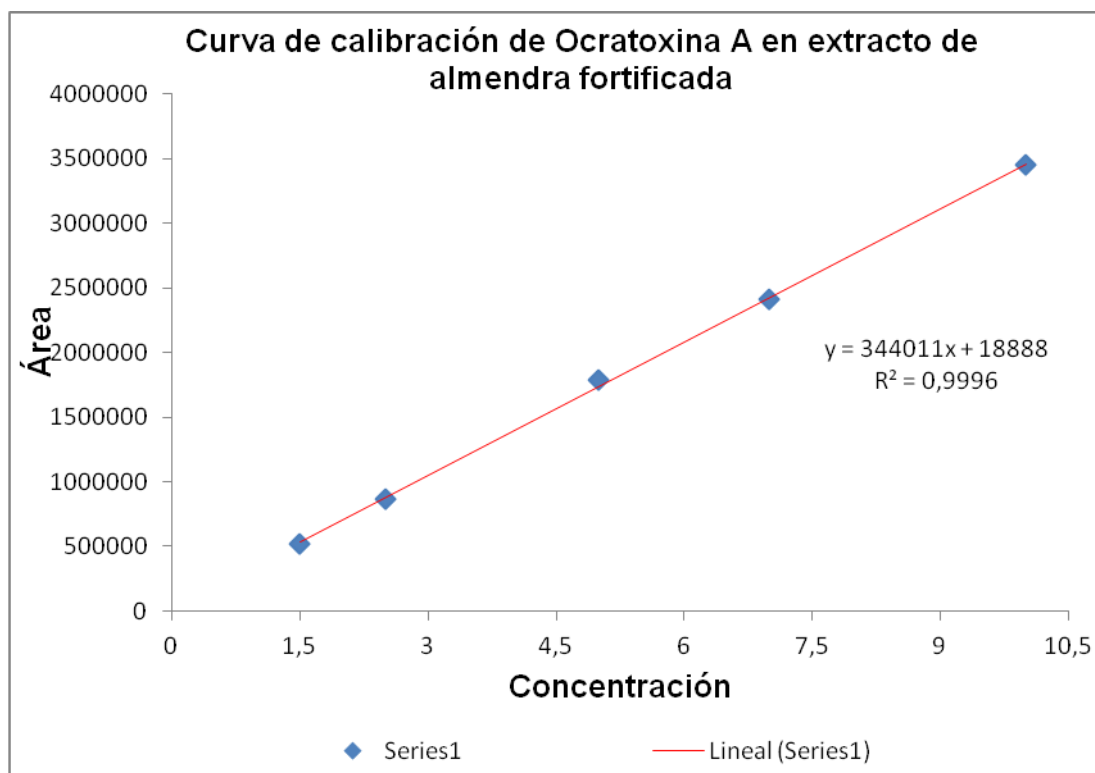
**Tabla 24: Respuesta cromatográfica de almendra fortificada con OTA.**

Concentración	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
1,5	531383	509776	523914	521691
2,5	885639	849626	873190	869485
5,0	1765104	1789058	1794218	1782793
7,0	2393308	2420975	2430426	2414903
10,0	3419011	3458535	3472037	3449861

Con el promedio de las áreas y las concentraciones de trabajo se realizó el gráfico de la curva de calibración para OTA en extracto de almendra fortificada (Figura 15); el cual demuestra que es directamente proporcional en consecuencia el método es lineal.

Tabla 25 muestra los resultados de los cálculos para determinar el coeficiente de correlación (r), límite de detección (LD) y cuantificación (LC) respectivamente.

**Figura 15: Curva de calibración de almendra fortificada con OTA.**



**Tabla 25: Componentes de linealidad del método.**

Coeficiente de correlación ( r )	Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	Límite de Detección LD (ng/g)	Límite de Cuantificación LC (ng/g)
0,99984	0,99969	0,14	0,29

## 7.2. Recuperación.

- Las concentraciones de trabajo y los resultados obtenidos para la recuperación de OTA en muestras de nueces y almendras fortificadas con 10,0; 5,0 y 2,5 ng/g se detallan en las Tablas 26 y 27 respectivamente.

- Los porcentajes de recuperación de OTA en las matrices fortificadas fue calculado de acuerdo a la ecuación Ec. 4 que se detalla en el Anexo 1.

**Tabla 26: Cálculo de la recuperación de OTA en nuez fortificada.**

Nivel de trabajo	Valor Teórico (ng/g)	Valor promedio encontrado (ng/g)	Recup. (%)	Promedio (%)
Bajo	2,5	2,46	98,30	96,24
Medio	5,0	4,78	95,67	
Alto	10,0	9,48	94,75	

**Tabla 27: Cálculo de la recuperación de OTA en almendra fortificada.**

Nivel de trabajo	Valor Teórico (ng/g)	Valor promedio encontrado (ng/g)	Recup. (%)	Promedio (%)
Bajo	2,5	2,44	97,58	95,76
Medio	5,0	4,80	95,91	
Alto	10,0	9,38	93,78	

El promedio del cálculo de recuperación de OTA en las muestras de nueces y almendras fue de 96.24% y 95.76% respectivamente, lo que demuestra que la eficiencia de extracción se encuentra dentro de los límites de 80 y 100%, establecidos por la Guidance for Bioanalytical Method Validation de la FDA.

### **7.3. Resultados de la determinación de ocratoxina A en nuez.**

**7.3.1. Resultados de los análisis en semilla, cáscara y pelón de nuez del muestreo en árbol.**

La Tabla 28, 29 y 30 detallan todos los análisis en semilla, cáscara y pelón de nuez, obteniendo como resultado que ninguna muestra está contaminada con OTA, es decir se encuentran por debajo del límite de detección (BLD).

**Tabla 28: Resultados de la determinación de OTA en semilla.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
<b>Árbol</b>	<b>Semilla</b>	H06 / A08	BLD
		H08 / A07	BLD
		H20 / A03	BLD
		H10 / A01	BLD
		H02 / A05	BLD
		H13 / A06	BLD
		H04 / A04	BLD
		H03 / A05	BLD
		H18 / A11	BLD
		H08 / A04	BLD
		H07 / A09	BLD
		H16 / A03	BLD
		H14 / A09	BLD
		H20 / A16	BLD
		H10 / A07	BLD
		H01 / A01	BLD
		H04 / A07	BLD
		H12 / A04	BLD
		H16 / A08	BLD
		H02 / A04	BLD
		H12 / A09	BLD
		H18 / A01	BLD
		H12 / A09	BLD
		H06 / A06	BLD
		H05 / A08	BLD
		H14 / A02	BLD
		H20 / A14	BLD
		H14 / A05	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>28 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Limite de Detección (0,16 ng/g)

H = Hilera;

A = Árbol

**Tabla 29: Resultados de la determinación de OTA en cáscara de nuez.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Árbol	Cáscara	H08 / A07	BLD
		H02 / A05	BLD
		H13 / A06	BLD
		H18 / A11	BLD
		H02 / A04	BLD
		H16 / A03	BLD
		H14 / A09	BLD
		H01 / A01	BLD
		H04 / A07	BLD
		H12 / A04	BLD
		H06 / A08	BLD
		H18 / A01	BLD
		H12 / A09	BLD
		H04 / A04	BLD
		H08 / A04	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>15 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Limite de Detección (0,16 ng/g)

H = Hilera;

A = Árbol

Todas las muestras de semilla, cáscara y pelón, fueron debidamente codificadas para identificar el segmento, estructura, árbol e hilera del cual se realizó el muestreo.

**Tabla 30: Resultados de la determinación de OTA en pelón de nuez.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Árbol	Pelón	H12 / A09	BLD
		H20 / A03	BLD
		H07 / A09	BLD
		H04 / A07	BLD
		H14 / A02	BLD
		H02 / A05	BLD
		H08 / A07	BLD
		H18 / A01	BLD
		H02 / A04	BLD
		H06 / A08	BLD
		H10 / A07	BLD
		H14 / A05	BLD
		H14 / A09	BLD
		H18 / A11	BLD
H04 / A04	BLD		
<b>Total de muestras</b>		<b>15 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Limite de Detección (0,16 ng/g)

H = Hileras;

A = Árbol

### **7.3.2. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de nuez del muestreo en cosecha.**

La Tabla 31 y 32 describen todos los análisis en semilla y cáscara de nuez, obteniendo como resultado que ninguna muestra está contaminada con OTA (BLD).



**Tabla 31: Resultados de la determinación de OTA en semilla de nuez.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Cosecha	Semilla	C6/S1	BLD
		C6/S2	BLD
		C6/S3	BLD
		C6/S4	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>4 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Límite de Detección (0,16 ng/g).

C = Cosecha

S = Semilla

**Tabla 32: Resultados de la determinación de OTA en cáscara de nuez.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Cosecha	Cáscara	C6/M1	BLD
		C6/M2	BLD
		C6/M3	BLD
		C6/M4	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>4 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Límite de Detección (0,16 ng/g).

C = Cosecha

M = Muestra

### 7.3.3. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de nuez del muestreo en almacén.

La Tabla 33 y 34 describen todos los análisis en semilla y cáscara de nuez, obteniendo como resultado que ninguna muestra está contaminada con OTA (BLD).

**Tabla 33: Resultados de la determinación de OTA en semilla de nuez**

<b>Segmento</b>	<b>Estructura</b>	<b>Código</b>	<b>Resultado</b>
<b>Almacén</b>	<b>Semilla</b>	A1/S1	BLD

BLD = Bajo Límite de Detección (0,16 ng/g).

A = Almacén

S = Semilla

**Tabla 34: Resultados de la determinación de OTA en cáscara de nuez.**

<b>Segmento</b>	<b>Estructura</b>	<b>Código</b>	<b>Resultado</b>
<b>Almacén</b>	<b>Cáscara</b>	A1/C1	BLD

BLD = Bajo Límite de Detección (0,16 ng/g).

A = Almacén

C = Cáscara

#### **7.3.4. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de nuez de las muestras de laboratorio bajo temperatura controlada.**

Como parte del estudio en la identificación de ocratoxina A, se realizó el análisis de semilla y cáscara de nuez que se dejó bajo temperatura de laboratorio (24 °C) durante 90 días, para determinar la posible producción y/o proliferación de OTA durante el tiempo (Tabla 35).

**Tabla 35: Resultados de la determinación de OTA en laboratorio.**

<b>Estructura de la nuez</b>	<b>Número de muestra</b>	<b>Número de análisis</b>	<b>Día de análisis</b>	<b>Resultado</b>
Semilla	10 nueces	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días	BLD
	10 nueces	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días	BLD
	10 nueces	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días	BLD
Cáscara	10 nueces	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días	BLD
	10 nueces	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días	BLD
	10 nueces	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días	BLD

BLD = Bajo Límite de Detección (0,16 ng/g).

En la Tabla 36, se detalla el resumen de análisis realizados en todas las muestras de nuez que demuestran que la contaminación por ocratoxina A está por debajo del límite de detección.

**Tabla 36: Resultados de la determinación de OTA en nuez.**

<b>Variedad</b>	<b>Segmento</b>	<b>Estructura analizada</b>	<b>Muestras analizadas</b>	<b>Resultado</b>
Serr	Árbol	Pelón	15	BLD
		Cáscara	15	BLD
		Semilla	28	BLD
	Cosecha	Cáscara	04	BLD
		Semilla	04	BLD
	Almacén	Cáscara	01	BLD
		Semilla	01	BLD

BLD = Bajo Límite de Detección (0,16 ng/g).

#### **7.4. Resultados de la determinación de ocratoxina A en almendra.**

#### 7.4.1. Resultados de los análisis en semilla, cáscara y pelón de almendra del muestreo en árbol.

La Tabla 37, 38 y 39 detallan todos los análisis en semilla, cáscara y pelón de almendra, obteniendo como resultado que ninguna muestra está contaminada con OTA, es decir se encuentran por debajo del límite de detección (BLD).

**Tabla 37: Resultados de la determinación de OTA en semilla.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Árbol	Semilla	H01 / A06	BLD
		H28 / A10	BLD
		H30 / A04	BLD
		H03 / A08	BLD
		H26 / A15	BLD
		H13 / A06	BLD
		H19 / A12	BLD
		H24 / A03	BLD
		H17 / A07	BLD
		H12 / A09	BLD
		H20 / A12	BLD
		H07 / A04	BLD
		H22 / A09	BLD
		H10 / A05	BLD
		H15 / A11	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>15 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Limite de Detección (0,14 ng/g).

H = Hilera

A = Árbol

**Tabla 38: Resultados de la determinación de OTA en cáscara.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
<b>Árbol</b>	<b>Cáscara</b>	H15 / A11	BLD
		H10 / A05	BLD
		H07 / A04	BLD
		H20 / A12	BLD
		H17 / A07	BLD
		H19 / A12	BLD
		H26 / A15	BLD
		H03 / A08	BLD
		H30 / A04	BLD
		H13 / A06	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>10 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Limite de Detección (0,14 ng/g).

H = Hilera

A = Árbol

**Tabla 39: Resultados de la determinación de OTA en pelón.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
<b>Árbol</b>	<b>Pelón</b>	H01/ A06	BLD
		H30 / A04	BLD
		H26 / A15	BLD
		H19 / A12	BLD
		H17 / A07	BLD
		H20 / A12	BLD
		H22 / A09	BLD
		H15 / A11	BLD
		H10 / A05	BLD
		H07 / A04	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>10 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Limite de Detección (0,14 ng/g).

### 7.4.2. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de almendra del muestreo en cosecha.

La Tabla 40 y 41 describe los análisis en semilla y cáscara de almendra, teniendo como resultado que ninguna muestra está contaminada con OTA (BLD).

**Tabla 40: Resultados de la determinación de OTA en semilla.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Cosecha	Semilla	C2/ S1	BLD
		C2 / S2	BLD
		C2 / S3	BLD
		C2 / S4	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>04 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Límite de Detección (0,14 ng/g).

C = Cosecha

S = Semilla

**Tabla 41: Resultados de la determinación de OTA en cáscara.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Cosecha	Cáscara	C2/M1	BLD
		C2/M2	BLD
		C2/M3	BLD
		C2/M4	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>4 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Límite de Detección (0,14 ng/g).

C = Cosecha

M = Muestra

### 7.4.3. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de almendra del muestreo en almacén.

La Tabla 42 y 43 describe los análisis en semilla y cáscara de almendra, obteniendo como resultado que ninguna muestra está contaminada con OTA (BLD).

**Tabla 42: Resultados de la determinación de OTA en semilla.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Almacén	Semilla	A2/S1	BLD
		A2/S2	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>2 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Límite de Detección (0,14 ng/g).

A = Almacén

S = Semilla

**Tabla 43: Resultados de la determinación de OTA en cáscara.**

Segmento	Estructura	Código	Resultado
Almacén	Cáscara	A2/M1	BLD
		A2/M2	BLD
<b>Total de muestras</b>		<b>2 muestras</b>	<b>BLD</b>

BLD = Bajo Límite de Detección (0,14 ng/g).

A = Almacén

M = Muestra

#### **7.4.4. Resultados de los análisis en semilla y cáscara de almendra de las muestras de laboratorio bajo temperatura controlada.**

Parte del estudio en la identificación de ocratoxina A, se realizó el análisis de semilla y cáscara de almendra que se dejó bajo temperatura de laboratorio (24 °C) durante 90 días, para determinar la posible producción y/o proliferación de OTA durante (Tabla 44).

**Tabla 44: Resultados de la determinación de OTA en laboratorio.**

<b>Estructura de almendra</b>	<b>Número de muestra</b>	<b>Número de análisis</b>	<b>Día de análisis</b>	<b>Resultado</b>
Semilla	15 almendras	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días	BLD
	15 almendras	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días	BLD
	15 almendras	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días	BLD
Cáscara	15 almendras	1 <sup>er</sup> análisis	Después de 30 días	BLD
	15 almendras	2 <sup>do</sup> análisis	Después de 45 días	BLD
	15 almendras	3 <sup>er</sup> análisis	Después de 60 días	BLD

BLD = Bajo Límite de Detección (0,14 ng/g).

En la Tabla 45, se detalla el resumen de análisis realizados en todas las muestras de almendras que demuestran que la contaminación por ocratoxina A está por debajo del límite de detección (BLD).

**Tabla 45: Resultados de la determinación de OTA en almendra.**

<b>Variedad</b>	<b>Segmento</b>	<b>Estructura analizada</b>	<b>Muestras analizadas</b>	<b>Resultado</b>
Non Pareil	Árbol	Semilla	15	BLD
		Cáscara	10	BLD
		Pelón	10	BLD
	Cosecha	Semilla	04	BLD
		Cáscara	04	BLD
	Almacén	Semilla	02	BLD
		Cáscara	02	BLD

BLD = Bajo Límite de Detección (0,14 ng/g).



## 8. DISCUSIÓN.

En la presente tesis se estudió la contaminación de OTA en nueces y almendras con el objeto de determinar la trazabilidad de esta contaminación, utilizando la metodología de HPLC-FL validada por el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se realizó una curva de calibración de cinco puntos de concentración con nueces y almendras fortificadas, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,99977 y 0,99984 respectivamente, lo que indica que la curva es lineal en un rango de concentración de 1,5 - 10,0 ng/g, permitiendo establecer que existe una relación directamente proporcional entre la concentración del analito y la respuesta cromatográfica (área). Asimismo, esta curva permitió el cálculo del límite de detección y límite de cuantificación para ambas matrices lográndose alcanzar valores de concentración muy bajos de OTA, Tabla 23 y 25 respectivamente. Según Aguilera *et al.* (2010), entre más cercano a la unidad sea el valor del coeficiente de correlación mayor será la coherencia y reciprocidad entre los datos de la curva de calibración, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio, Figura 14 y 15.

Para la extracción de OTA se usó columnas de extracción en fase sólida (SPE) de 3 mL, Octadecyl C<sub>18</sub> de 500 mg; con estas columnas se lograron porcentajes de recuperación promedio de 96,2% y 95,8% para las

matrices fortificadas, trabajando con tres niveles de concentración (alta, media y baja) Tabla 26 y 27. Estos resultados permiten asegurar que la eficiencia de la extracción se encuentra dentro de los límites del 80 y 100%, establecidos por la Guidance for Bioanalytical Method Validation de la FDA.

Los resultados de los análisis se corroboraron mediante el uso del Protocolo de Aseguramiento de la Calidad (Anexo 5) que garantizó la eficacia de la metodología utilizada. Asimismo todos resultados de los análisis de las muestras de nueces y almendras en los 3 componentes (semilla, cáscara y pelón) de los segmentos en estudio (árbol, cosecha y almacén), fueron Bajo el Límite de Detección (BLD) y se relacionan con las condiciones poco favorables de temperatura y humedad promedio en los centros de producción donde se recolectaron las muestras cuyo clima es seco. En consecuencia las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo del hongo y producción de OTA no fueron óptimas (Tabla 4, 5 y 6). A esto, hay que agregar la efectividad en el manejo de las Buenas Prácticas Agrícolas aplicado a las plantaciones de nueces y almendras en estudio, tal como señala AMEZQUETA *et al.*, (2009) las buenas prácticas de pre cosecha y post cosecha, son eficaces en la prevención del desarrollo y proliferación de micotoxinas, evitando pérdidas en la producción.

Estos resultados preliminares de la trazabilidad de la contaminación deben tenerse en cuenta al momento de establecer programas que permitan controlar de manera integral la calidad, fitosanidad y seguridad alimentaria de los productos.

## **9. CONCLUSIÓN.**

Este estudio sobre la determinación de la contaminación de ocratoxina A en nueces y almendras recolectadas en Centros de Producción Nacional, es un trabajo preliminar sobre la trazabilidad de la contaminación del nogal y del almendro por hongos Ocratoxigénicos.

Por otra parte, el uso de metodología HPLC con detección por fluorescencia, ha demostrado ser una herramienta eficaz en la identificación y cuantificación de OTA con límites de detección y límites de cuantificación, altamente perceptibles (Tabla 23 y 25). Los procedimientos de extracción y cuantificación de esta toxina, fueron rigurosamente estudiados para lograr las condiciones óptimas de análisis. El uso de columnas de extracción en fase sólida (SPE) permitió porcentajes de recuperación promedio de 96,2% y 95,8% para las matrices fortificadas en estudio. Estos resultados están en el rango establecidos por la Guidance for Bioanalytical Method Validation de la FDA.

El control de calidad de los análisis, permitió además, asegurar la confiabilidad de los resultados encontrados (tiempo de retención y control de la recuperabilidad de la toxina cada seis muestras).

Los análisis de los diferentes tipos de muestras fueron encontrados bajo el límite de detección (BLD) y se puede concluir que tanto las condiciones de temperatura y humedad, de los dos Centros de Producción donde se realizó el muestreo como las buenas prácticas de precosecha y postcosecha, (Buenas Prácticas Agrícolas) aplicado a las plantaciones de nueces y almendras en estudio, fueron eficaces en la prevención del desarrollo del hongo y producción de ocratoxina A, evitando pérdidas en la producción.

Si bien es cierto que este estudio está enfocado en un solo centro de producción donde las condiciones de temperatura y humedad no fueron óptimas para el desarrollo de hongo y la producción de la toxina. Debe tenerse en cuenta que en Chile se cosechan nueces y almendras desde la IV a la VI Región, donde se involucran una gran variedad de microclimas, los cuales deben ser estudiados aplicando la metodología desarrollada en la presente tesis.

Los resultados obtenidos, tanto la herramienta analítica como el diseño de la metodología de campo, sirvieron para que el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la Asociación de Productores y Exportadores de Nueces de Chile (CHILENUT) presentaran un Proyecto FIA (Fomento de Investigación Agraria). El resultado final podría materializarse en el desarrollo de un Programa de Sanidad de Frutos Secos.

## 10. BIBLIOGRAFIA.

1. AGUILERA, C., HERRERA, C., PONCE, J. 2010. Implementation, validation, and application of a new HPLC, 38(2): 227-233.
2. AMEZQUETA, S., GONZÁLEZ, E., MURILLO, M., LÓPEZ DE CERAIN, A. 2009. Ochratoxin A decontamination: A review. Food Control, 20(4), 326-333.
3. BENÍTEZ, A. 2005. Avances Recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Reverté. Barcelona, España. 196 p.
4. CABAÑES, F. 2006. Las micotoxinas emergentes: Introducción. España. 61-62 p.
5. CAMEAN, A. 2006. Toxicología alimentaris. Ed. Días de Santos. 291-292-295- 299- 301 p.
6. CHAMBERLAIN, J. 2000. Analysis of Drugs in Biological Fluids.En: Analytical Department, Hoechst Pharmaceutical Researchs Laboratories. Florida. 62-78, 95-1001 p.
7. CHILENUT, 2014a. Asociación de Productores y Exportadores de Nueces de Chile. Almendra [en línea] <<http://www.chilenut.cl/index.php?seccion=almendra>> [consulta: 02 octubre 2014].

8. CHILENUT, 2014b. Asociación de Productores y Exportadores de Nueces de Chile. Nuez de Nogal [en línea] <<http://www.chilenut.cl/index.php?seccion=nuez-de-nogal>> [consulta: 02 octubre 2014].
9. COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2004. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Comité del CODEX sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos. La Haya, Países Bajos. 7p.
10. CORNEJO, J. y VILLARROEL, O. 2006. Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces [en línea] Santiago, Chile. 6p. <<http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>> [Consulta: 02 octubre 2014].
11. DÍAZ, G. 2005. Micotoxinas y micotoxicosis. IX Congreso nacional de avicultura. Federación nacional de avicultura (FENAV).
12. FAO. 2004. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. La Garantía de la Calidad en el Laboratorio Químico de Control de los Alimentos. Food & Agriculture Org. Estados Unidos.
13. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2001. Guidance for industry bionalytical method validation. 5 p.

14. FOOD AND VETERINARY OFFICE. 2008. Sampling Methods in Agriculture. 24 p.
15. GIMENO, A. 2001. Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas y las micotoxinas en la alimentación animal 45:46-47. Disponible en [www.engormix.com](http://www.engormix.com) Consultado el 19/05/2014.
16. International Commission on Microbiological Specification For Foods. (ICMSF) 1996. Microorganismos de los Alimentos-Características de los Patógenos Microbianos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
17. LARSEN, T. O., SVENDSEN, A., SMEDSGAARD, J. 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3630–3635.
18. Legislación de la Unión Europea sobre Contenidos Máximos de Micotoxinas en Productos Alimenticios, 2014. Micotoxinas. 14 p.
19. MALLMANN, C. y DIKIN, P. 2007. Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. Santa Maria. Brasil. 35, 36, 105, 159-161 p.
20. MEIER, P. C. y ZUND, R. E. 2000. Statical methods in analytical chemistry, 2ª ed. New York, John Wiley & Sons.
21. MILLER, J. D. 1994. Fungi and mycotoxins in stored products. 126-135p.

22. Organización Mundial de la Salud (OMS) 2002. Estrategia Global de la OMS para la Inocuidad de los Alimentos. Alimentos más sanos para una salud mejor.
23. PERUSIA, O. R. y RODRÍGUEZ, R. A. 2007. Evaluation of certain food additives and contaminants Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert committee on food additives. 30 p.
24. PITT, J. y HOCKING, A. 1997. Fungi and food Spoilage. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
25. REGLAMENTO (CE) N° 401//2006 de la comisión de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. 23 p.
26. REYES, V. 2008. Situación y perspectivas de los cultivos de nogal y almendro en Chile.
27. SCOTT, P. 2002. Methods of analysis for ochratoxin A. Adv. Exp. Med. Biol. 117-134p.
28. SNYDER, R., KIRKLAND, J., GLAJCH, L. 1997. Practical HPLC Method Development. Editorial John Wiley & Sons. New York..12 p.
29. SORIANO, C. 2007. Micotoxinas en alimentos. 1ª. Ed. España. Ediciones Díaz de Santos. 3 -204 p.



- 30.** VALENTA, H. 1998. Chromatographic methods for the determinación of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *J. Chromatogr.* 75–92 p.
- 31.** VALLE, A. 2010. Evaluación del peligro potencial y real de la presencia de Ocratoxina A, tricotecenos B y patulina en trigo y manzana mediante técnicas microbiológicas y cromatográficas. Departamento de Química Analítica, Universitat de València – España.
- 32.** VARGA, J., KEVEI, E., RINYU, E., TÉREN, J. y KOZAKIEWICZ, Z. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 p.
- 33.** YOSHISAWA, T. 1998. General view on Mycotoxins. Mycotoxin Inspection in food training course. Japan International Cooperation Agency JICA.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1: Parámetros de control del método HPLC.

#### 1.1. Linealidad del método.

Es la proporcionalidad entre la concentración del principio activo (OTA) y su respuesta (área del pico cromatográfico).

Se realizó una curva de calibración de matriz fortificada con ocratoxina A, utilizando 5 puntos de 1.5, 2.5, 5.0, 7.0 y 10.0 ng/g, cada punto fue realizado por duplicado e inyectado en triplicado, demostrando la capacidad del método para obtener resultados lineales.

La linealidad del método se calcula de acuerdo al Method in Analytical Chemistry (Meier et al., 2000). Determinando los siguientes parámetros:

- **Coefficiente de correlación (r):**

Indica el grado de relación entre la concentración del analito y la respuesta. Si (r) es cercano a la unidad significa que existe correlación.

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

Ec.1

Donde:

$S_{xy}$  = sumatoria del eje XY

$S_{xx}$  = sumatoria del eje X (concentraciones)

$S_{yy}$  = sumatoria del eje Y (áreas)

- **Límite de detección (LD):**

Se define como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado.

$$LD = t * Sy * \frac{\sqrt{\frac{\sum X^2}{n \cdot Sxx}}}{b} \quad \text{Ec.2}$$

Donde:

t = constante 2.77

Sy = desviación estándar de Y

$\sum X^2$  = sumatoria del eje X<sup>2</sup>

n = número de mediciones

Sxx = sumatoria del eje X (concentraciones)

b = pendiente

- **Límite de cuantificación (LC):**

Es la mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente.

$$LD = t * Sy * \frac{\sqrt{\frac{\sum X^2}{n \cdot Sxx} + \frac{1}{n} + \frac{(LD-x)^2}{Sxx}}}{b} \quad \text{Ec.3}$$

Donde:

t = constante 2.77

Sy = desviación estándar de Y

$\sum X^2$  = sumatoria del eje X<sup>2</sup>

n = número de mediciones

Sxx = sumatoria del eje X (concentraciones)

LD = límite de detección

X = media de X

b = pendiente

## 1.2. Recuperación.

Es la relación entre la concentración medida y valor esperado, se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{obtenido}}}{C_{\text{esperado}}} \times 100 \quad \text{Ec.4}$$

Donde:

C obtenido = concentración obtenida.

C esperado = valor teórico del mismo.

La recuperabilidad se realizó mezclando el estándar puro de OTA con la matriz en estudio (nuez y almendra) para obtener la concentración en tres niveles de 10,0 ng/g (nivel alto), 5,0 ng/g (nivel medio) y 2,5 ng/g (nivel bajo), cada concentración fue inyectado en replicado.

## **Anexo 2: Resultados de los parámetros de validación.**

El Laboratorio de Toxicología (LABTOX) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, realizó estudios en diversas matrices para validar e implementar el método de análisis de ocratoxina A por HPLC-FL, utilizando columnas de extracción de fase sólida (SPE) de 3 mL, 500 mg, unida a gel de sílica (Octadecyl C<sub>18</sub>).

**Tabla 1: Resultados obtenidos en LABTOX.**

<b>Parámetros de validación</b>	<b>Valores</b>
Linealidad del método	El gráfico es directamente proporcional entre la concentración y la respuesta cromatográfica, por tanto el método fue lineal en un rango de concentración de 0,25 – 2,0 ng/g.
Recuperación	El porcentaje de recuperación fue de 95,7%.
Estabilidad de la muestra	Bajo condiciones de almacenamiento (4-6 °C) y a °T ambiente (19-24 °C) no mostraron variaciones mayores al 5%.
Variabilidad	La variabilidad interdía en 46 días en matriz fortificada es de 95,1% de recuperación.
Reproducibilidad	Realizada por 2 analistas, el porcentaje de recuperación es de 93,6% para el primer analista y 94,5% para el segundo analista.
Especificidad	La adición de compuestos interferentes (ác. Gálico, taninos) no afectó en el tiempo de retención de OTA.

### **Anexo 3: Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión**

de 23 de febrero de 2006

Por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios  
(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales <sup>(1)</sup>, y, en particular, su artículo 11, apartado 4.

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) N° 466/2001 de la Comisión, de 8 de marzo de 2001, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios <sup>(2)</sup>, establece los límites máximos de diversas micotoxinas en determinados productos alimenticios.
- (2) El muestreo tiene un papel fundamental en la precisión de la determinación del contenido de micotoxinas, que están distribuidas muy heterogéneamente en los lotes. Es por tanto necesario establecer los criterios generales que debe cumplir el método de muestreo.
- (3) A fin de garantizar que los laboratorios de control utilizan métodos de análisis con niveles de eficacia comparables, es necesario fijar también los criterios generales a los que deben ajustarse los métodos de análisis.
- (4) La Directiva 98/53/CE de la Comisión, de 16 de julio de 1998, por la que se fijan métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de algunos contaminantes en los productos alimenticios <sup>(3)</sup>, establece métodos de muestreo y criterios de funcionamiento de los métodos de análisis que deben utilizarse para el control oficial del contenido de aflatoxinas en los productos alimenticios.
- (5) La Directiva 2002/26/CE de la Comisión, de 13 de marzo de 2002, por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de ocratoxina A en los productos alimenticios <sup>(4)</sup>, la Directiva 2003/78/CE de la Comisión, de 11 de agosto de 2003, por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios <sup>(5)</sup>, y la Directiva 2005/38/CE de la Comisión, de 6 de junio de 2005, por la que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de toxinas de *Fusarium* en los productos alimenticios <sup>(6)</sup>, establecen de manera similar métodos de muestreo y criterios de funcionamiento para la ocratoxina A, la patulina y las toxinas de *Fusarium* respectivamente.
- (6) Si es posible, conviene aplicar el mismo método de muestreo a un mismo producto para el control de las micotoxinas. En consecuencia, los métodos de muestreo y los criterios de funcionamiento de los métodos de análisis para el control oficial de todas las micotoxinas

deberían reunirse en un único acto jurídico a fin de facilitar su aplicación.

- (7) La distribución de las aflatoxinas en un lote es muy heterogénea, sobre todo en los lotes de productos alimenticios con tamaño grande de partícula, tales como los higos secos o los cacahuets. A fin de obtener la misma representatividad, en el caso de los lotes de productos alimenticios con tamaño grande de partícula, el peso de la muestra global debería ser superior al peso de la muestra global de los lotes de productos alimenticios con tamaño más pequeño de partícula. Dado que la distribución de micotoxinas en productos transformados es normalmente menos heterogénea que en los productos a base de cereales no transformados, conviene prever disposiciones de muestreo más sencillas para los productos transformados.
- (8) En consecuencia, deben derogarse las Directivas 98/53/CE, 2002/26/CE, 2003/78/CE y 2005/38/CE.
- (9) La fecha de aplicación del presente Reglamento debería coincidir con la fecha de aplicación del Reglamento (CE) N<sup>o</sup> 856/2005 de la Comisión, de 6 de junio de 2005, por el que se modifica el Reglamento (CE) N<sup>o</sup> 466/2001 en lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* <sup>(1)</sup>.
- (10) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

#### *Artículo 1*

La toma de muestras para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios se realizará con arreglo a los métodos establecidos en el anexo I.

#### *Artículo 2*

La preparación de las muestras y los métodos de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios cumplirán los criterios establecidos en el anexo II.

#### *Artículo 3*

Quedan derogadas las Directivas 98/53/CE, 2002/26/CE, 2003/78/CE y 2005/38/CE. Las referencias a las Directivas derogadas se entenderán hechas al presente Reglamento.

#### *Artículo 4*

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de julio de 2006.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 23 de febrero de 2006.  
Por la Comisión Markos  
KYPRIANOU Miembro de la Comisión

C.2. Resumen general del método de muestreo para los frutos secos, con excepción de los higos

Subdivisión de los lotes en sublotos en función del producto y del peso del lote.


Producto	Peso del lote (en toneladas)	Peso o número de los sublotos	Número de muestras elementales	Peso de la muestra global (en kg)
Frutos secos	$\geq 15$	15-30 t	100	10
	$< 15$	—	10-100 (*)	1-10

Número de muestras elementales que deben tomarse, en función del peso del lote de frutos secos

Peso del lote (en toneladas)	Número de muestras elementales	Peso de la muestra global (en kg)
$\leq 0,1$	10	1
$> 0,1-\leq 0,2$	15	1,5
$> 0,2-\leq 0,5$	20	2
$> 0,5-\leq 1,0$	30	3
$> 1,0-\leq 2,0$	40	4
$> 2,0-\leq 5,0$	60	6
$> 5,0-\leq 10,0$	80	8
$> 10,0-\leq 15,0$	100	10



#### Anexo 4: Protocolo de determinación de OTA.

 Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología	<b>PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A (OTA)</b>	<b>Copia N° 01 09/05/2015</b>
	<b>Américo López Rivera<sup>a</sup>, Celia Yauris Silvera<sup>b</sup>.</b> <sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>b</sup> Alumna Magister en Alimentos Mención en Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.	

### 1. OBJETIVO.

Describir el protocolo de análisis de determinación de OTA en almendra y nuez detallando en forma clara los ítems de: instrumentación, condiciones cromatográficas 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 almendra y nuez, usando el método HPLC/FL desarrollado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### 3. RESPONSABILIDAD.

#### Prof. Director de Tesis.

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

- Revisar y aprobar el protocolo de determinación de OTA.

#### **Alumna Tesista:**

- Desarrollar y proponer un protocolo de determinación de OTA en almendra y nuez.
- Aplicar el protocolo de determinación de OTA en las muestras de almendras y nueces, de acuerdo a lo establecido.
- Verificar que los resultados de los análisis, se encuentren dentro del rango de aceptabilidad de acuerdo a la determinación de OTA.
- 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>)
- 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, AGA. S.A.

### 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. Estándares.**

Standard Ochratoxin A from *Aspergillus ochraceus*. (Sigma), Lote 126k4026, mayor igual a 98% pureza (1mg).

## **6. FUNDAMENTO.**

El método está basado en extracción de OTA de almendra y nuez, con una mezcla de acetonitrilo, agua, ácido acético, (50:50:1 v/v) para ser analizado por el método de HPLC con detección por fluorescencia.

## **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 inmunosupresor. 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 y Almendras Fortificado:** Muestras de nuez y almendra 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.**

Se construyeron curvas de calibración de almendras y nueces fortificadas con OTA.

#### **8.1.1. Curva de calibración de almendra y nueces fortificadas con OTA.**

Para la cuantificación de OTA se realizó una curva de calibración de almendra y 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.**

Este método es aplicable para almendras y nueces.

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

Las muestras de almendras y nueces fueron recolectadas en los centros de producción de la Región de O'Higgins y Valparaíso respectivamente.

Todas las muestras fueron acondicionadas en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **8.2.2. Protocolo de extracción.**

#### **8.2.2.1. Pre tratamiento de la muestra.**

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

**A) Semilla:** Cada muestra pesó 180 g que fueron rayadas utilizando un rayador de mano.

**B) Cáscara:** Cada muestra pesó 160 g que fueron molidos utilizando un molino de grano.

**C) Pelón:** Cada muestra pesó 160 g y no requiere un tratamiento adicional para ser homogenizada.

#### **8.2.2.2. Preparación de la muestra.**

- En un vaso de vidrio agregar: 10 g de muestra homogenizada y 40 mL de solución de extracción (acetonitrilo/agua/ác.Acético): CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (50:50:1) v/v.
- Licuar la mezcla durante 1 min.
- Trasvasar a un tubo de 50 mL para ser centrifugado a 6000 rpm por un tiempo de 10 min.
- 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.**

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

No permitir secar la columna.

**Descartar**

#### **8.2.2.4. Aplicación de la muestra.**

- Aplicar 3 mL de la muestra filtrada.
- 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.

- Lavar con 2,5 mL de (metanol/agua) MeOH/H<sub>2</sub>O (30/70) v/v.
- Secar completamente la columna con presión. **Descartar**

#### 8.2.2.6. Elución del analito.

- Eluir la muestra con 2,5 mL de (metanol/ac.acético) MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (99,5/0,5) v/v.
- Permitir eluir 5 primeras gotas con presión.
- Dejar reposar a presión ambiental durante 2 minutos.
- Eluir suavemente a un ritmo de 10 a 12 gotas por minuto.
- Recoger el eluido en un tubo ámbar de 8 mL.
- Eluir el analito completamente con presión.
- Secar bajo corriente de N<sub>2</sub> a 45 °C.
- Reconstituir con 0,5 mL de la solución de dilución: (acetonitrilo/agua/ac.acético) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (30/70/1) v/v.
- Inyectar un volumen de 100 µL en el cromatógrafo.

#### 8.3. Condiciones cromatográficas.

- Columna analítica: Phenomenex Luna C18, 250 x 2.00 mm 5µ.
- 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 µL.
- 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 almendra y nuez fortificada 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 ocratoxina A en 1 g de la muestra reconstituida. Para calcular la cantidad de ocratoxina A (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 5: Protocolo de aseguramiento de la calidad.

 Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología	<b>PROTOCOLO DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS ANÁLISIS DE OCRATOXINA A</b>	<b>Copia N° 01 09/05/2015</b>
	<b>Américo López Rivera<sup>a</sup>, Celia Yauris Silvera<sup>b</sup>.</b>	
	<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>b</sup> Alumna Magister en Alimentos Mención en Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.	

### 1. OBJETIVO.

Describir las actividades en la determinación de OTA en almendra y nuez, mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento.

### 2. ALCANCE.

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

### 3. RESPONSABILIDAD.

#### **Prof. Director de Tesis.**

- 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 de control de aseguramiento de la calidad de los análisis.
- Participar en la evaluación de los resultados obtenidos.

#### **Alumna Tesista:**

- 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 Solida (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:**

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.

### **5.2.2. Estándares.**

Standard Ochratoxin A from *Aspergillus ochraceus*. (Sigma), Lote 126k4026, mayor igual a 98% pureza (1mg).

## **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 (almendra, 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 (almendra y 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:

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

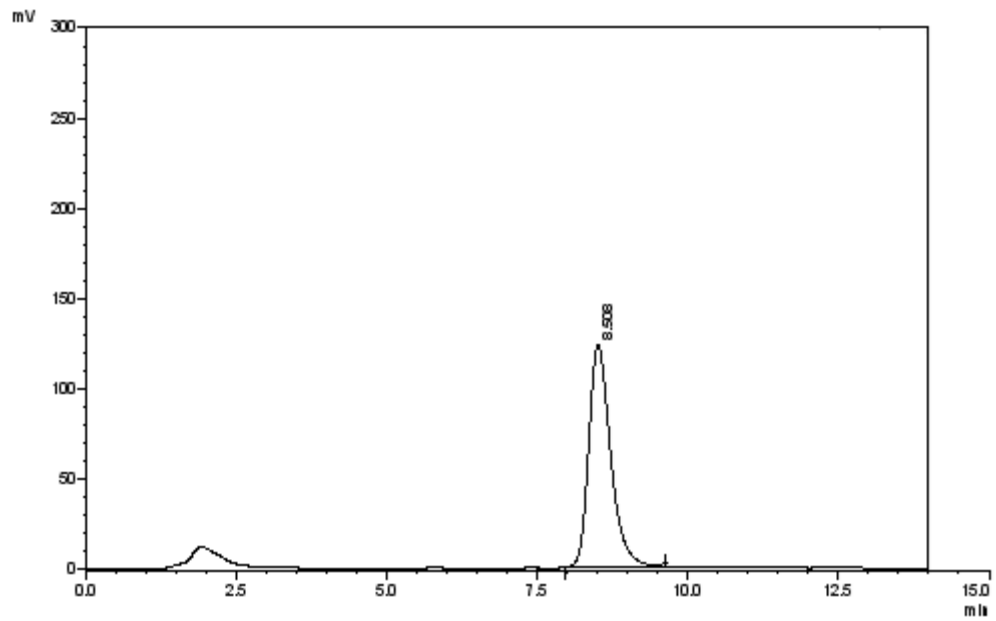
### 8.2.2. Pasos a seguir en caso de desviación de los criterios de aceptación.

<b>Parámetro no Satisfactorio</b>	<b>Pasos a seguir en caso de desviación</b>
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> </ul>
Recuperación (muestra fortificada)	<ul style="list-style-type: none"> <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> </ul>
Tiempo de retención	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inyectar nuevamente el estándar con la fase móvil nueva.</li> </ul>
Presión de la columna analítica	<ul style="list-style-type: none"> <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>
Temperatura ambiental	Verificar el funcionamiento del sistema de control de temperatura ambiental.

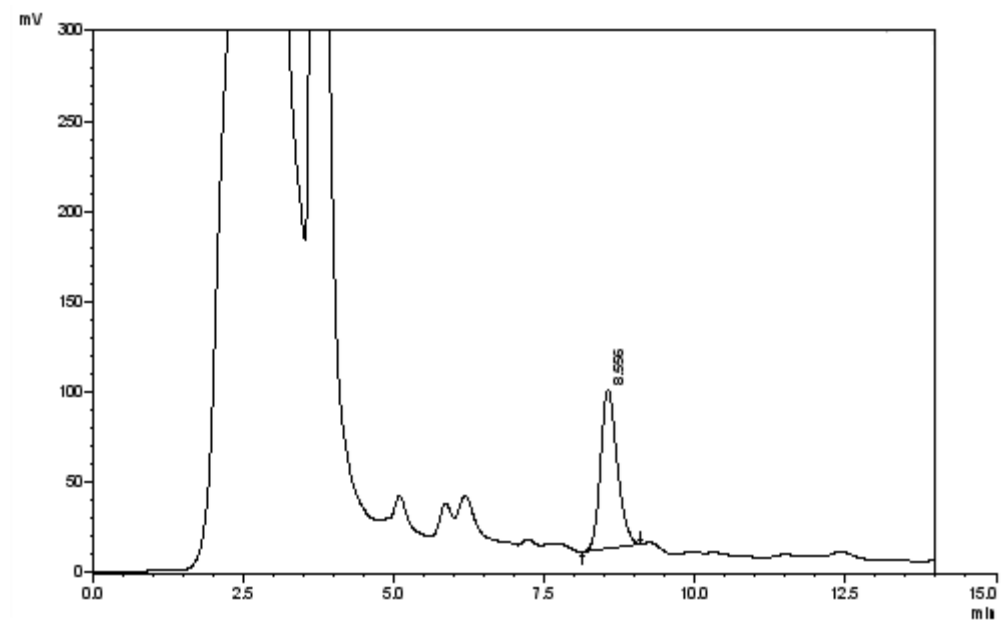


**Anexo 6: Cromatogramas.**

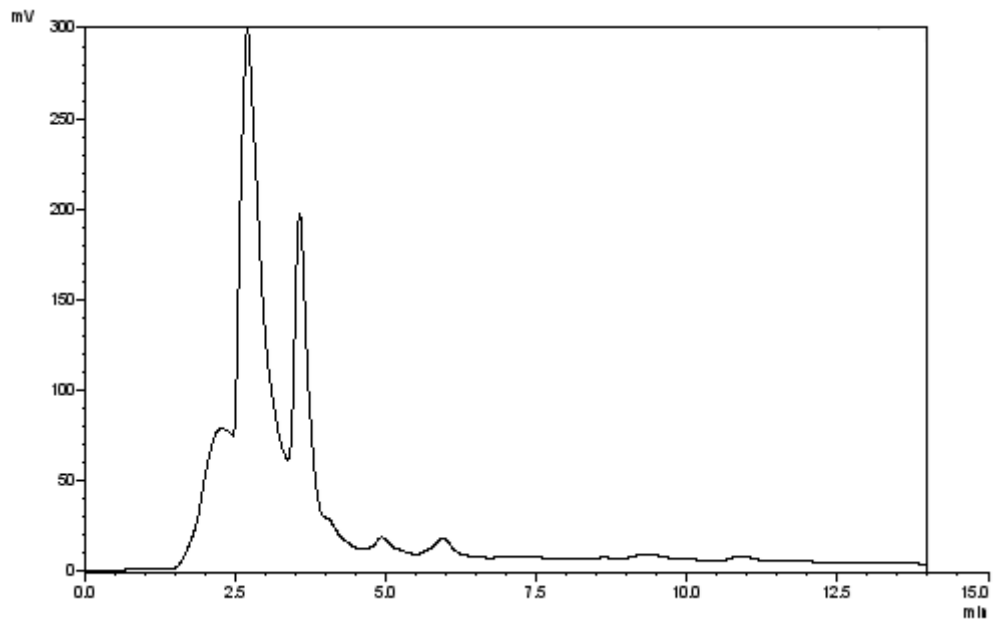
**Figura 1: Cromatograma de solución estándar puro de OTA de 10,0 ng/mL.**



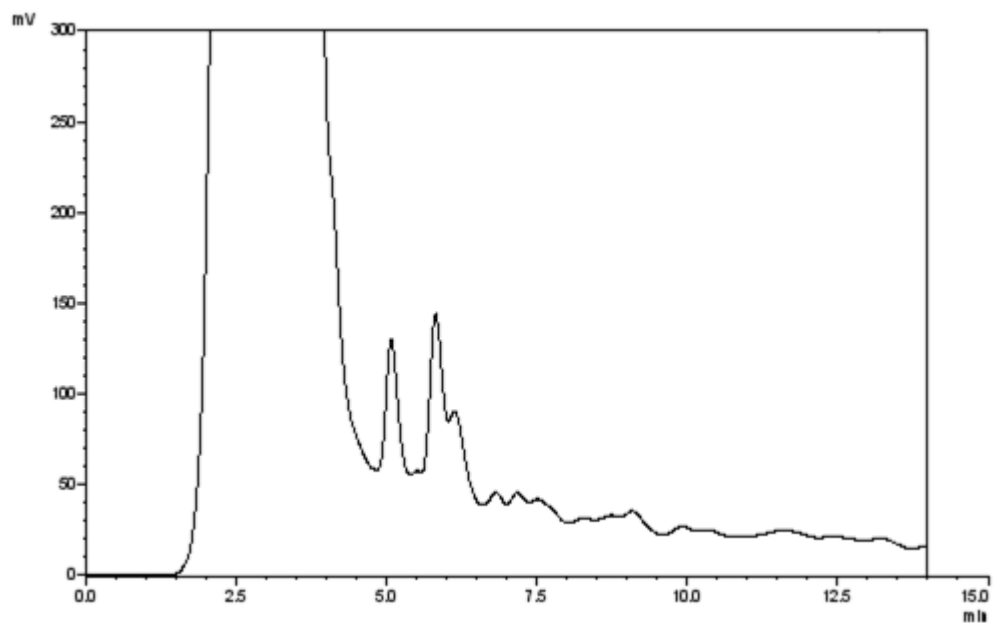
**Figura 2: Cromatograma de análisis de semilla de nuez fortificada con 10,0 ng/g.**



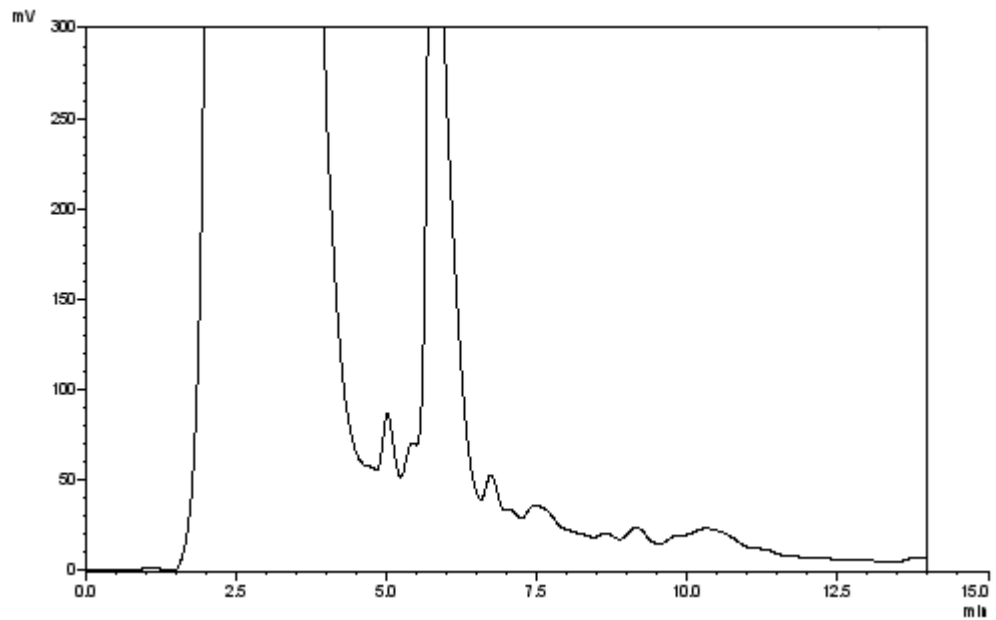
**Figura 3: Cromatograma de análisis de semilla de nuez H20/A16 sin la presencia de OTA.**



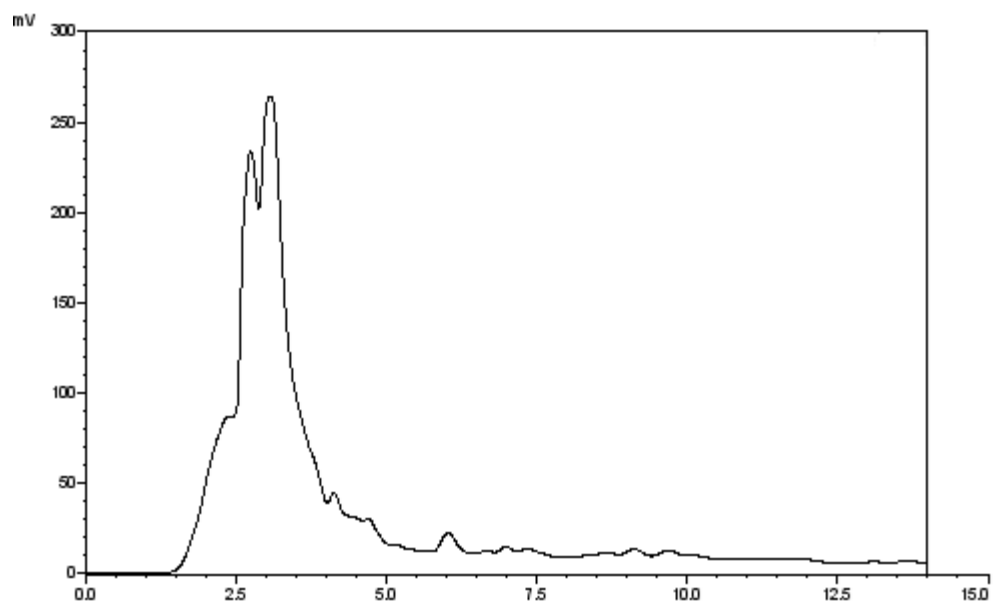
**Figura 4: Cromatograma de análisis de cáscara de nuez C6/M1 sin la presencia de OTA.**



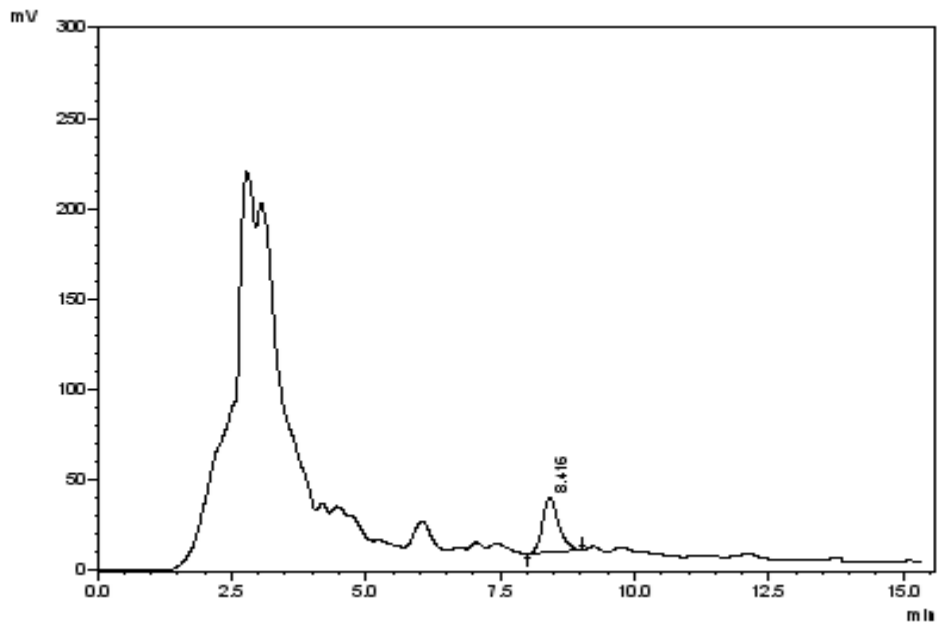
**Figura 5: Cromatograma de análisis de pelón de nuez H06 / A08 sin la presencia de OTA.**



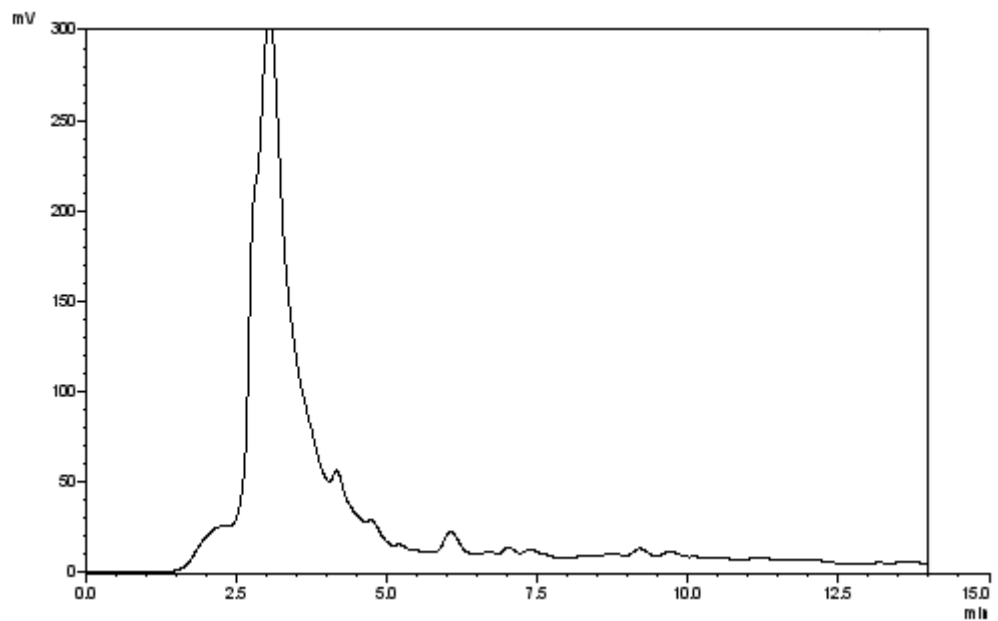
**Figura 6: Cromatograma de análisis de semilla de almendra H13/A06 sin la presencia de OTA**



**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**

