



PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016

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

Código del Proyecto: **PYT-2016-0064**

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

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

Fecha de inicio y duración del proyecto: **15/03/2016 – 24 meses**

Fecha de la presentación actual: **06/07/2017**

Nombre participante en presentación: **Américo López Rivera – Director alterno**



PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016

ANTECEDENTES GENERALES DEL EQUIPO DE LA PROPUESTA

Nombre persona	Cargo/Formación	Función en la propuesta	Competencias del profesional
Jessica Millar A.	Ing. Agrónomo/Gerente ChileNut	Coordinación general de las actividades del proyecto.	Experiencia en desarrollo y transferencia a pequeños y medianos agricultores.
Américo López Rivera	Académico Facultad de Medicina - Universidad de Chile	Coordinación de las actividades en terreno.	Investigador con experiencia en proyectos de investigación en toxicología de los alimentos. Dirige el Laboratorio de Toxicología
Remigio López Solís	Académico Facultad de Medicina (Biología Celular y Molecular) - Universidad de Chile	Coordinación de las actividades en terreno.	Investigador en área de bio-medicina. con experiencia en Biología Celular y Molecular. Dirige el Laboratorio de Biología Supramolecular.
Jaime Montealegre Andrade	Académico Facultad de Ciencias Agronómicas - Universidad de Chile	Coordinación de las actividades en terreno.	Investigación en Manejo Integrado y Control Biológico de Fitopatógenos Fungosos y Bacterianos



JUSTIFICACION DE LA VIGENCIA CIENTIFICA – TECNOLOGICA DEL PROYECTO

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

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

En Europa, una red de 1.200 laboratorios de referencia vigila la calidad alimentaria. Estos laboratorios se han focalizado en optimizar el análisis de micotoxinas en alimentos. Europa se ha propuesto la meta principal de unificar sus criterios analíticos para estas sustancias en la red completa de sus laboratorios.

Europa es un mercado emergente para agroproductos chilenos.



JUSTIFICACION DE LA VIGENCIA CIENTIFICA – TECNOLOGICA DEL PROYECTO

Regulaciones más exigentes por parte de los mercados importadores de productos agrícolas: Niveles Regulatorios.

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

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

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



JUSTIFICACION DE LA VIGENCIA CIENTIFICA – TECNOLOGICA DEL PROYECTO

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

Chile carece de infraestructura analítica normada para enfrentar las demandas de sus mercados compradores de productos sensibles a hongos toxigénicos, como son frutos secos, frutos deshidratados, uva y vino, entre otros.

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

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



PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016

OBJETIVO GENERAL

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

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



PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016

OBJETIVO ESPECÍFICO N° 1: Generar cultivos de hongos puros asociados a micotoxinas, caracterizarlos mediante técnicas microscópicas y determinar su toxicidad (capacidad de producción de toxinas). Se guardarán cepas tipo en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos.

OBJETIVO ESPECÍFICO N° 2: Desarrollar e implementar métodos analítico HPLC/FL para identificar y cuantificar Aflatoxinas y Ocratoxina A, en muestras de nueces, validado de acuerdo con normativas internacionales que permitan su acreditación INN según NCh ISO 17025/2005.

OBJETIVO ESPECÍFICO N° 3: Desarrollar e implementar un Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA) aplicado a nueces, el que estará orientado al cumplimiento de las normativas establecidas por el mercado internacional para la exportación de nueces enteras, sin cáscara, frescas y secas.

OBJETIVO ESPECÍFICO N° 4: Transferir y difundir la tecnología referida a identificación tanto de hongos toxigénicos, análisis e identificación de micotoxinas como estructura del Programa de Sanidad de Frutos secos, desde el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Chile a las Empresas asociadas



**PROYECTOS DE INNOVACION EN
ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016
RESULTADOS ESPERADOS**

Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Nombre del indicador	Situación actual	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta
1	Caracterización morfológica de hongos	Cultivo y aislación de cepas de hongos	0	Identificación de hongos micotoxigénico	30-10-2016
2	Determinación toxicidad del hongo	Capacidad de producción de toxinas	No existe información	Presencia de toxina	30-03-2017
3	Método HPLC Validado para la determinación de AFLAs y OTA	Curvas de Calibración y Análisis de Recuperabilidad	r = 0,99 R = 94 %	Valores r= 0.89 - 0,99 R = 90 y 110 %	30-10-2016
4	Determinación de puntos de riegos de contaminación en la línea de producción	Puntos de riegos de contaminación	0	Presencia de contaminación por muestra	30-10-2017
5	Desarrollo Programa Integrado de Monitoreo y Análisis para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (PRIMACIA)	Manual del PRIMACIA	0	1	30-01-2018
6	Implementación de PRIMACIA	Participación de empresas en el Programa	0	10	30-01-2018
7	Tecnología transferida	Agricultores capacitados	0	Sobre 10	30-03-2017
8	Difusión	Publicación de artículos en revista agronómica de circulación nacional. Publicación de Manual de PRIMACIA en nueces. Folletos de difusión	0	500 manuales de manejo integral + Un manual en versión digital 1000 folletos de difusión	30-09-2017 30-01-2018



Método objetivo 1: ANÁLISIS DE HONGOS GENERADORES DE TOXINAS: Para la identificación de hongos toxigénicos se tomarán muestras de frutos de diferentes arboles. Se utilizarán técnicas tradicionales en medios de cultivo y posterior identificación microscópica.

Materiales y Métodos

NOGAL: Se tomarán muestras de frutos de nogal al momento del procesamiento de las nueces. Las muestras se identificarán y se trasladarán al Lab. de Fitopatología y Control Biológico de Facultad de Ciencias Agronómicas de la U. de Chile donde se almacenarán en cámara húmeda a temperatura de 27°C por 7 días. Posteriormente se revisarán y se aislarán en medio de cultivo APD. De estas colonias de hongos, se harán cultivos puros y se identificarán a través de características microscópicas.

Para la identificación genotóxica de las cepas de hongos aisladas se realizará técnica PCR. Luego habiendo determinado que producen toxinas, se guardarán cepas tipo en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos ubicada en INIA Quilamapu (Chillán).

Las muestras de hongos identificadas serán sometidas a procedimientos físico químicos para estimular la producción de toxinas



PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016

TÉCNICA DE ANÁLISIS DE MICOTOXINAS:

Existen dos técnicas para medir micotoxinas en alimentos, el test ELISA y la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC).

HPLC: Esta técnica puede ser utilizada potencialmente, para medir un amplio de rango de analitos, con una preparación de la muestra en forma simple debido a la robustez de los instrumentos.

En base a la reglamentación internacional actual y las metodologías descritas en Compendium of International Methods of Analysis-OIV, la técnica analítica aceptada para la determinación de Aflatoxinas en frutos secos y otros alimentos indica el uso de columna de inmunoafinidad acoplada a HPLC/FL y es la técnica que se desarrollará en el presente proyecto.

VALIDACIÓN DE MÉTODO HPLC-FD: El método será implementado y validado tomando como referencia la guía técnica “Aspectos generales sobre la validación de métodos” del Instituto de Salud Pública, AOAC y Normativas internacionales. Se confeccionará un protocolo de validación. A partir de la linealidad, Se determinará la sensibilidad, límites de detección y cuantificación, veracidad, precisión, selectividad e incertidumbre del método.



PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016

VALIDACIÓN DEL MÉTODO A PARTIR DE SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE AFLAs/OTA

Se realizarán curvas de calibración con soluciones de estándar de **AFLAs/OTA** colocando el área o respuesta analítica en el eje Y, y las concentraciones de las soluciones estándares de AFLAs en el eje X.

Límite de detección y cuantificación de solución estándar de AFLAs/OTA: Serán calculados a partir de la desviación estándar de los residuales del calibrado, utilizando el punto de menor concentración de la recta de calibrando del método analítico.

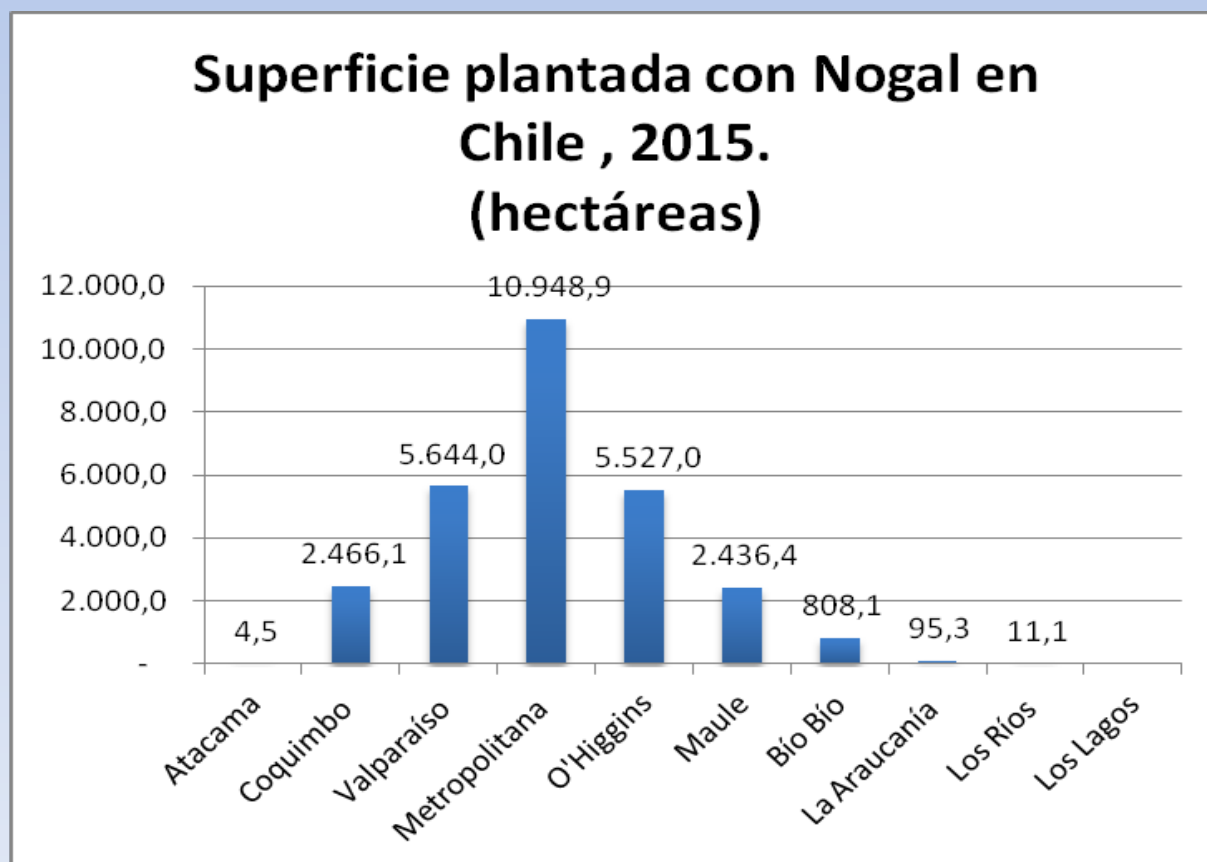
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO A PARTIR DE MATERIAL FORTIFICADO

Se realizaran tres curvas de calibración con material de referencia fortificado.

Recuperación: El porcentaje de recuperación será calculado a partir del material fortificado. Para dichos cálculos se tomara la concentración obtenida de las muestras en duplicado y la concentración teórica del material fortificado.

METODOLOGÍA EN CAMPO: ELECCIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN

Considerando que las nueces y almendras se cosechan principalmente desde la IV a la VIII Región donde se involucran una gran variedad de microclimas, se realizará la elección de aproximadamente 17 Centros de Producción de nueces ubicados en diferentes zonas y regiones del país. Los diferentes centros de producción donde se recolectarán las muestras, serán identificados por sus nombres, su georeferencia y su organización.



Segmentos	Análisis en Partes de la nuez	Cantidad de análisis	Descripción
ÁRBOL (150 aprox)	Pelón	15 (10%)	De 150 árboles muestreados en el campo de cultivo, aleatoriamente se tomarán 15 para analizar pelón. Peso de las muestra de pelón por árbol: 250 g aproximadamente
	Cáscara	15 (10%)	De 150 árboles muestreados en el campo de cultivo, aleatoriamente se tomarán 15 para analizar cáscara. Peso de las muestras de cáscaras por árbol: 250 g aprox.
	Semilla	75 (50%)	De 150 árboles muestreados en el campo de cultivo, se tomarán los 75 árboles para analizar semilla.
COSECHA	Semilla	4	De los sacos cosechados, se tomarán 4 a 6 muestras representativas recolectadas aleatoriamente en cosecha. Cada muestra de 2,5 kg aproximadamente. Se realizará análisis de semilla.
	Cáscara	4	De los sacos cosechados, se tomarán 4 a 6 muestras recolectadas aleatoriamente en cosecha. Cada muestra de 2,5 kg aproximadamente. Se realizará análisis de cáscaras.
ALMACÉN DEL FONDO	Semilla y Cáscara	8	Del almacén, se tomarán 4 a 6 muestras recolectadas aleatoriamente. Cada muestra de 2,5 kg aproximadamente. Se realizará análisis de semillas y cáscaras.



PROYECTOS DE INNOVACION EN ALIMENTOS SALUDABLES 2015-2016

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

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