

## NOMBRE DEL PROYECTO

IMPLEMENTACIÓN, VALIDACIÓN Y ESTUDIO ANALÍTICO DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES DE OCRATOXINA-A EN VINOS PRODUCIDOS EN CHILE Y DIFUSION DE MEDIDAS DE MINIMIZACION PARA ASEGURAR SU INOCUIDAD Y FORTALECER SU COMPETIVIDAD

## ZONA GEOGRÁFICA DE EJECUCIÓN

Regiones IV, V, Metropolitana, VI, VII y VIII.

## INSTITUCIONES RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.

AGENTE POSTULANTE RESPONSABLE DEL PROYECTO:

**NOMBRE O RAZÓN SOCIAL:** Innovación y Tecnología Vitivinícola S.A (VINNOVA)

INSTITUCIÓN ASOCIADA PARA LA EJECUCIÓN I:

**NOMBRE O RAZÓN SOCIAL** Universidad de Concepción

INSTITUCIÓN ASOCIADA PARA LA EJECUCIÓN II:

**NOMBRE O RAZÓN SOCIAL** Pontificia Universidad Católica de Chile

## RESUMEN DE COSTOS Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO ( \$ ).

COSTO TOTAL	M\$ 447.176,128	100%
APORTE FONDO	M\$ 223.205,020	50%
APORTE POSTULANTE	M\$ 223.971,108	50%

## PROPÓSITO.

Por lo expuesto en los párrafos precedentes, como bien lo ha reconocido el Servicio Agrícola y Ganadero, incluyendo esta temática en el marco del presente concurso, es prioritario abordarla.

### **Propósito principal**

- El propósito principal del proyecto es, tal como se estableciera en las bases, realizar mediante métodos analíticos debidamente validados y reconocidos por los organismos pertinentes, un análisis diagnóstico de los niveles de OTA en vinos producidos en Chile, tanto aquellos destinados al mercado externo, preferente - pero no exclusivamente - hacia la Unión Europea, como aquellos destinados al consumo interno, con el fin de contribuir así a la seguridad alimentaria de los consumidores nacionales.

### **Propósitos complementarios**

En la búsqueda de una solución más integral de la problemática de la OTA en el vino producido en Chile, los proponentes contemplan los siguientes propósitos complementarios:

- Recopilación, análisis crítico, actualización periódica y difusión mediante talleres y manuales entre los productores nacionales del estado del arte a nivel internacional y la información disponible a nivel nacional sobre las medidas prioritarias para minimizar la presencia de OTA en vinos y productos afines. En este último aspecto también confluirán, a medida que se generen, los resultados de investigaciones complementarias al presente proyecto a nivel nacional, especialmente aquella que sobre hongos y micotoxinas se está llevando a cabo en el marco del Consorcio VINNOVA en la UC, en el cual se realizará un diagnóstico de los hongos productores de toxinas dañinas y se desarrollarán estrategias para el control de estos microorganismos.
- Fortalecimiento de la posición de Chile como país exportador de vino, demostrando ser un socio comercial confiable y responsable que hace uso de las buenas prácticas vitivinícolas en las distintas etapas de producción y que aborda la temática de la OTA en vinos en forma integral y con ello de paso fortalece su rol como interlocutor científico-técnico ante los organismos internacionales pertinentes (OIV, Codex Alimentarius, Unión Europea, FDA), tanto en aspectos analíticos como de minimización de OTA en vinos.

## RESULTADOS ESPERADOS

Al término de la presente propuesta se tiene previsto contar con:

1. Metodología de determinación de OTA en vinos debidamente implementada y validada, considerando criterios preestablecidos de límites de detección y cuantificación, precisión exactitud y rango lineal, sometidos a validación externa, reconocidos internacionalmente, de acuerdo a los cánones de la OIV, el Codex Alimentarius, la Unión Europea y otros organismos pertinentes. Ello involucra tanto

a la metodología analítica actualmente reconocida por la OIV, con columnas de inmunoafinidad como otras posibles alternativas de menor costo que surjan del presente proyecto y/o sean presentados por estados miembros a los organismos pertinentes de la OIV.

2. a) Un diagnóstico de la situación nacional en cuanto a niveles de OTA en vinos destinados al consumo interno, siguiendo los lineamientos de la Unión Europea para un muestreo representativo del mercado nacional.
- b) Un diagnóstico de los niveles de OTA en vinos destinados a la exportación, considerando año de cosecha, variedad y las zonas vitivinícolas más importantes.
- c) Una focalización estratégica de áreas geográficas, variedades y/o segmentos del sector productivo que, en base a los niveles detectados de OTA, requieran una atención prioritaria para la minimización de los niveles en vino y productos derivados.
3. a) Manuales de divulgación que expliquen en forma didáctica las medidas prioritarias de minimización de los niveles de OTA en vinos y productos derivados.
- b) Productores y procesadores capacitados en las zonas más afectadas por niveles relevantes de OTA en las estrategias prioritarias para reducirlos.

### FECHA DE INICIO Y DURACIÓN DEL PROYECTO (EN MESES).

FECHA DE INICIO	1 de Abril de 2007
FECHA DE TÉRMINO	31 de Diciembre de 2010
DURACIÓN DEL PROYECTO (MESES)	45

### BENEFICIOS DEL PROYECTO

- Un análisis diagnóstico de los niveles de OTA en vinos producidos en Chile contribuirá a fortalecer la seguridad alimentaria de los consumidores extranjeros y nacionales, mejorando así la competitividad y prestigio de los productos vitivinícolas chilenos en los distintos mercados de destino fortaleciendo la posición de Chile como país exportador de vino, demostrando ser un socio comercial confiable y responsable que hace uso de las buenas prácticas vitivinícolas en las distintas etapas de producción y que aborda la temática de la OTA en vinos en forma integral y con ello de paso fortalece su rol como interlocutor científico-técnico ante los organismos internacionales pertinentes (OIV, Codex Alimentarius, Unión Europea, FDA), tanto en aspectos analíticos como de minimización de OTA en vinos.
- Dicho diagnóstico permitirá además focalizar en caso el esfuerzo para minimizar los niveles de OTA en aquellas zonas y segmentos de productos que puedan requerir de atención prioritaria para ello.

- Este esfuerzo de minimización se verá reforzado con medidas de difusión y capacitación apropiada a productores.
- Como en el proyecto, en su etapa final se contempla la intercalibración con laboratorios nacionales, se establecerá una red de laboratorios confiables para la detección y cuantificación de OTA en vinos, extensible a otros alimentos, lo que reforzará la confiabilidad de Chile frente a la problemática OTA a nivel internacional.
- Permitirá validar los protocolos de análisis para la detección cuantitativa de ocratoxina A en vino y establecer los procedimientos para el muestro, procesamiento de muestras y análisis de vinos comerciales, particularmente de aquellos destinados al mercado internacional. Esto será en directo beneficio de la industria vitivinícola nacional.
- Permitirá la formación profesional (pre y postgrado) en materias de micotoxinas, en este caso ocratoxinas en vino, lo que es actualmente una necesidad para poder responder a la seguridad alimentaria que el país demanda en la actualidad.
- Permitirá fortalecer los lazos de colaboración interinstitucionales entre la Universidad de Concepción y la Pontificia Universidad Católica de Chile, al alero del Vinnova como entidad corrdinadora.
- La experiencia que derive del desarrollo de este proyecto en vino eventualmente permitirá extenderla a otros alimentos de origen vegetal susceptibles también de contaminación con esta y otras micotoxinas.

## **BENEFICIARIOS(AS) DIRECTOS(AS) DEL PROYECTO**

Serán beneficiarias directas del presente proyecto las 55 viñas asociadas a Viñas de Chile AG, las cuales representan el 90% de las ventas de productos vitivinícolas en el mercado interno y el 85 % de las exportaciones. Indirectamente los beneficios irradiarán al resto del sector vitivinícola nacional, potenciando sus exportaciones.

Otros beneficiarios directos serán el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y el Instituto de Salud Pública (ISP), porque contarán con un diagnóstico y con una metodología analítica validada e internacionalmente reconocida que permitirán establecer en el país, normativas y límites para una micotoxina de creciente interés en los mercados internacionales por su comprobada toxicidad.

Indirectamente los resultados obtenidos permitirán además controlar OTA en otros alimentos e insumos para alimentos destinados a alimentación humana y animal.

Este proyecto contribuirá en el segmento vitivinícola a consolidar la imagen de Chile como exportador de alimentos sanos y bioseguros, ayudando a transformar a Chile en una potencia alimentaria, como lo señalara recientemente el Ministro de Agricultura, Dr. Alvaro Rojas.

Por último no hay que olvidar que una eventual contaminación con no detectada oportunamente puede poner en riesgo la emergente y creciente actividad vitivinícola nacional, poniendo en serio riesgo una actividad económica sustentada en un número muy significativo de trabajadores y productores, muchos de los cuales sólo cultivan superficies pequeñas, como lo demuestra el catasro vitivinicola del SAG,

especialmente para la Zona Vitivinícola del Sur (Valles del Itata y Bío-Bío), expuestos a una mayor pluviometría durante la época de cosecha y por tanta mayor riesgo de formación de OTA.

## DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA

### METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para la determinación de OTA en vino, se implementará la metodología actualmente vigente en la OIV, la que dispone el uso de columnas de inmunoafinidad para la extracción de OTA y su determinación mediante HPLC de fase inversa y detección fluorimétrica. Para la validación, se seguirá el protocolo mínimo de aceptabilidad de métodos para el análisis de contaminantes en alimentos, descrito en el anexo III de la Directiva EC 882/2004 de la Comunidad Europea. Según esta Directiva, todos los métodos de análisis deberán regirse por los siguientes criterios:

- a) Exactitud
- b) Aplicabilidad (Tipo de matriz y rango de concentración): La metodología de la OIV dispone el uso de las columnas de inmunoafinidad, pero no especifica algún o algunos proveedores en particular. En Chile existe distribución para las columnas Ochraprep® y Ochratest®. En la fase de implementación se evaluará la eficiencia de ambas columnas de acuerdo a las características de la matriz en estudio, considerando también otros posibles proveedores que puedan surgir.
- c) Límite de Detección
- d) Límite de Determinación
- e) Precisión
- f) Repetibilidad
- g) Recuperación: En este caso el rango aceptable dependerá de la concentración de trabajo, que especifica un rango de recuperación de 50 a 120%, si la concentración es menor a 1 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) y un rango de 70 a 110% de recuperación para rangos de trabajo de 1 a 10 ppb. Las sobrecargas se realizarán a los niveles de 70%, 100% y 120% de los máximos de tolerancia de la Comunidad Europea, que fija en 2 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) el máximo de tolerancia.

Con el fin de verificar los porcentajes de recuperación, las validaciones internas se realizarán usando muestras FAPAS® (Food Analysis Performance Assessment Scheme) u otras disponibles que pueden servir como referencia.

- h) Sensibilidad
- i) Selectividad

Todos estos criterios serán adecuados a las especificaciones que se aplican para Ocratoxina A en alimentos y en particular para vinos, detalladas en la Directiva EC 401/2006. El tiempo de trabajo estimado para la validación de la metodología OIV es de 8 meses. (Pasarlo a Plan de Trabajo)

Para la validación interna, se procederá al análisis de muestras certificadas FAPAS®, mientras que para la validación externa se contempla la participación en las rondas de FAPAS, además de intercomparaciones con otros laboratorios acreditados, los cuales serán minuciosamente seleccionados, siguiendo como criterio la correcta aplicabilidad de esta metodología. Dentro de



las etapas de puesta a punto de la metodología, también se contempla un ejercicio de intercomparación con los laboratorios nacionales que realicen análisis de OTA en vino y deseen participar, el que será organizado por la unidad ejecutora con la asesoría de la División de Metrología del Instituto Nacional de Normalización (INN). Se realizará un catastro con los laboratorios que estén realizando análisis de OTA y se les invitará a participar, siguiendo un protocolo previo de intercomparación de laboratorios. Para el ensayo de intercomparación se optará por la utilización de muestras FAPAS o la preparación de muestras naturales o contaminadas artificialmente, cuya homogeneidad haya sido evaluada, las que posteriormente se distribuirán a los laboratorios participantes. Se considera clave este aspecto, pues contribuirá no sólo a asegurar la calidad de resultados del presente proyecto, sino también la de aquellos que certifiquen vinos destinados a la exportación.

En forma paralela se evaluarán métodos alternativos a las columnas de inmunoafinidad para la preparación de muestras, descritos en la literatura científica internacional, que impliquen un menor costo por análisis, el que se deriva principalmente del reemplazo de las columnas de inmunoafinidad. Específicamente se propone implementar métodos utilizando cartuchos para extracción en fase C18, los cuales han sido evaluados previamente con resultados satisfactorios, pero que aún no han sido aprobados por la OIV. Se buscará validar dicho método alternativo, considerando también la normativa del anexo III de la Directiva EC 882/2004 de la Unión Europea, con el objeto de verificar si los resultados son estadísticamente comparables con los obtenidos usando el método actualmente vigente de la OIV para determinación de OTA en vinos.

Además de la evaluación y validación de este método alternativo de purificación, se implementará el uso de un método de confirmación, también descrito en la literatura científica, que es específico para OTA y que involucra una sencilla reacción de derivación y determinación mediante HPLC y detección de fluorescencia. En este contexto. Como otra alternativa, y para verificar resultados, se evaluará el uso de GC-MS previa derivación con Bis[trimetilsilil] trifluoroacetamida en acetato de etilo como método confirmatorio.

## METODOLOGÍA DE MUESTREO

El muestreo tiene por objetivo, analizar la situación nacional respecto a OTA en los vinos, tanto para el mercado interno como para la exportación. Respecto a los productos destinados a la Unión Europea, este organismo ha instaurado una serie de medidas que deberán asumir los terceros países con el fin de cumplir de forma satisfactoria con el artículo V de la directiva EC 882/2004. Con este objetivo, durante el primer año se diseñará y aplicará un plan de muestreo exploratorio, para evaluar en forma preliminar la situación y diseñar en base a dichos resultados los muestreos de los años siguientes. En el diseño de los planes de muestreo se tendrán en cuenta los criterios de muestreo establecidos en el Reglamento N° 401/2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, en particular lo referente a OTA en vino.

El muestreo exploratorio comprende analizar en forma simultánea el mercado interno y el mercado de las exportaciones. Dentro de los criterios de selección de muestra se considerará:

**a) Zona de cultivo:** De acuerdo a este criterio se evaluará la situación de los valles de la Zona Norte, Valle Central y Zona Sur, con el fin de establecer posibles relaciones geográficas entre la presencia-ausencia de OTA y las condiciones agroclimáticas y ambientales.

**b) Año de cosecha:** Esta evaluación se llevará a cabo año a año, con el fin de establecer posibles variaciones interanuales sobre los niveles de OTA, derivadas de la influencia de factores meteorológicos.

**c) Tipo de vino:** Una primera evaluación de los tipos de vino comprende el estudio de los vinos blancos, tintos y rosados. Esta evaluación tiene por objetivo verificar en Chile si aquí también se cumple lo que señalado para otros países, si existe una mayor frecuencia y/o nivel de contaminación con OTA, inherente al procesamiento, la variedad o el origen geográfico o época de cosecha, en donde se prestará especial atención a los vinos de postre o de cosecha tardía (Late harvest), ya que la literatura los señala como los vinos con mayores niveles de OTA.

**d) Tipo de envase:** se considerarán en el muestreo no solamente aquellos vinos que se expenden en botellas de vidrio, sino que también aquellos generalmente de menor, que se comercializan en otro tipo de envase como así mismo los vinos que se exportan a granel.

En los muestreos posteriores se realizará una focalización del muestreo, ponderando tanto los resultados del muestreo exploratorio como los volúmenes de producción involucrados en cada caso

#### **METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE RESULTADOS**

En un primer análisis de los resultados se aplicarán métodos estadísticos descriptivos para observar las tendencias generales de los datos y agrupar las muestras de acuerdo a los resultados encontrados, con el objeto de detectar los factores que podrían favorecer la presencia de OTA en vinos. Para ello se evaluarán los niveles de concentración de OTA encontrados en vinos, respecto a zona de origen, año de producción, variedad, tipo de vino (blanco, tinto, rosado, cosecha tardía), y también respecto a si es vino embotellado, en tetrapak o a granel, y si corresponde a vinos de exportación o vinos de consumo interno.

Así mismo, se aplicarán herramientas estadísticas más complejas, como métodos multivariantes, análisis de componentes principales y otros que serán evaluados a la luz de los resultados obtenidos. Los análisis quimiométricos se llevarán a cabo usando el Software Pirouette® y/o Statistica®.

#### **Recopilación de información en cuanto a situación y condiciones de producción de OTA**

Efecto de factores ambientales (temperatura y humedad) sobre poblaciones de especies de *Aspergillus*. Se propone focalizar los trabajos de este proyecto en el género *Aspergillus*, algunas de cuyas especies son potencialmente productores de ocratoxina A. Específicamente se espera estudiar: 1. La respuesta a la temperatura de especies del género *Aspergillus* en condiciones controladas de laboratorio y en el campo. 2. Estudiar la presencia epifita de *Aspergillus* en el viñedo a través del periodo comprendido entre el envero y la cosecha. 3. Caracterizar patológicamente los principales aislados. 4. Determinar la capacidad de producción de ocratoxina A. Para esto se obtendrán aislados en al menos cinco viñedos ubicados en zonas geográficas diferentes de la zona norte, central y sur del área de producción vitivinícola nacional.

#### **Priorización de medidas para disminuir presencia de OTA Se propone:**

1. Revisar las medidas propuesta previamente por OIV para reducir la incidencia de los hongos productores de ocratoxina A en el viñedo y en la bodega.
2. Estudiar el efecto de la época de cosecha sobre el desarrollo de *Aspergillus*, particularmente



de especies y razas productores de ocratoxina A. Este fase del trabajo se realizara en dos lugares geográficamente diferentes.

**Preparación de manual de medidas de prevención de presencia de OTA.**

Dicho manual incluirá:

1. Aspectos generales de los hongos,
2. Micotoxinas, caracterización química y biológica,
3. Especies y razas productoras de micotoxinas,
4. Estrategias de detección. y 5. Medidas para minimizar su presencia y reducir los riesgos de contaminación del mosto y del vino.

**Talleres de difusión de resultados del proyecto a productores y personal relacionado con elaboración de vino.**

En cada taller se preparará un conjunto de diapositivas en power point incluyendo entre otros los siguientes aspectos:

1. Hongos,
2. Especies fungosas productoras de micotoxinas,
3. Micotoxinas aspectos físicos químicos y biológicos.
4. Detección y 5. Estrategias de control.