



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN VINOS COMERCIALES CHILENOS

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de
Magister en Enología y Vitivinicultura

ELIANA INÉS SEGUEL RUBIO

Directores de Tesis
ELÍAS OBREQUE SLIER
AMÉRICO LÓPEZ RIVERA

Profesores Consejeros
REMIGIO LÓPEZ SOLÍS
EDUARDO LOYOLA MADARIAGA

SANTIAGO - CHILE
2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO**

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN VINOS
COMERCIALES CHILENOS**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Enología y Vitivinicultura.

ELIANA INÉS SEGUEL RUBIO

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)	Firma
DIRECTORES DE TESIS			
Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,8	Aprobado	_____
Américo López Rivera Tecnólogo Medico, MS.	7,0	Aprobado	_____
PROFESORES CONSEJEROS			
Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	7,0	Aprobado	_____
Eduardo Loyola Madariaga Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,5	Aprobado	_____

Santiago. Chile

2013

TÍTULO

Determinación y Cuantificación de Aflatoxinas en Vinos Comerciales Chilenos

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mis profesores guías Elías Obreque Slier y Américo López Rivera, por todo el apoyo brindado durante el tiempo de este estudio, por sus consejos, su paciencia y por la confianza en mi trabajo, por compartir sus conocimientos, y por enseñarme el respeto por la investigación científica.

A mi Familia, mis padres Olimpia y Daniel por su amor y apoyo inagotable y por entregarme los valores y pilares que han formado mi vida, a mis abuelos Eliana y Agustín, porque desde un comienzo me inculcaron el gusto por aprender, a mis hermanos Margarita y Daniel que siempre han estado ahí apoyándome, a mis cuñados, a mis sobrinas Pía, M^o Jesús, Josefa y Amparo.

A mi nueva Familia Troncoso Veas, a mi suegra Marilú, a mis cuñadas (o) y a sus familias, por recibirme con cariño y hacerme parte de sus vidas.

A todo el personal técnico y profesional del Laboratorio de Toxicología (Isabel, Jacqueline), y al personal del Laboratorio de Enología (Laly, Manolo, Lily, Teo, Rosita), por su colaboración y buena disposición.

A mis Profesores y amigos de Antumapu en especial a mis futuros colegas, Vero, Sole, Jowi, Lore, Pancho y Raúl, por la amistad forjada en estos años.

A las nuevas amistades hechas en el Magister, por los buenos momentos y experiencias compartidas.

A Paul, Renee, Barry, Rebecca, Nicky Hahn y todo el equipo de trabajo de Hahn Estates Winery por los años de amistad y por la oportunidad de formarme como profesional.

Al financiamiento provisto por el proyecto Fondecyt 11121322

Y mi último agradecimiento, pero no menos importante...es para ti Juan Carlos, mi amor, compañero de aventuras, por acompañarme en este viaje, por amarme y creer en mí, por tu fortaleza e incondicionalidad....Gracias...por querer cerrar este ciclo conmigo.

Muchas Gracias.....

DEDICATORIA

*En especial a mi familia y amigos
y
A todos aquellos que creyeron y creen en mí*

INDICE

RESUMEN	1
Palabras Claves	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
CAPITULO I: DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN VINOS COMERCIALES CHILENOS	7
RESUMEN	8
Palabras Claves	8
ABSTRACT	9
Keyword	9
INTRODUCCIÓN	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Lugar de Estudio	13
Materiales	13
Método	17
Tratamiento y Diseño Experimental	17
Procedimiento	17
Parámetros de validación del método	18
Variables a medir	20
Análisis estadístico	20

RESULTADOS	21
Perfiles cromatográficos	21
Curvas de calibración y Linealidad	22
Límite de detección y Límite de cuantificación	25
Recuperación	26
Estabilidad	27
Determinación y Cuantificación de AFLAs en vinos	29
Caracterización química de los vinos	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
APÉNDICES	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Superficies plantadas por variedad en la región vitivinícola del Valle Central	6
Cuadro 2. Vinos blancos utilizados en el estudio	15
Cuadro 3. Vinos tintos utilizados en el estudio	16
Cuadro 4. Límites de detección y cuantificación de las cuatro AFLAs en vino blanco y tinto fortificados	25
Cuadro 5. Porcentaje de recuperación de las distintas AFLAs	26
Cuadro 6. Estabilidad de AFLAs	29
Cuadro 7. Concentración de AFLAs en vinos Chardonnay y Sauvignon Blanc	31
Cuadro 8. Concentración de AFLAs en vinos Carménère y Cabernet Sauvignon	32
Cuadro 9. Análisis enológicos de los vinos Chardonnay	33
Cuadro 10. Análisis enológicos de los vinos Sauvignon Blanc	34
Cuadro 11. Análisis enológicos de los vinos Carménère	34
Cuadro 12. Análisis enológicos de los vinos Cabernet Sauvignon	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las AFLAs	4
Figura 2. Cromatograma representativo de una mezcla de estándares puros de AFLAs	21
Figura 3. Cromatograma representativo de vino blanco fortificado con una mezcla de AFLAs	22
Figura 4. Cromatograma representativo de vino tinto fortificado con una mezcla de AFLAs	22
Figura 5. Curvas de calibración de mezclas de estándares de AFLAs	24
Figura 6. Estabilidad de AFLAs en vino blanco durante cuatro semanas	27
Figura 7. Estabilidad de AFLAs en vino tinto durante cuatro semanas	28
Figura 8. Cromatogramas representativos de los vinos analizados a) vino 1; b) vino 17; c) vino 36; d) vino 40	39

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico que poseen una alta toxicidad. Estas micotoxinas se han asociado con la presencia de hepatocarcinomas en humanos y se han catalogado como agentes inmunosupresores, genotóxicos, teratogénicos y hepato-tóxicos.

Es por ello, que diversos organismos internacionales han fijado límites regulatorios en determinados alimentos. Así, la OIV definió una concentración máxima de AFLAs en el vino de 4 µg/kg. A pesar de lo anterior, existe limitada información acerca de la presencia de estos compuestos en vinos y de una metodología precisa, confiable y fácil de reproducir para su identificación y cuantificación en la matriz vínica.

El objetivo de este estudio fue optimizar un método para la determinación y cuantificación de AFLAs G1, B1, G2 y B2 mediante la utilización de la técnica de HPLC-FL mediante el uso de columnas de inmunoafinidad en vinos blancos y tintos.

Se observó que la metodología propuesta fue lineal en el rango de concentraciones de 1,5 a 24 ng/mL en vinos blancos y tintos fortificados, obteniendo valores de coeficiente de determinación entre 0.990 y 0.999. Además, parámetros de validación como porcentaje de recuperación (entre 91,6 y 103,7%) y estabilidad (% CV ente 2,41 y 4,36%) cumplieron con los requerimientos internacionales y nacionales señalados por la FDA y el ISP respectivamente. Asimismo, los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) obtenidos, permiten detectar AFLAs por debajo del límite regulatorio establecido por la OIV. Finalmente, en las 48 muestras de vinos analizadas no se detectó ninguna de las AFLAs.

Palabras Claves:

HPLC-FL, Aflatoxinas, Vino,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MICOTOXINAS

Las “micotoxinas” son metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos filamentosos, que pueden llegar a ser tóxicos si son ingeridos en altas concentraciones por humanos y/o animales (Moss, 1996). Se ha descrito que los principales géneros de hongos productores de micotoxinas y contaminantes de alimentos son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Binder, 2007; CAST, 2003; Kumar *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha descrito que existen diversas micotoxinas pero sólo algunas son detectadas en los alimentos. De acuerdo al Council Agriculture Science Technology (CAST, 2003) y a la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 2002), las más relevantes para la salud humana son: Tricotecenos, Fumosinas, Zearalenonas, Ocratoxina A, Alcaloides de Ergot y Aflatoxinas.

AFLATOXINAS

Las aflatoxinas (AFLAs) son los metabolitos secundarios más tóxicos dentro de las micotoxinas. Estas moléculas derivan de compuestos de difurano-cumarinas (Isaac, 1994); pentanonas (B1 y B2) y lactonas (G1 y G2) (Figura 1), con fluorescencia azul (B) y verde (G) respectivamente, bajo la luz UV (Moss, 1996). Se han descrito alrededor de 20 aflatoxinas, pero solo B1, B2, G1 y G2 han sido encontradas en alimentos de forma natural, siendo B1 la más importante del punto de vista tóxico (Moss, 1996; Richard, 2007).

En la actualidad sólo se conocen cuatro especies de hongos productores de aflatoxinas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nonius* y *Aspergillus pseudotamarii*. Las dos primeras especies son consideradas de mayor importancia ya que se encuentran propagadas tanto en zonas tropicales como en sub tropicales. Además, estos microorganismos pueden infectar un gran número de cultivos y productos agrícolas que son demandados por millones de consumidores alrededor de todo el mundo (CAST, 2003). Más aún, el género *Aspergillus* representa una gran familia distribuida entre las latitudes 26° a 36° al Norte y Sur de la línea del Ecuador (Moss, 2002a), lo que podría incidir fuertemente en Chile que se ubica entre los 17°30' y 56°30' de latitud Sur.

Se ha reportado que estos microorganismos son capaces de producir aflatoxinas en un rango óptimo de temperatura de 20-30 °C y con actividad de agua (a_w) de 0,87- 0,998 (Rodríguez, 2013). Otras propiedades físico-químicas de las aflatoxinas señaladas por la IARC (2002) son:

- Descripción: cristales incoloros a amarillo pálido, intensamente fluorescentes bajo la luz ultravioleta, azul (B1, B2) y verde (G1, G2).

- Solubilidad: muy poco soluble en agua (10-30 µg/ml), insolubles en solventes no polares, muy solubles en solventes polares orgánicos como cloroformo, metanol y acetonitrilo.
- Reactividad: el anillo de lactonas es susceptible a hidrólisis alcalina. Las aflatoxinas pueden ser degradadas también por reacciones con amoníaco o hipoclorito de sodio.
- Absorción espectrofotométrica: entre 223 y 365 nm.
- Puntos de ebullición: entre 244 y 289 °C.
- Pesos moleculares: aflatoxina B1 (AFB1), C₁₇H₁₂O₆ (PM: 312.3 g/mol); aflatoxina B2 (AFB2), C₁₇H₁₄O₆ (PM: 314.3 g/mol); aflatoxina G1 (AFG1), C₁₇H₁₂O₇ (PM: 328.3 g/mol); aflatoxina G2 (AFG2) C₁₇H₁₄O₇ (PM: 330.3 g/mol) (Figura 1).

Las AFLAs son consideradas como agentes genotóxicos, inmunosupresores y hepatocarcinógeno, y de acuerdo a la International Agency of Research on Cancer son catalogadas dentro del Grupo I en su incidencia del cáncer hepático en humanos (IARC, 2002; Moss, 2002b).

Al ser consumidas las AFLAs son metabolizadas en el hígado por un complejo de enzimas oxidadas y citosólicas, produciendo una serie de metabolitos que inhiben la síntesis de RNA mensajero y la síntesis de algunas proteínas (Pushner, 2002). A nivel molecular, las AFLAs pueden ser oxidadas a epóxido *AFB1- 8,9*, el cuál es un fuerte generador de moléculas oxigenadas reactivas, las que pueden guiar a oxidación de lípidos, generando mutaciones y células dañadas (Guedes y Eriksson, 2006; Moss, 2002a; Moss, 2002b).

Debido a lo mencionado anterior, en los últimos años la reglamentación sobre AFLAs en los alimentos ha aumentado considerablemente, fijándose límites regulatorios detallados y específicos para alimentos, lácteos y raciones de consumo animal. Por ejemplo, la Comisión Europea fijó los valores máximos dependiendo del tipo de alimento y sus derivados en 2 µg/kg para AFB1 y 4 µg/kg para la suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 (European Union Commission Regulation, 2006). Por otra parte la agencia Food Drugs Administration (FDA, 2003) fijó valores diferenciados dependiendo del tipo de alimento, por ejemplo 25 µg/kg para maní y sus subproductos y 20 µg/kg para otros alimentos de consumo humano en EEUU. Finalmente, en Chile el Ministerio de Salud Pública, ha fijado una concentración máxima de 5 µg/kg en todos los alimentos destinados al consumo humano (Ministerio de Salud, 2010).

Aunque existe limitada información acerca de la contaminación de AFLAs en el vino tanto en Chile como en el mundo, esto no asegura su inexistencia. Es importante notar que los cambios climáticos ocurridos en las últimas décadas producto del calentamiento global, ha originado probablemente que los hongos hayan modificado sus requerimientos y adaptación a nuevas condiciones (Tamura *et al.*, 2012). En países como España, Portugal (Martínez-Culebra *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2005), Argentina y Brasil (Da Rocha *et al.*, 2002; Magnoli *et al.*, 2003), se han obtenido resultados positivos a la presencia de *Aspergillus flavus* en el viñedo.

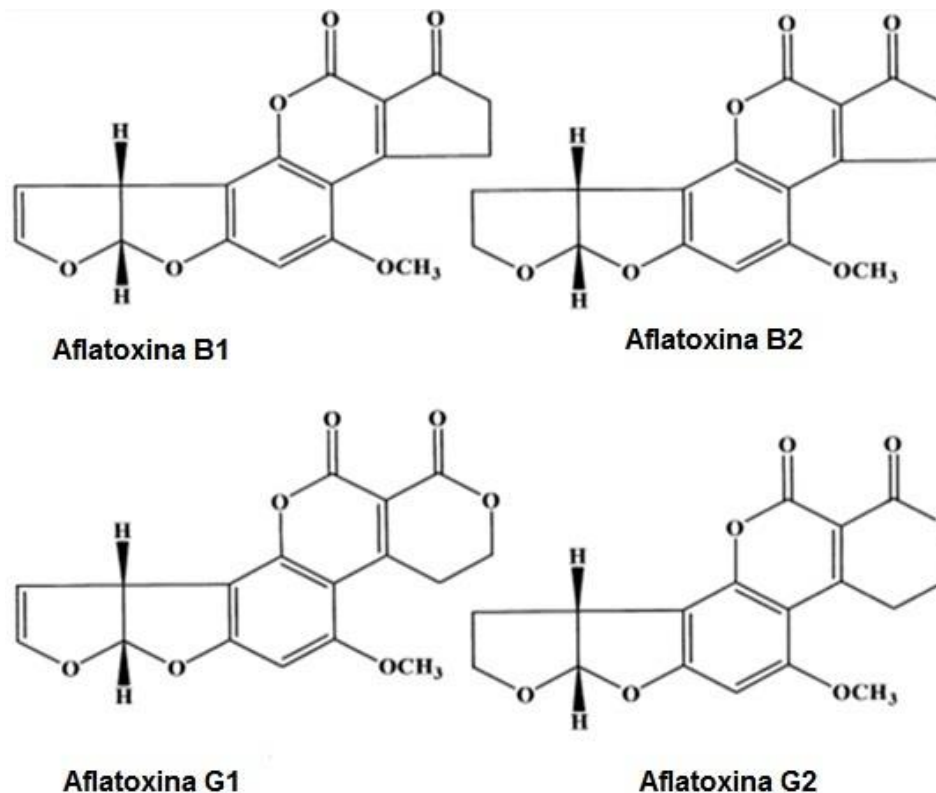


Figura 1. Estructura química de las AFLAs (Moss, 2002b).

Desde el descubrimiento de las AFLAs, diferentes metodologías se han utilizado para su determinación, tales como, ensayo de inmuno-absorción con reacción enzimática (ELISA), cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Anklam *et al.*, 2002; Stroka *et al.*, 2002).

Así, se ha logrado cuantificar AFLAs en numerosos productos vegetales tales como maíz, arroz, sorgo, nueces, especias, ají (Kumar *et al.*, 2008), cocoa (Copetti *et al.*, 2011), maní, pistachos, higos, aceites vegetales y porotos y frutos secos (CAST, 2003). Chan *et al.*, (2004), sostienen que diversos “commodities” como el chocolate, las especias y el vino deberían ser consideradas dentro de los productos con limitación en el contenido de AFLAs. Es por ello que la Organización Internacional del Vino y de la Vid (OIV) en su *Codex Enológico*, ha establecido un contenido máximo de AFLAs en vino de 4 µg/kg para B1 o de 4 µg/kg para la suma de AFLAs B1, B2, G1 y G2 (OIV, 2012).

Takahashi (1977), propuso una metodología para la determinación de AFLAs en vinos, con materiales que actualmente están obsoletos y poseen un alto grado de contaminación. El Khoury *et al.*, (2008), evaluaron la presencia de AFLAs en siete regiones vitivinícolas de El Líbano, la cual se llevó a cabo en muestras de uvas y de mosto, obteniendo valores que demostraban la presencia de las toxinas en ambos casos.

Del mismo modo, Tamura *et al.* (2012), propuso una nueva técnica de análisis a través de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con detector de masa (UHPLC-MS/MS),

donde se analizaron vinos blancos y tintos del mercado interno japonés. Esta investigación se desarrolló para la detección simultánea de 14 micotoxinas incluyendo AFLAs, obteniendo resultados positivos solo para ocratoxina A y fumosina.

Pérez-Ortega *et al.* (2012), desarrolló un método simultáneo para la detección de micotoxinas (incluidas las AFLAs) y residuos de pesticidas a través de un método de cromatografía líquida con espectrometría de masa (LC-MS). Los investigadores estudiaron muestras de vinos comerciales producidos en diferentes regiones de España, detectándose la presencia de AFB2 en un 87,5% de las muestras analizadas en rangos de 1,25 -25,73 µg/L.

Rodríguez (2013), propuso un método de HPLC con detector de fluorescencia, específico para la determinación de AFLAs B1, B2, G1 y G2 en vinos blancos y tintos.

CHILE PRODUCTOR, EXPORTADOR Y CONSUMIDOR DE VINOS

Según datos proporcionados por la OIV (2013), Chile se ubica en el séptimo lugar dentro de los países productores de vino, con 12.5 millones de hL y con un incremento sostenido en la producción del 45% desde el año 2008. Además, es el quinto país exportador de vino a nivel mundial y el primero dentro de los países productores de América con 6 millones de hectolitros en el año 2011. De acuerdo al boletín de precios y comercio exterior de vinos y pisco (Odepa, 2012), los principales países compradores de vinos chilenos (embotellado y a granel) con Denominación de Origen son el Reino Unido, EEUU, Japón y Brasil.

Por otro lado, de acuerdo al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, 2012), Chile posee una superficie plantada de 125.946 há total de vides para vino (33.655 há para variedades blancas y 92.290 há para variedades tintas), siendo la región vitivinícola del Valle Central, la cual se extiende entre la provincia de Chacabuco y la provincia de Cauquenes y Linares (SAG, 2011), la que presenta una mayor superficie plantada alcanzando un 85.6 % del total nacional

La producción vitivinícola chilena se concentra (77%) en sólo cinco variedades (SAG, 2012), Sauvignon Blanc es la variedad blanca más plantada con una superficie total de 13.922 há de las cuales el 71% se encuentra cultivado en el Valle Central, y un volumen del 13,5% de la producción nacional. El segundo lugar lo ocupa la variedad Chardonnay, con un total de 10.970 há y una producción del 9% del volumen total nacional. En el caso de las variedades tintas, el cultivar más importante es la cepa Cabernet Sauvignon con un total de 40.836 há y una producción de aproximadamente 340 millones de litros, correspondiente al 33% del volumen producido en el 2012, mientras que Carménère (cepa emblemática chilena) ocupa el tercer lugar en superficie después de Merlot con 10.040 há totales y una producción con un aumento progresivo que el 2012 alcanzó el 8% de la producción total (70 millones de litros) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Superficies plantadas por variedad en la región vitivinícola del Valle Central.

Región	Cabernet Sauvignon	Carménère	Chardonnay	Sauvignon Blanc
VI	17.121	5.449	2.708	2.092
VII	15.789	3.452	3.508	7.113
RM	6.619	898	951	677
Total regiones VI, VII y RM	39.529	9.799	7.167	9.882
Total Nacional	40.836	10.040	10.970	13.922
% del Total Nacional	97%	98%	65%	71%

La producción nacional de vinos en el año 2012 alcanzó a mil doscientos millones de litros, de los cuales el 81% corresponden a vinos con denominación de origen (DO), es decir, aquellos vinos provenientes de las regiones y las variedades que se encuentran registradas en el artículo 1 del Decreto N°464, Ley 18.455 (SAG, 2011).

Es importante mencionar que en el mercado chileno interno se calcula un consumo *per cápita* de alrededor de los 15 L (Figuroa *et al.*, 2010). De acuerdo al estudio realizado por Melo *et al.* (2005), el consumidor chileno de vino se caracteriza por presentar una frecuencia de consumo relativamente alta y una preferencia por el vino tinto por sobre vinos blancos. Entre los factores más importantes que determinan la elección de un vino se encuentran ‘calidad’, ‘precio’, y ‘experiencia anterior’.

En el mercado chileno interno, cerca de un 50% de los vinos comprados son de bajo valor comercial, y corresponden a botellas de 1,5 L y envases “tetra pack”, cuyo valor no supera los \$1.500 unidad (De los Reyes, 2011; Figuroa *et al.*, 2010; Saavedra, 2008), mientras que solo el 4% de las ventas corresponde a vinos con valores por sobre los \$3.000 pesos (Tapia, 2009).

En la actualidad, es un desafío que Chile sea reconocido mundialmente como un país proveedor de alimentos inocuos, más aún cuando las investigaciones referentes a las contaminaciones de AFLAs en alimentos, demuestran sus potenciales peligros sobre la salud humana. De la misma manera y considerando que los hongos productores de AFLAs pueden encontrar nichos favorables para su desarrollo en los viñedos chilenos, es de gran importancia ahondar en el conocimiento de esta área. Finalmente, a pesar del protagonismo que posee Chile dentro de la industria vitivinícola mundial, sólo existen antecedentes preliminares relacionados con la identificación y cuantificación de AFLAs en vino chileno.

CAPITULO I

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN VINOS
COMERCIALES CHILENOS**

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico que poseen una alta toxicidad. Estas micotoxinas se han asociado con la presencia de hepatocarcinomas en humanos y se han catalogado como agentes inmunosupresores, genotóxicos, teratogénicos y hepato-tóxicos.

Es por ello, que diversos organismos internacionales han fijado límites regulatorios en determinados alimentos. Así, la OIV definió una concentración máxima de AFLAs en el vino de 4 µg/Kg. A pesar de lo anterior, existe limitada información acerca de la presencia de estos compuestos en vinos y de una metodología precisa, confiable y fácil de reproducir para su identificación y cuantificación en la matriz vínica.

El objetivo de este estudio fue optimizar un método para la determinación y cuantificación de AFLAs G1, B1, G2 y B2 mediante la utilización de la técnica de HPLC-FL mediante el uso de columnas de inmunoafinidad en vinos blancos y tintos.

Se observó que la metodología propuesta fue lineal en el rango de concentraciones de 1,5 a 24 ng/mL en vinos blancos y tintos fortificados. Además, los parámetros de validación como porcentaje de recuperación (entre 91,6 y 103,7%) y estabilidad (% CV ente 2,41 y 4,36%) cumplieron con los requerimientos internacionales y nacionales señalados por la FDA y el ISP respectivamente. Asimismo, los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) obtenidos, permiten detectar AFLAs por debajo del límite regulatorio establecido por la OIV. Finalmente, en las 48 muestras de vinos analizadas no se detectó ninguna de las AFLAs.

Palabras Claves:

HPLC-FL, Aflatoxinas, Vino

ABSTRACT

Aflatoxins are considered one of the most important toxins worldwide, due to its well-known and documented toxicity. AFB1 is classified as a human carcinogen (liver), also they are catalogued as mutagenic, immunosuppressive, teratogenic and might cause liver diseases.

Many international organizations have set legal limits to the acceptable levels of AFLAs in human food. The office of vine and wine (OIV) has set a maximum level of 4 µg/Kg in wine. Despite what is been said, there is not enough information regarding the presence of AFLAs in wine, also there is not a method that is accurate and easily reproducible to its determination and quantification on the wine matrix.

The main objective of this research was to improve a method capable of determination and quantification of AFLAs G1, B1, G2, and B2 in white and red wine. The proposed method is based on the use on immunoaffinity columns and HPLC with fluorescence detector.

Determinations performed using this method produced a high correlation coefficients (all above 0.995), showing linearity on the range of 1,5 to 24 ng/mL on whites and red spiked wines. Parameters as recovery rate (91,6-103,7%) and stability (%CV 2,41-4,36%) were within the ranges allowed by the FDA and ISP. The Limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) obtained were under the maximum level set it by the OIV.

48 wines samples were analyzed; none of the AFLAs was detected.

Keys words:

HPLC-FL, Aflatoxins, Wine

INTRODUCCIÓN

Las AFLAs son compuestos altamente tóxicos producidas principalmente por hongos filamentosos como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (IARC, 2002; Richard, 2007). Estas micotoxinas son moléculas derivadas de di-furanocumarinas pentanonas (B1 y B2) y lactonas (G1 y G2) (Isaac, 1994), siendo AFB1 altamente relevante por su gran toxicidad (Richard, 2007). Estos compuestos se han asociados con el cáncer de hígado en humanos y como agentes con efectos genotóxicos, inmunosupresores y teratogénicos (Richard, 2007). Es por ello, que la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 2002), ha recopilado suficiente información científica para clasificarlas en el Grupo I.

Actualmente, ha aumentado considerablemente el número de países que han establecido límites regulatorios para el contenido de AFLAs en alimentos destinados para la alimentación humana como maíz, soya, maní, nueces, almendras y arroz. Se estima que la mayoría de los ellos han fijado como máximo 4 µg/kg (FAO, 2004). En Chile el Ministerio de Salud Pública ha fijado como nivel máximo una concentración de 5 µg/kg (Ministerio de Salud, 2010) para alimentos consumidos por humanos. A pesar de lo anteriormente expuesto no existe una regulación clara y específica para el contenido de AFLAs en vino a nivel mundial. Sin embargo, la Organización Internacional del Vino y de la Vid (OIV) en su *Codex Enológico*, ha establecido un contenido máximo en vino de 4 µg/kg para B1 o para la suma de AFLAs B1, B2, G1 y G2 (OIV, 2012).

Numerosas metodologías para la identificación y cuantificación de AFLAS en alimentos se han desarrollado desde su descubrimiento en 1960, tales como TLC, HPLC (con detector de fluorescencia FL y espectrofotometría de masas MS) y ELISA, las cuales son usadas a diario en alimentos como cereales, frutas deshidratadas, maíz, ají, nueces y arroz (Anklam *et al.*, 2002; CAST, 2003; Stroka *et al.*, 2002).

Uno de los pasos más importantes en todo proceso de análisis es la extracción del analito. Es así que para las técnicas de determinación de AFLAs en alimentos se recomienda el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC), debido a su comprobada exactitud y reproducibilidad con los resultados, bajos niveles de detección (LD) y cuantificación (LC), mayores valores de recuperación del analito y considerable reducción de uso de solventes tóxicos (Chan *et al.*, 2004; Riordan y Wilkinson, 2009).

A pesar de que actualmente se han desarrollado diferentes estudios que cuantifican la presencia de AFLAs en vinos en diferentes zonas del mundo, no existe suficiente información referente a una metodología precisa que incluya la técnica de HPLC-FL y el uso de columnas de inmunoafinidad.

Por otra parte, es importante destacar que Chile ocupa el quinto lugar dentro de los países exportadores y séptimo lugar como productor de vino a nivel mundial con 12 millones de hectolitros y un consumo interno que representa un 40% del total producido y un consumo per cápita de 15 L, destacándose mayormente la compra de productos en un rango

determinado de precio de \$1.500 a \$3.000. Así, es de alta relevancia garantizar a los consumidores la inocuidad de los alimentos producidos en el país, para asegurar la protección de la salud de las personas, así como beneficiar el desarrollo competitivo y exportador de la industria vitivinícola.

HIPÓTESIS

Los vinos chilenos de mayor consumo interno, poseen contenidos de aflatoxinas menores a 4 µg/kg, correspondiente al límite establecido por la OIV.

OBJETIVOS

- General

Determinar la presencia y cuantificar los niveles de AFLAs en vinos chilenos comerciales.

- Específicos

1.- Optimizar un método HPLC-FL utilizando columnas de inmunoafinidad para la identificación y cuantificación de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 en vinos.

2.- Determinar la concentración de AFLAs en vinos tintos y blancos chilenos de alto consumo en el mercado interno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Los análisis de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento, se realizaron en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las mediciones analíticas de los vinos se realizaron en las dependencias y laboratorios de Química Enológica del Departamento de Agro-Industrias y Enología pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

Equipamiento

Se utilizó un Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento Shimadzu (HPLC) equipado con muestreador automático (Prominence SIL-20AC), bomba cuaternaria (Shimadzu DGU-20A 5R) y detector de fluorescencia (Shimadzu RF-10AXL). La columna analítica utilizada fue Phenomenex, Synergy, 4 μ MAX-RP 80^a; 250x4.60mm. Otros equipamientos utilizados fueron:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 UV-VIS (Kioto, Japón).
- Centrífuga Thermo, IEC, IEC multi.
- Homogenizador vortex Labnet VX100
- Balanza de precisión Ohaus
- Baño de ultrasonido Branson 2510
- Baño de agua Kotterman
- Evaporador Thermo Scientific Reacti-Vap III, # TS-18823

Reactivos, solventes y estándares

El metanol y acetonitrilo grado HPLC, ácido acético glacial, ácido trifluoracético, benceno y etanol grado pro análisis, fueron adquiridos en J.T. Baker (EEUU). Los estándares de aflatoxinas aisladas de *Aspergillus flavus* B1, B2, G1, G2 fueron obtenidas en Sigma Aldrich Chemical Company, Saint Louis, Missouri (EEUU). Las columnas de inmunoafinidad (IAC), Aflatest WB^{SR}, fueron adquiridas en Vicam Waters bussines, Milford, Mass. (EEUU).

Muestras de vino a analizar

En el presente estudio se analizaron 48 botellas de vinos varietales, adquiridas en un supermercado de la Región Metropolitana de Santiago. La compra se realizó de forma aleatoria y el precio de los vinos fluctuó entre los 1.500 y 3.890 pesos. Las variedades adquiridas fueron Chardonnay, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon y Carménère, de los años de cosecha 2011 y 2012. Todos los vinos correspondían a la denominación de origen (DO) del Valle Central (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Vinos blancos utilizados en el estudio.

Muestra	Año	Precio
Chardonnay		
Vino 1 Carmen Insigne	2012	\$1.790
Vino 2 Santa Emiliana	2012	\$1.790
Vino 3 Misiones de Rengo	2011	\$1.890
Vino 4 120 Santa Rita, 3 medallas	2011	\$1.790
Vino 5 Valdivieso	2011	\$2.490
Vino 6 Indómita Costa Vera	2011	\$1.890
Vino 7 Sunrise Concha y Toro	2012	\$2.099
Vino 8 Gato Premium	2012	\$1.690
Vino 9 Don Luís, Cousiño Macul	2012	\$3.399
Vino 10 Montgras	2011	\$2.959
Vino 11 Ventisquero	2012	\$1.929
Vino 12 Terra Vega	2011	\$3.899
Sauvignon Blanc		
Vino 13 Terra Andina	2011	\$1.790
Vino 14 Carmen Insigne	2012	\$1.990
Vino 15 Frontera Concha y Toro	2012	\$1.939
Vino 16 Portal del Alto	2011	\$2.390
Vino 17 Santa Emiliana	2012	\$1.790
Vino 18 Misiones de Rengo	2012	\$1.890
Vino 19 Undurraga	2011	\$2.049
Vino 20 Vista Mar Brisa	2011	\$2.390
Vino 21 Isla Negra	2012	\$2.099
Vino 22 Sunrise Concha y Toro	2011	\$2.099
Vino 23 120 Santa Rita, 3 medallas	2012	\$2.990
Vino 24 Terra Vega	2011	\$3.899

Cuadro 3. Vinos tintos utilizados en el estudio.

Muestra	Año	Precio
Carménère		
Vino 25 Carmen Clásico	2011	\$1.690
Vino 26 Don Luís, Cousiño Macul	2011	\$3.399
Vino 27 Santa Emiliana	2011	\$1.790
Vino 28 120 Santa Rita, 3 Medallas	2011	\$1.790
Vino 29 Vista Mar Brisa	2011	\$2.390
Vino 30 35° Sur	2012	\$1.959
Vino 31 Sarmientos de Tarapacá	2012	\$1.440
Vino 32 Misiones de Rengo	2012	\$1.890
Vino 33 León de Tarapacá	2012	\$1.790
Vino 34 Aresti	2011	\$2.390
Vino 35 Gato Premium	2012	\$1.690
Vino 36 Pinot Undurraga	2012	\$2.229
Cabernet Sauvignon		
Vino 37 Carmen Clásico Margaux	2011	\$1.690
Vino 38 Viñedos Emiliana	2011	\$2.699
Vino 39 Tierra Andina	2011	\$1.790
Vino 40 León de Tarapacá	2011	\$1.790
Vino 41 Santa Emiliana	2011	\$1.790
Vino 42 35° Sur	2011	\$1.959
Vino 43 Carmen Clásico Margaux	2012	\$1.990
Vino 44 Misiones de Rengo	2012	\$1.890
Vino 45 120 Santa Rita, 3 Medallas	2012	\$2.790
Vino 46 Isla Negra	2012	\$2.099
Vino 47 Urmeneta	2012	\$1.779
Vino 48 Casa Rivas	2012	\$2.390

Método

Tratamiento y Diseño Experimental

En este estudio se analizaron 48 muestras de vino (12 Chardonnay, 12 Sauvignon Blanc, 12 Cabernet Sauvignon y 12 Carménère). La unidad experimental correspondió a 750 mL de vino. Cada vino se analizó en duplicado y replicado y correspondió a un ensayo independiente y el muestreo se realizó completamente al azar.

Procedimiento

Los vinos adquiridos, se almacenaron en condiciones de oscuridad y temperatura controlada de 20°C hasta el momento de ser analizados. En una primera etapa se realizó el análisis del contenido de AFLAs. Para ello, se obtuvo de cada botella la cantidad de muestra necesaria, manteniendo la botella sellada. En una segunda etapa se realizaron análisis químicos propuestos en este estudio.

Preparación de Estándar. 1 mg de cada aflatoxina (B1, B2, G1 y G2) fue mezclada con 5 mL de solución benceno:acetonitrilo (99:1; v/v). Esta solución patrón fue diluida con el mismo disolvente hasta obtener una mezcla de AFLAs de una concentración de 0,5 µg/mL. Para la muestra de trabajo, se tomó 1 mL de la solución anterior, se evaporó a sequedad con nitrógeno y reconstituyó en 5 mL de acetonitrilo:agua (90:10; v/v) obteniendo una muestra con una concentración de 0,1 µg/mL.

Extracción de AFLAs. Para la preparación de la muestra y extracción de Aflatoxinas se tomaron 2 mL de vino a los cuales se les agregó 18 mL de solución Tween 20-PBS (20/1000 p/v). La mezcla fue agitada por 1 min y centrifugada por 5 minutos a 5.000 rpm (Apéndice N°1). Luego, 10 mL fueron agregados a la columna de inmunoafinidad, previamente activada con 6 mL de solución PBS. La muestra se dejó eluir gravitacionalmente (80 gotas/minuto) para posteriormente lavar la columna con 10 mL de solución Tween 20-PBS (0,1/1000 v/v). Las toxinas retenidas en la columna fueron eluidas con 3 mL de acetonitrilo puro. El volumen eluido fue evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40°C y reconstituido en 500 µL de acetonitrilo:agua (90:10; v/v), para su posterior derivatización.

En las muestras de estándares puros, se tomaron 2 mL de solución estándar y se evaporaron a sequedad con nitrógeno, luego fueron reconstituidos en 2 mL de solución vínica (etanol: agua, 14%) a pH 3,6. A los 2 mL se le agregaron 18 mL de solución Tween 20-PBS (20/1000 p/v) y se procedió de acuerdo a lo indicado anteriormente.

Derivatización de las Aflatoxinas. 400 µL de la solución reconstituida se mezclaron (30 segundos) con 400 µL de la solución derivatizante (agua:ácido trifluoroacético:ácido acético glacial; 70:20:10 v/v). La muestra fue incubada en baño termoregulado a 60°C por 10 min, y luego se enfrió a 22 °C antes de inyectarse.

Condiciones Cromatográficas. La fase móvil consistió en agua:acetonitrilo:metanol (60:20:20) con un flujo de 1 mL/min y un tiempo de corrida de 20 min. La longitud de onda utilizada fue 360 nm de excitación y 440 nm de emisión.

Parámetros de validación del método

Curvas de calibración estándar puro. A partir de la solución de trabajo (100 ng/mL), se construyó una curva de calibración de 6 puntos con las siguientes concentraciones: 2,5, 5, 12,5, 25, 50 y 100 ng/mL, para cada una de las cuatro AFLAs (B1, B2, G1 y G2). Se realizaron dos curvas de Calibración y se calculó una curva promedio representativa de los resultados.

Curvas de calibración de los vinos fortificados (tintos y blancos). Se prepararon vinos fortificados con la mezcla de AFLAs, a partir de una solución de 100 ng/mL. Así, se elaboró una curva de calibración con 5 concentraciones (1,5, 3, 6, 12, 24 ng/mL) para cada una de las cuatro AFLAs. Se realizaron dos curvas de calibración para vino tinto y dos curvas de calibración para vino blanco. Se obtuvieron en ambos casos curvas promedios.

Linealidad. Para la determinación de la linealidad del método, se calculó el coeficiente de correlación (r) para ambas curvas de calibración de vinos fortificados con AFLAs. Se tomó como referencia el método establecido por Meier-Zund (2000).

Este coeficiente se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Donde:

S_{xy} = sumatoria del eje XY

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

S_{yy} = sumatoria del eje Y (áreas)

Determinación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). A partir de los datos obtenidos de las curvas de calibración se calculó el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Para ello, se utilizó la fórmula propuesta por Meier-Zund (2000):

$$LD = t * Sy \left[\frac{\sqrt{\frac{\sum x^2}{n * Sxx}}}{b} \right]$$

Donde:

t = constante 2,77

Sy = desviación estándar de Y

$\sum x^2$ = sumatoria del eje X²

n = número de mediciones

Sxx = sumatoria del eje X (concentraciones)

b = pendiente

$$LC = t * Sy \left[\frac{\sqrt{\frac{\sum x^2}{n * Sxx} + \frac{1}{n} + \frac{(LD - x)^2}{Sxx}}}{b} \right]$$

Donde:

t = constante 2,77

Sy = desviación estándar de Y

$\sum x^2$ = sumatoria del eje X²

n = número de mediciones

Sxx = sumatoria del eje X (concentraciones)

LD = límite de detección

x = promedio de X

b = pendiente

Recuperación. Los porcentajes de recuperación de AFLAs en vino tinto y blanco fortificado fueron calculados de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\%Re = \left(\frac{Co}{Ct} \right) * 100$$

Donde:

% Re= % de recuperación

Co = Concentración obtenida.

Ct = Concentración teórico

Estabilidad. La estabilidad de AFLAs se calculó en muestras de vino blanco y tinto fortificado, con 12 ng/mL. Se mantuvieron almacenadas a una temperatura de entre 4 y 6°C y analizadas semanalmente por un periodo de un mes.

Variables a medir

Cuantificación de AFLAs en vinos. Los vinos descritos en el cuadro 2 y 3 fueron analizados de acuerdo al protocolo de determinación y cuantificación de AFLAs propuesto (Apéndice 1).

Análisis básicos. Los vinos utilizados en este estudio fueron analizados de acuerdo a las siguientes metodologías:

- Acidez titulable: mediante titulación con NaOH 0,1 N, expresado en g/L de ácido tartárico (Bordeu y Scarpa, 1998).
- Acidez volátil: mediante el método de Blárez y expresado como g/L de ácido acético (Bordeu y Scarpa, 1998).
- pH: mediante potenciometría (Bordeu y Scarpa, 1998).
- Azúcares reductores: mediante reacciones de óxido-reducción en presencia de Licor de Fehling y expresado en g/L de glucosa (Bordeu y Scarpa, 1998).
- Anhídrido sulfuroso libre (SO_2 L): método de Ripper y expresado en ppm (Bordeu y Scarpa, 1998).
- Anhídrido sulfuroso total (SO_2 T): método de Ripper doble y expresado en ppm, (Bordeu y Scarpa, 1998).
- Fenoles totales: mediante análisis espectrofotométrico a una absorbancia a 280 nm y expresado en mg/L de ácido gálico (García-Barceló, 1990).
- Grado alcohólico: expresado en % v/v de etanol.

Análisis Estadístico

Se analizaron los resultados obtenidos a través de estadística descriptiva (desviación estándar, porcentajes de coeficiente de variación, promedios)

RESULTADOS

Perfiles cromatográficos de estándares

En la Figura 2, se muestran las respuestas cromatográficas representativas de una solución de mezclas de estándares puros de AFLAs en acetonitrilo (2,5 ng/mL), El orden de elusión y los tiempos de retención (t_R) fueron los siguientes: AFG1= 5,73 min; AFB1= 7 min; AFG2= 11 min; AFB2= 14,9 min.

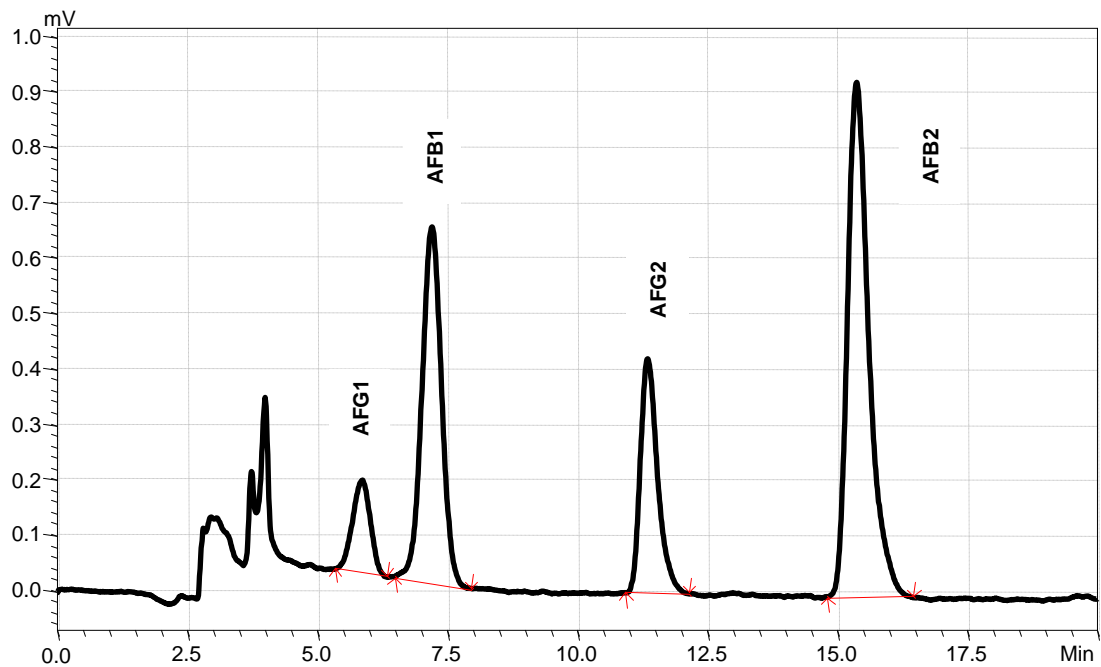


Figura 2. Cromatograma representativo de una mezclas de estándares puros de AFLAs.

Por otra parte, en la Figura 3 y Figura 4 se muestran los cromatogramas representativos de un vino blanco y tinto fortificado con una mezcla de 1,5 ng/mL de AFLAs. Los t_R fueron los siguientes: AFG1= 5,7 min; AFB1= 7 min; AFG2= 11 min; AFB2= 14,9 min.

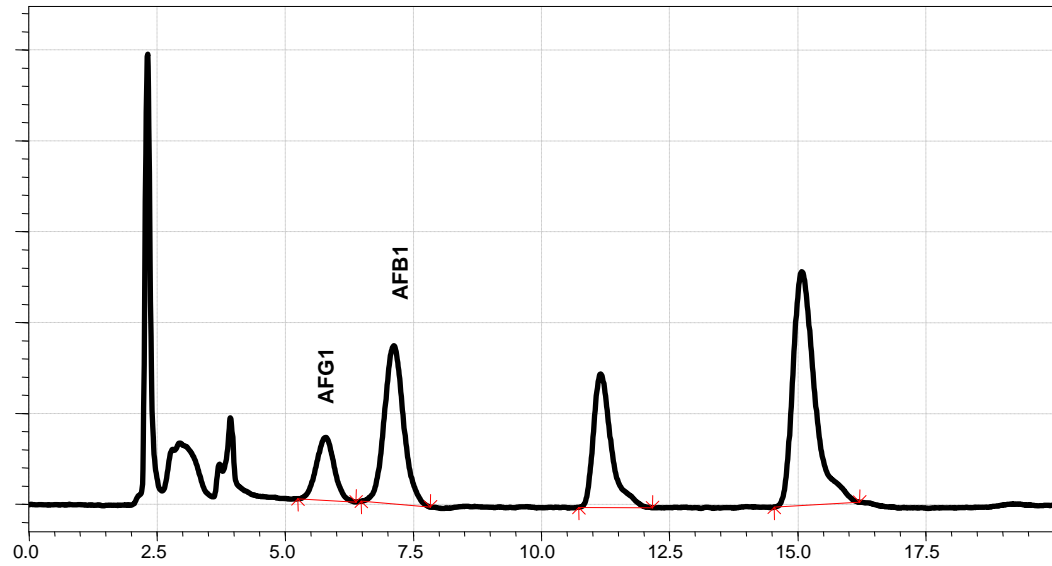


Figura 3. Cromatograma representativo de vino blanco fortificado con una mezcla de AFLAs.

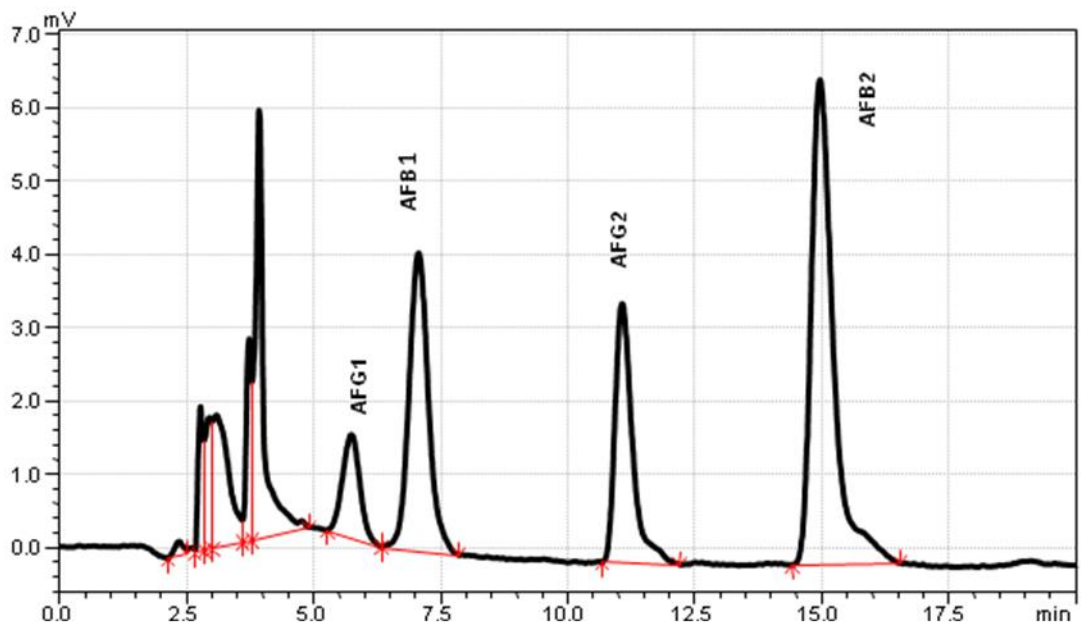


Figura 4. Cromatograma representativo de vino tinto fortificado con una mezcla de AFLAs.

Curvas de Calibración y Linealidad

La Figura 5, muestra las curvas de calibración de los estándares puros de AFG1, AFB1, AFG2, AFB2 en solución de acetonitrilo, vino blanco y vino tinto, respectivamente. El eje Y representa el área, mientras que el eje X representa la concentración (ng/mL). Se observó que las áreas fueron aumentando sostenidamente conforme hubo un aumento en la concentración de los distintos estándares de AFLAs en acetonitrilo. Esta observación fue coincidente cuando las distintas AFLAs estuvieron contenidas en vino blanco y tinto. Los coeficientes de correlación variaron entre 0,9903 y 0,9991 (AFLAs en acetonitrilo); 0,9984 y 0,9997 (AFLAs en vino blanco); y 0,9985 y 0,9999 (AFLAs en vino tinto).

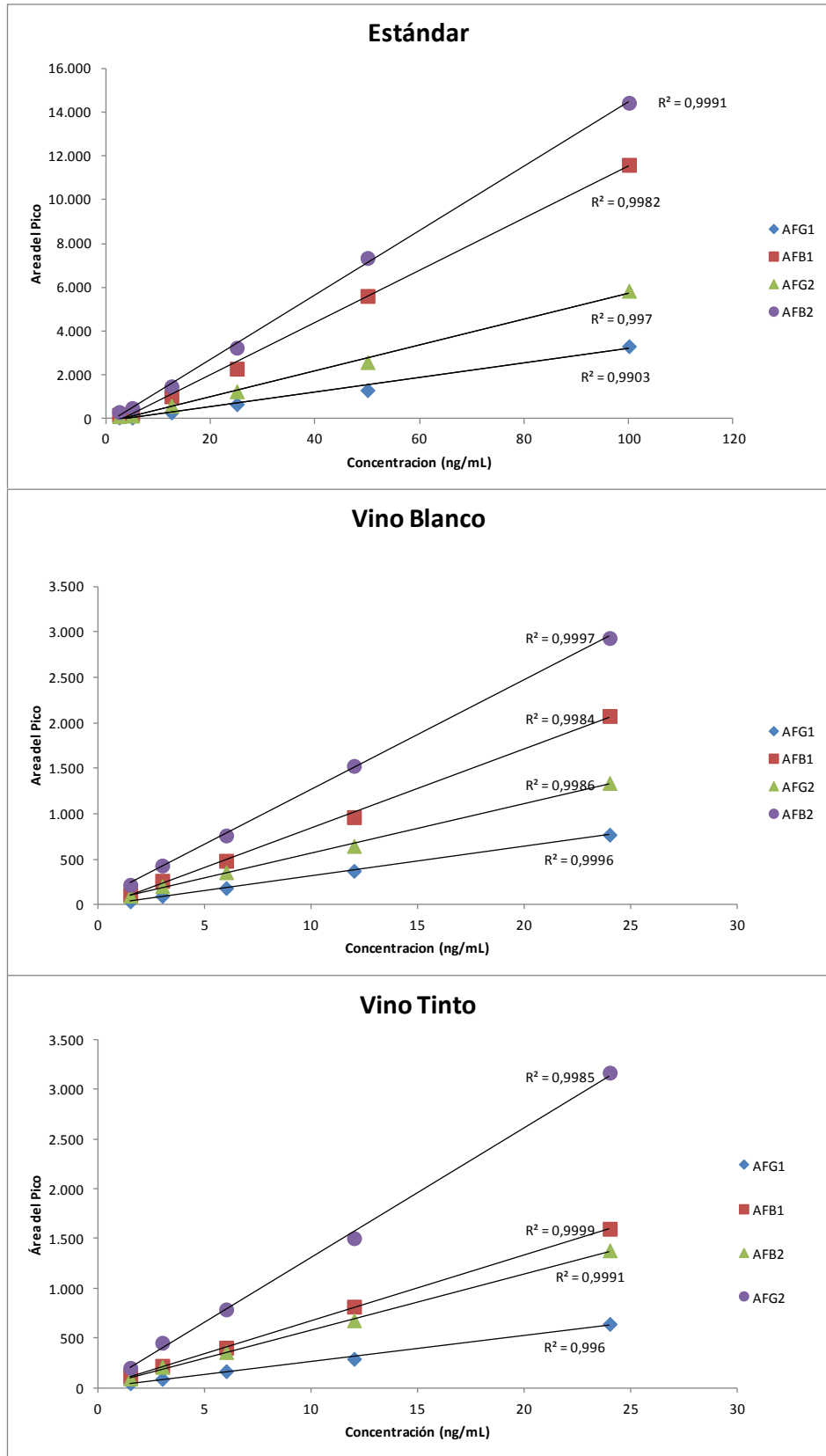


Figura 5. Curvas de calibración de mezcla de estándar de AFLAs.

Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

A partir de los datos obtenidos en las curvas de calibración de vino fortificado (Figura 5), se determinaron los Límites de Detección (LD) y Límites de Cuantificación (LC) de acuerdo a la fórmula propuesta por Meier –Zund, 2000. En el Cuadro 4 se muestra que los valores de LD para las AFLAs en la matriz vino variaron entre 0,21 ng/mL y 0,9 ng/mL. Asimismo, los valores de LC obtenidos se encontraron entre 0,44 ng/mL y 1,83 ng/mL.

Cuadro 4. Límites de detección y cuantificación de las cuatros AFLAs en vino blanco y tinto fortificado.

AFLAs	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (R ²)	Límite de Detección (LD) ng/mL	Límite de Cuantificación (LC) ng/mL
Vino blanco fortificado				
AFG1	0,999	0,999	0,30	0,61
AFB1	0,999	0,998	0,60	1,23
AFG2	0,999	0,998	0,62	1,28
AFB2	0,999	0,999	0,40	0,83
Vino tinto fortificado				
AFG1	0,998	0,996	0,9	1,83
AFB1	0,999	0,999	0,21	0,44
AFG2	0,999	0,999	0,45	0,94
AFB2	0,999	0,998	0,55	1,14

Recuperación

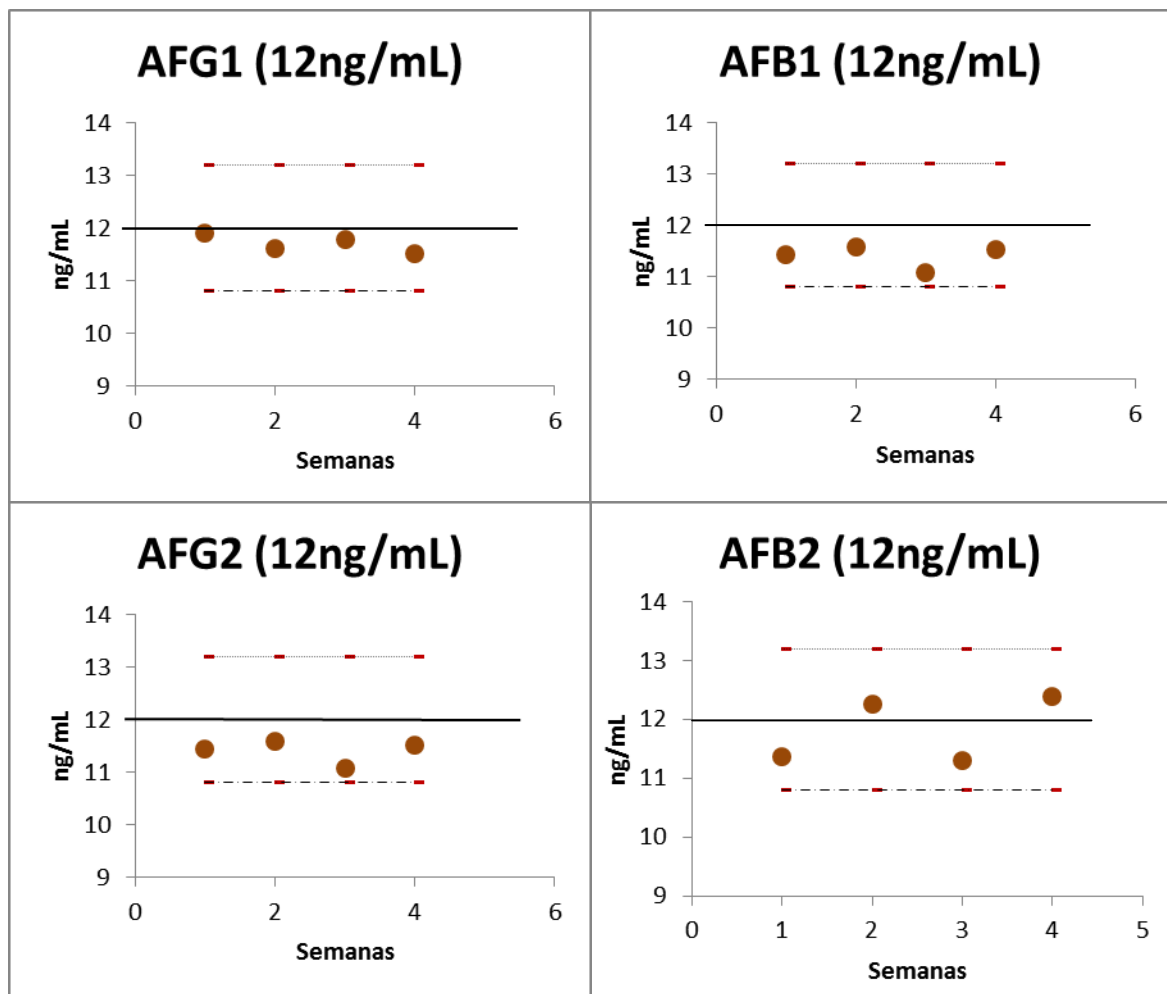
El porcentaje de recuperación de AFLAs se calculó en tres concentraciones diferentes: 1.5, 6 y 12 ng/mL (Cuadro 5). Los porcentajes de recuperación promedio obtenidos fueron de 98,9; 102,9; 96,9 y 99,2% para AFG1, AFB1, AFG2 y AFB2, respectivamente.

Cuadro 5. Porcentaje de recuperación de las distintas AFLAs.

Valor teórico (ng/mL)	Valor promedio encontrado (ng/mL)	% C.V.	Recuperación
AFG1			
1,5	1,42	11,99	94,4
6	6,17	5,28	102,8
12	12,04	2,31	99,6
Promedio		6,53	98,9
AFB1			
1,5	1,56	5,66	103,7
6	6,17	5,38	102,8
12	12,27	2,40	102,2
Promedio		4,48	102,9
AFG2			
1,5	1,50	5,66	100,1
6	5,93	1,64	98,9
12	10,99	7,66	91,6
Promedio		4,99	96,9
AFB2			
1,5	1,55	11,19	103,3
6	5,92	1,35	98,6
12	11,47	3,83	95,6
Promedio		5,46	99,2

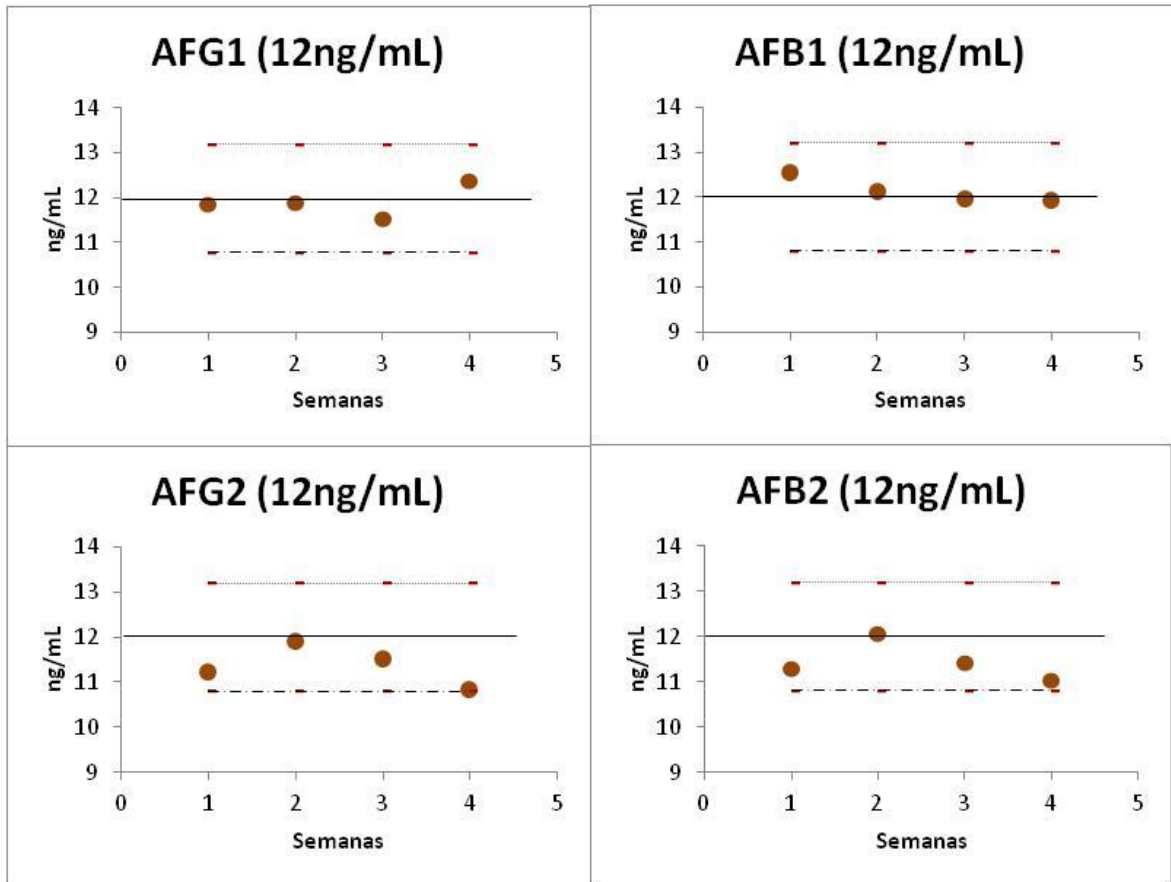
Estabilidad

La estabilidad de las cuatro aflatoxinas, fue evaluada semanalmente durante un mes en vino blanco y tinto fortificado. Se estableció un 15% como límite superior e inferior. En la Figura 6 y Figura 7, se puede observar que durante el periodo de estudio, las cuatro AFLAs se mantienen dentro del rango establecido.



..... Límite superior (+) 15%; ——— Concentración teórica;
 -.-.-.-.- Límite inferior (-) 15%; • Valor obtenido.

Figura 6. Estabilidad de AFLAs en vino blanco durante cuatro semanas.



..... Límite superior (+) 15%; — Concentración teórica;
 -.-.-.-.-Límite inferior (-) 15%; • Valor obtenido.

Figura 7. Estabilidad de AFLAs en vino tinto durante cuatro semanas.

En el cuadro 6, se muestran los promedios de las concentraciones detectadas en el ensayo de estabilidad. Los vinos fueron fortificados con una mezcla de 12 ng/mL de AFLAs (valor teórico). Todos los porcentajes de variación se encuentran por debajo del valor teórico, excepto AFB1 en vino tinto que presentó un valor positivo (1,13%). De la misma manera, los porcentajes de coeficiente de variación (% CV) se encuentran entre 2,41 y 4,36%.

Cuadro 6. Estabilidad de AFLAs.

AFLAs	Promedio valor encontrado (ng/ml)	% Promedio de variación con respecto al valor teórico	%CV
Vino blanco fortificado			
AFG1	11,76 ±0,51	-4,04	4,36
AFB1	11,39±0,42	-5,81	3,72
AFG2	11,94±0,43	-0,53	3,57
AFB2	11,84±0,58	-1,37	4,87
Vino tinto fortificado			
AFG1	11,91±0,35	-0,74	2,92
AFB1	12,14±0,29	1,13	2,41
AFG2	11,35±0,46	-5,44	4,08
AFB2	11,46±0,44	-4,54	3,84

Determinación y Cuantificación de AFLAs en Vinos

En la Figura 8 se presentan los cromatogramas representativos de los vinos estudiados, los cuales fueron analizados de acuerdo a la metodología propuesta. No se observa la presencia de ningún pico cromatográfico de las AFLAs.

Por otro lado, en los Cuadros 7 y 8 se presentan los resultados del contenido de AFLAs en vinos blancos y tintos, respectivamente. Es posible señalar que no se observó la presencia de AFLAs en ninguna de las muestras analizadas.

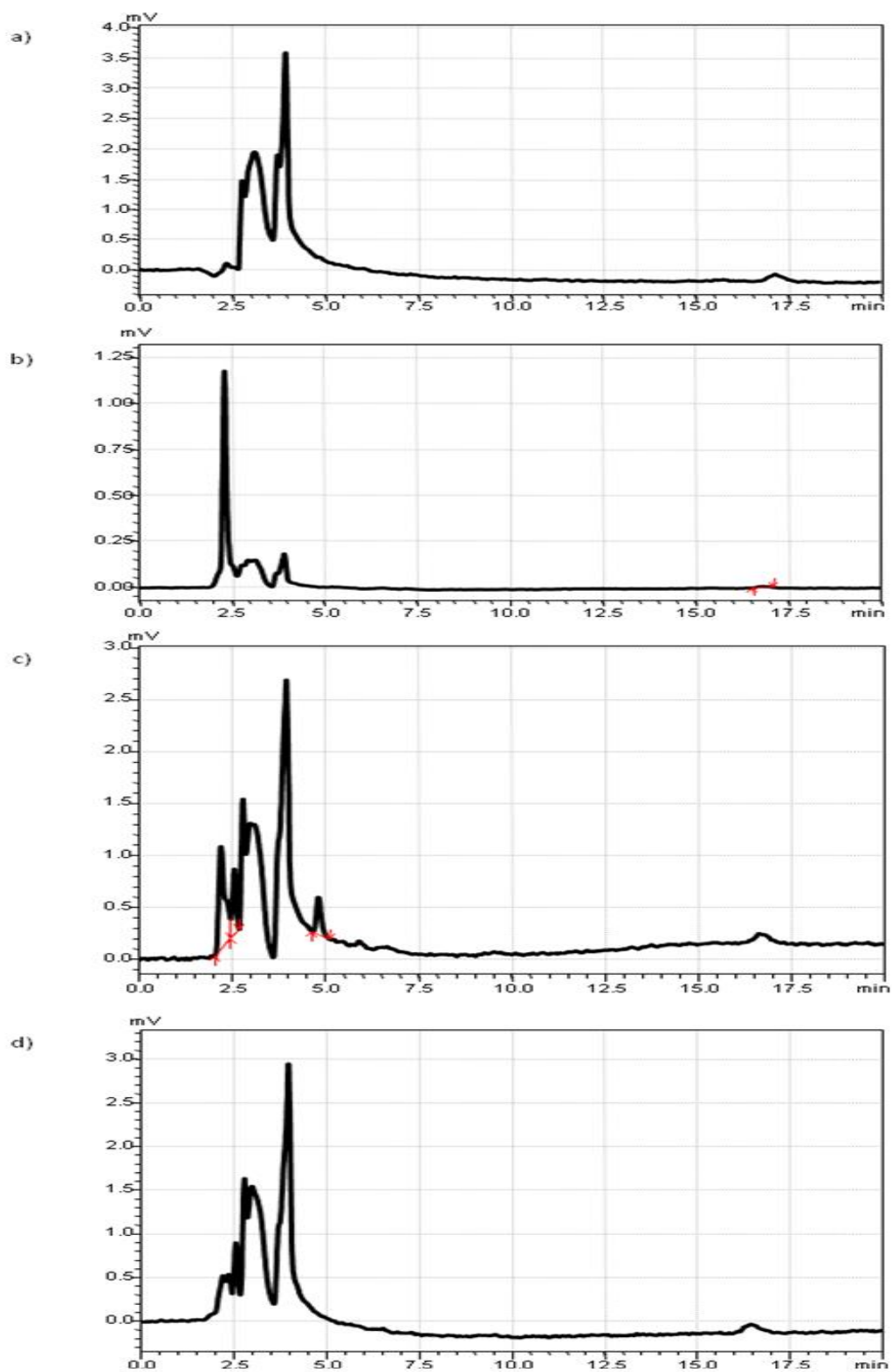


Figura 8. Cromatogramas representivos de los vinos analizados. a) vino 1; b) vino 17; c) vino 36 y d) vino 40.

Cuadro 7. Concentración de AFLAS en vinos Chardonnay y Sauvignon Blanc.

AFLATOXINAS				
Vino blanco	AFG1	AFB1	AFG2	AFB2
Vino 1	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 2	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 3	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 4	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 5	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 6	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 7	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 8	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 9	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 10	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 11	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 12	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 13	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 14	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 15	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 16	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 17	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 18	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 19	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 20	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 21	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 22	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 23	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 24	BLD	BLD	BLD	BLD

BLD: Bajo el límite de detección.

Cuadro 8. Concentración de AFLAs en vinos Carménère y Cabernet Sauvignon.

AFLATOXINAS				
Vinos tintos	G1	B1	G2	B2
Vino 25	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 26	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 27	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 28	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 29	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 30	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 31	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 32	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 33	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 34	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 35	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 36	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 37	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 38	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 39	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 40	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 41	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 42	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 43	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 44	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 45	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 46	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 47	BLD	BLD	BLD	BLD
Vino 48	BLD	BLD	BLD	BLD

BLD: Bajo el límite de detección.

Caracterización Química de los vinos

En los Cuadros 9, 10 y 11, 12, se pueden observar los resultados obtenidos en los análisis realizados para las cuatro cepas. En general, los vinos blancos presentaron valores de pH, acidez volátil, alcohol, azúcares residuales, anhídrido sulfuroso y fenoles totales menores que los vinos tintos. Por su parte, las variedades tintas presentaron valores menores en acidez total.

Comparativamente, en la mayoría de los parámetros estudiados Chardonnay presentó valores menores que Sauvignon Blanc, excepto en grado alcohólico y fenoles totales. Por su parte, en las variedades tintas los resultados obtenidos fueron similares, existiendo diferencias en la acidez total y fenoles totales, donde Cabernet Sauvignon presentó valores más altos que Carménère.

Cuadro 9. Análisis enológicos de los vinos Chardonnay.

Muestra	pH	A.T	A.V.	G. A.	A.R	SO ₂ L	SO ₂ T	F.T.
1	2,94	5,4	0,47	13,3	4	20,3	76,8	290
2	2,94	6,1	0,54	13,1	4,3	20,5	56,3	241
3	3,16	6,4	0,43	13,2	2,1	15,4	48,7	241
4	2,97	5,8	0,62	13,5	3,7	25,6	68,8	302
5	3,12	4,9	0,48	13	3,3	23,0	58,8	251
6	3,02	6,9	0,41	13,5	2,3	12,8	51,2	298
7	2,88	6,3	0,43	13	5,7	20,5	43,2	238
8	3,03	6,0	0,50	13	3,2	20,5	43,5	249
9	2,94	5,5	0,49	13,5	4,7	17,9	84,5	285
10	2,91	5,4	0,56	12	3,8	17,9	64,0	227
11	3,04	6,7	0,64	13	5,2	20,5	81,9	259
12	3,21	5,7	0,44	12,5	6,5	10,2	76,8	350
Prom.	3,01±0,10	5,9±0,59	0,5±0,08	13,05±0,44	4,1±1,31	18,8±4,27	62,9±14,81	269±36,16

A.T: acidez total, expresada en g/L de ac. tartárico; A.V: acidez volátil, expresada en g/L de ac. acético; G.A: grado alcohólico, expresado en % v/v; A.R: azúcares residuales, expresadas en g/L de glucosa; SO₂L y SO₂T, expresado en mg/L; F.T: fenoles totales, expresados en mg/L de ac. gálico.

Cuadro 10. Análisis enológicos de los vinos Sauvignon Blanc.

Muestra	pH	A.T.	A.V.	G.A.	A.R.	SO ₂ L	SO ₂ T	F.T.
13	3,05	6,4	0,7	13,5	5,3	18,0	61,4	217
14	3,15	5,5	0,5	13,5	4,8	15,4	76,8	218
15	3,08	7,2	0,65	13	4,8	20,5	92,2	183
16	3,21	6,0	0,5	13,5	2,1	10,2	64,0	185
17	3,05	7,0	0,47	13	4,2	23,0	115,2	202
18	3,16	6,7	0,38	13	3,2	25,6	43,5	165
19	3,15	7,2	0,54	13	4,1	20,5	41,0	180
20	3,22	6,6	0,6	13	4,3	23,0	48,6	187
21	3,09	6,9	0,54	12,5	6,5	23,0	41,0	186
22	3,2	7,3	0,504	12,5	5,9	20,5	94,7	201
23	3,18	5,8	0,58	13,5	5,9	20,5	70,4	218
24	3,33	5,5	0,5	13	10,4	20,5	89,6	190
Prom.	3,16±0,08	6,5±0,66	0,5±0,08	13,1±0,36	5,12±2,06	20,06±4,06	69,9±24,36	194±17,04

A.T: acidez total, expresada en g/L de ac. tartárico; A.V: acidez volátil, expresada en g/L de ac. acético; G.A: grado alcohólico, expresado en % v/v; A.R: azúcares residuales, expresadas en g/L de glucosa; SO₂L y SO₂T, expresado en mg/L; F.T: fenoles totales, expresados en mg/L de ac. gálico.

Cuadro 11. Análisis enológicos de los vinos Carménère

Muestra	pH	A.T.	A.V.	G.A.	A.R.	SO ₂ L	SO ₂ T	F.T
25	3,6	4,8	0,5	13,5	4,7	32,0	51,2	1.442
26	3,61	4,6	0,564	14	5,9	25,6	48	1.514
27	3,41	4,6	0,624	13,5	5,9	38,4	70,4	1.574
28	3,59	4,8	0,54	13,5	5,1	38,4	44,8	1.506
29	3,52	6,3	0,81	13	7,2	22,4	67,2	1.435
30	3,54	3,8	0,49	14	4,4	19,2	76,8	1.210
31	3,55	5,1	0,582	13,5	6,0	28,8	134	1.187
32	3,53	5,7	0,654	14	5,7	38,4	89,6	1.546
33	3,74	5,8	0,564	14	3,1	22,4	64	1.424
34	3,39	4,9	0,6	13	3,3	38,4	73,6	907
35	3,46	4,8	0,4	13,5	5,6	38,4	115,2	1.292
36	3,54	5,5	0,6	14	5,5	41,6	70,4	1.355
Prom.	3,54±0,09	5,1±0,67	0,6±0,10	13,6±0,38	5,2±1,16	32±7,96	75,4±26,53	1.366±191,53

A.T: acidez total, expresada en g/L de ac. tartárico; A.V: acidez volátil, expresada en g/L de ac. acético; G.A: grado alcohólico, expresado en % v/v; A.R: azúcares residuales, expresadas en g/L de glucosa; SO₂L y SO₂T, expresado en mg/L; F.T: fenoles totales, expresados en mg/L de ac. gálico.

Cuadro 12. Análisis enológicos de vinos Cabernet Sauvignon.

Muestra	pH	A.T	A.V.	G.A.	A.R	SO ₂ L	SO ₂ T	F.T.
37	3,56	5,5	0,86	13,5	4,8	28,8	60,8	1.492
38	3,54	5,8	0,75	13,5	5,0	28,8	76,8	1.721
39	3,57	5,8	0,858	13	4,7	25,6	64	1.536
40	3,62	5,4	0,348	13,5	4,8	25,6	44,8	1.463
41	3,4	6,6	0,42	13	3,1	41,6	70,4	1.520
42	3,48	6,3	0,546	14	4,6	32,0	51,2	1.553
43	3,43	6,0	0,552	13,5	5,0	32,0	83,2	1.474
44	3,7	6,0	0,48	14	6,1	38,4	60,8	1.534
45	3,52	5,8	0,456	13,5	3,8	22,4	70,4	1.501
46	3,5	7,2	0,48	12,5	7,0	32,0	76,8	1.286
47	3,53	5,5	0,377	13,5	5,8	51,2	70,4	1.268
48	3,61	5,7	0,54	13,5	3,5	22,4	51,2	1.437
Prom.	3,54±0,08	6±0,51	0,6±0,18	13,4±0,42	4,8±1,10	31,7±8,46	65,1±11,76	1.482±119,27

A.T: acidez total, expresada en g/L de ac. tartárico; A.V: acidez volátil, expresada en g/L de ac. acético; G.A: grado alcohólico, expresado en % v/v; A.R: azúcares residuales, expresadas en g/L de glucosa; SO₂L y SO₂T, expresado en mg/L; F.T: fenoles totales, expresados en mg/L de ac. gálico.

DISCUSIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium*. Dentro de este grupo de sustancias tóxicas, las más importantes son las aflatoxinas (Moss, 1996; Richard, 2007), moléculas derivadas de las difuranocumarinas producidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nonius* (Moss, 2002). Estos compuestos han sido clasificados dentro del Grupo I como causante del cáncer de hígado en humanos (IARC, 2002) y como agentes inmunosupresores, mutagénicos y teratogénicos (Moss, 2002). Las AFLAs se han detectado naturalmente en alimentos como café, cereales, frutas secas (CAST, 2003), cocoa (coppeti, *et al.*, 2011), uvas, mostos y vino (El Koury *et al.*, 2008; Magnoli *et al.*, 2003; Perez-Ortega *et al.*, 2012; Serra *et al.*, 2005).

A pesar de la importancia de estos compuestos, limitada información existe referente a la presencia de estas micotoxinas en una bebida de alto consumo como el vino. Por esta razón, en el presente estudio se optimizó un método HPLC con detección de fluorescencia y uso de columnas de inmunoafinidad para determinar y cuantificar la presencia de AFLAs en 48 muestras de vinos comerciales chilenos.

A partir de la metodología implementada por el Instituto de Salud Pública de Chile (2010), Rodríguez (2013) y Senyuva y Gilbert (2010), se desarrolló el protocolo de detección y cuantificación descrito en la sección de Materiales y Métodos. La fase móvil, longitudes de onda de excitación y emisión fueron las utilizadas en esos estudios. Sin embargo, se evaluaron diferentes columnas de limpieza y extracción, seleccionando a la columna de inmunoafinidad por su alta sensibilidad y eficiencia (Gilbert *et al.* 2002, Anklam *et al.*, 2002).

Inicialmente, se observó que independiente de la matriz utilizada (acetonitrilo, vino blanco o tinto), el tiempo de retención (t_R) de las distintas AFLAs permaneció inalterado. Asimismo, el t_R y el orden de elución de las AFLAs son similares a los obtenidos por Rodríguez (2013) y Khayoon *et al.* (2012), los cuales trabajaron en vino y arroz, respectivamente.

Sucesivamente, se realizaron dos curvas de calibración con ambos vinos fortificados, obteniéndose la linealidad del método. Según las condiciones del método, los coeficientes de correlación variaron entre 0,9967 y 0,999 en el rango de 1,5-50 ng/mL. El ISP (2010), recomienda que el coeficiente de correlación sea $\geq 0,999$, lo que coincide estrechamente con lo observado en este estudio. De la misma manera, los porcentajes de recuperación obtenidos coinciden con las recomendaciones realizadas por la FDA (2001) y el ISP (80-110%) (2010). Además, estos porcentajes de recuperación son coincidentes con los resultados obtenidos por Cho *et al.* (2008), Tamura *et al.* (2012) y Senyova y Gilbert (2010). Cabe destacar que los altos porcentajes de recuperación obtenidos pueden relacionarse con la alta especificidad de las columnas de inmunoafinidad utilizadas para extraer estos analitos.

Finalmente, se evaluó la estabilidad de los distintos estándares puros de AFLAs en vino blanco y tinto durante 4 semanas, calculándose seguidamente el coeficiente de variación.

En el caso de la estabilidad, los valores variaron entre los rangos sugeridos por la FDA (2001), correspondiente a un $\pm 15\%$, mientras que el coeficiente de variación presentó valores entre 2,41 y 4,36, lo que es considerado estadísticamente aceptable ($\leq 5\%$). Estas observaciones indicarían que las micotoxinas son sustancias químicamente estables y que tienden a permanecer durante el almacenamiento y procesamiento de las muestras (Turner *et al.*, 2009).

Luego de optimizar el método HPLC-FL para la identificación y cuantificación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, se procedió a determinar y cuantificar el contenido de AFLAs en 48 vinos comerciales de variedades blancas y tintas. El análisis químico de los vinos utilizados, demostró que los valores de pH, acidez total, acidez volátil, grado alcohólico, azúcares residuales, fenoles totales y anhídrido sulfuroso libre y total se encontraron dentro de los niveles normales de vinos blancos y tintos (Bordeu y Scarpa, 1998; Zamora, 2003). En los análisis cromatográficos no se detectó la presencia de AFLAs en estos vinos o bien estaban por debajo de los límites de detección propuestos por este método.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Pérez-ortega *et al.*, (2012), quienes analizando 24 vinos españoles a través de un método de LC con detección de masa, detectaron la presencia de AFB2 en 21 de las muestras, y en algunos casos las concentraciones encontradas superaron el límite regulatorio de la OIV.

Sin embargo, las observaciones descritas en este estudio coinciden con lo descrito por Jovic *et al.*, (2009) quienes confirman la inexistencia de AFLAs en vinos de diferentes calidades. Además, Takahashi (1977), mediante HPLC con fluorescencia, no detectó AFLAs en vinos de frutas, mientras que Tamura *et al.* (2012), analizando toxinas en 37 vinos mediante UHPLC- MS, detectaron solo ocratoxina A. De la misma manera, Rodríguez (2013) desarrolló un método de detección de AFLAs mediante HPLC-FL, con el cual no detectó presencia de estas toxinas en vinos blancos y tintos (6 vinos chilenos y 2 vinos mexicanos).

Las condiciones climáticas serían fundamentales para el crecimiento de los hongos productores de AFLAs. Sin embargo, la cercanía del Valle Central de Chile con el océano pacífico, permitiría la circulación de vientos desde la costa hacia la cordillera bajando las temperaturas y manteniendo las zonas de los racimos con mejor ventilación, disminuyendo así los riesgos de contaminación (Vega *et al.*, 2012). Además, de acuerdo a Díaz *et al.*, (2009) los aislamientos de *Aspergillus spp.* son bajas en las zonas enológicas productivas chilenas durante la época de crecimiento de las bayas, a pesar de que las condiciones climatológicas pudiesen ser favorables (temperatura sobre los 37 °C y actividad de agua de 0,96). Finalmente, algunos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos presentes en las bayas poseen funciones antibacterianas y fungicidas (Mendoza *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2010). Esta observación es afirmada por López-Malo *et al.*, (2005) quienes aseveran que algunos compuestos fenólicos controlarían la tasa de crecimiento y el tiempo de germinación de esporas de *Aspergillus flavus* en cultivo *in vitro*. Esta última observación sería de alta relevancia ya que las uvas y vinos chilenos poseen una alta concentración de polifenoles (Gambelli y Santaroni, 2004; Granato *et al.*, 2011; Minussi *et al.*, 2003;) que podrían evitar el crecimiento de estos microorganismos y consecuentemente la síntesis de AFLAs.

CONCLUSIONES

El método HPLC-FL desarrollado para la determinación y cuantificación de AFLAs en vinos blancos y tintos, es un método, específico, sensible y confiable. Por otra parte los límites de detección y límites de cuantificación obtenidos permiten detectar niveles de AFLAs por debajo del límite regulatorio propuesto por la OIV.

Asimismo, al analizar distintos vinos blancos y tintos chilenos, no se detectó la presencia de AFLAs.

LITERATURA CITADA

- Anklam, E., Stroka, J., Boenke, A. 2002. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with focus on mycotoxins. *Food Control* 13: 173-183.
- Binder, Eva. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* 133: 149-166.
- Bordeu, E., Scarpa, J. 1998. Análisis químico del vino. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. 253p.
- Coppetti, M., Iamanaka, B., Pereira, J., Fungaro, M., Tariwaki, M. 2011. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology* 148: 141-144.
- Chan, D., Mac Donald, S., Boughtflower, V., Brereton, P. 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal Chromatography A* 1059:13-16.
- Cho, S., Lee, Ch., Joung, M., Son, Y., Lee, S., Choi, I., Kim, S., Kim, D. 2008. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry* 107: 1283-1288.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST) N° 139. Task Force Report. 2003. *Micotoxins: Risk, in Plants, Animals, and Human Systems*. Ames, Iowa, EEUU. 199p.
- Da Rocha, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Olivira, A., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M. 2002. Potential Ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants* 19(4): 408-414.
- De los Reyes, A., 2011. El estancamiento del vino en Chile: panorama y factores del declive. Disponible en <http://blog.euromonitor.com/2011/10/estancamiento-del-vino-en-chile-panorama-general-y-los-factores-tras-el-declive.html>. Leído el 07 de Julio de 2012.
- Díaz, G., Torres, R., Vega, M., Latorre, B. 2009. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology* 133:195-199.
- El Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M.L., Lebrihi, A. 2008. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2244-2250.
- European Union Commission Regulation (EC) N° 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Diciembre 19, 2006. 26p. Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>. Leído el 18 de Julio de 2012.

- FAO, 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Roma, Italia. 45p.
- Figueroa, A., García-Uriburo, P., Selman, S. 2010. Fitch Rating. Informe sectorial; sector vitivinícola. Información financiera correspondiente a Diciembre. 2009. Santiago. Chile. 24p.
- Foods and Drugs Administration (FDA). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001. Maryland. 25p.
- Foods and Drugs Administration (FDA). United States Department of Health and Human Services. 2003. Petition to Establish Interim Acceptable Levels for Acrylamide in Mayor Food Sources. Washington DC. EEUU. 28p.
- Gambelli, L., Santaroni, G.P. 2004. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. Journal of Foods Composition and Analysis 17:613-618.
- García-Barceló, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Ediciones FAB. Barcelona. España. 300p.
- Gilbert, J., Anklam, E. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. Trends in Analytical Chemistry. 21, N 6-7: 468-486.
- Guedes, R., Erickson, L. 2006. Theoretical characterization of aflatoxins and their phototoxic reactions. Chemical physics Letters 422: 328-333.
- Granato, D., Uchida, F., Castro, I. 2011. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. Food Chemistry 129: 366-373.
- Instituto de Salud Pública. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago, Chile. 67p.
- International Agency Research of Cancer. 2002. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Vol 82. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC press. Lyon, France. 590p.
- Isaac, S. 1994. What are mycotoxins and how harmful are they?. Mycologist 8(2): 91-92.
- Jovic, S., Petrovic, A., Markovic, N. 2009. Mycotoxins in wine with special attention on Ochratoxin A. Process National Science Matica Srpska Novi Sad 116: 91-100.
- Khayoon, W., Saad, B., PingLee, T., Salleh, B. 2012. High performance liquid chromatography determination of aflatoxins in chili, peanut and rice using silica based monolithic column. Food Chemistry 133; 489-496.
- Kumar, V., Basu, M.S., Rajendran, T.P. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. Crop Protection 27: 891-905.
- López-Malo, A., Alzamora, S., Palou, E. 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of

- chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* 99:119-128.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcerro, A. 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus section Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letter Applied to Microbiology* 37(2): 179-84.
- Martinez-Culebra, P.V., Ramon, D. 2007. An ITS RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 113: 147-153.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocraña, L., Valle-Algarra, M.F., Jiménez, M. 2005. Study of Spanish grape mycobiota and Ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubigensis* and other members of *Aspergillus section Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (8): 4696-4702.
- Meir, C., Zund, R. 2000. *Statistical methods in analytical chemistry*. 2° ed. Wiley-International Public. Toronto, Canada. 424p.
- Melo, O., Buzeta, J.E., Marshall, M.B. 2005. Determinantes del precio del vino en el mercado Chileno: un estudio de precios hedónicos. *Economía Agraria* 9: 58-73.
- Mendoza, L., Yañez, K., Vivanco, M., Melo, R., Cotoras, M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43: 360-364.
- Ministerio de Salud. 2010. República de Chile. Departamento de asesoría jurídica. Reglamento Sanitario de los Alimentos, decreto 977/96 (D.OF.13.05.1997). 173p.
- Minussi, R., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, O., Pastore, G., Duran, N. 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry* 82: 409-416.
- Moss, M. 1996. Centenary review: Mycotoxins. *Mycology Research* 100(5): 513-523.
- Moss, M. 2002a. Mycotoxin review; 1-*Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* 16(3): 116-119.
- Moss, M. 2002b. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50: 132-142.
- Odepa. Boletín de vinos y pisco: producción, precios y comercio exterior, avance Junio 2012. Ministerio de Agricultura. Santiago. Chile. 23p.
- OIV. 2012. *International Oenological Codex*. Paris, Francia. 599p
- OIV. 2013. *Statistical report on world viticulture 2012*. Paris, Francia. 32p.
- Pérez-Ortega, P., Gilbert-López, B., García-Reyes, J., Ramos-Martos, N., Molina-Díaz, A. 2012. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal*

of Chromatography A 1249: 32-40.

Puschner, B. 2002. Mycotoxins. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*. 32: 409-419.

Richard, J.M. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses; an overview. *International Journal of Food Microbiology* 119: 3-10.

Riordam, M., Wikinson, M. 2009. Comparison of analytical methods for aflatoxin determination in commercial chili spice preparation and subsequent development of an improved method. *Food Control* 20:700-705.

Rodríguez, M. 2013. Optimización de un método para el análisis de Aflatoxinas en vino. Tesis para optar al grado de magister en Enología y vitivinicultura. Universidad de Chile, Santiago. 45p. Facultad de Ciencias Agronómicas.

Saavedra, N., 2008. Viñas apuestan a mayor valor y consumo interno de vino sigue plano. Disponible en <http://www.chilepotenciaalimentaria.cl/content/view/235947/Vinas-apuestan-a-mayor-valor-y-consumo-interno-de-vino-sigue-plano.html>. Leído el 07 de Julio 2012.

SAG. 2011. Contenido Técnico: División Protección Agrícola y Forestal. Sub-departamento Viñas y Vino. Ley 18.455. Ministerio de Agricultura. Santiago. Chile. 78p.

SAG. 2012. Informe Ejecutivo: Producción de vinos. División Protección Agrícola y Forestal. Sub-departamento de viñas y vino. Ministerio de Agricultura. Santiago. Chile. 6p.

Senyuva, H., Gilbert, J. 2010. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B*. 878:115-132.

Serra, R., Braga, A., Venancio, A. 2005. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology* 156:515-521.

Stroka, J., Anklam, E. 2002. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. *Trends in Analytical Chemistry*. 21 (2).

Takahashi, D. 1977. Reversed phase high performance liquid chromatography analytical system for aflatoxins in wines with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 131: 147-156.

Tamura, M., Takahashi, A., Uyama, A., Mochizuki, N. 2012. A method for multiple mycotoxin analysis in wines by solid phase extraction and multifunctional cartridge purification and ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrophotometry. *Toxins* 4: 746-486.

Tapia, M^a José. 2009. Vinos sobre los \$3.000 representan solo el 4% del consumo en Chile. Disponible en http://www.latercera.com/contenido/655_208668_9.shtml. Leído el 19 de Noviembre 2012.

Turner, N., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytical Chimica Acta* 632: 168-180.


Vega, M., Ríos, G., Von Baer, D., Mardones, C., Tesini, C., Herlitz, E., Saelzer, R., Ruiz, M. 2012. Ochratoxin A occurrence in wines produced in Chile. *Food Control* 28:147-150.

Xia, E., Deng, G., Guo, Y., Li, H. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Science* 11(2): 622-646.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV Ediciones. Madrid, España. 224p.

APÉNDICES

Apéndice 1

 <p>Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología</p>	<p>PROTOCOLO DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS B1, B2, G1, G2, EN VINOS. CON METODO HPLC-FL CON COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD</p>	<p>COPIA N° 1</p> <p>20/08/2013</p>
	<p>Américo López Rivera^a, Elías Obreque Slier^b, Eliana Seguel R.^c</p> <p>^a Laboratorio de Toxicología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.</p> <p>^b Departamento de Agroindustria y Enología. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.</p> <p>^c Alumna de Magister de Enología y Vitivinicultura. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.</p>	

1. OBJETIVO

Describir el protocolo de análisis de determinación y cuantificación de AFLAs (G1, B1, G2, B2) en vinos, detallando en forma clara y precisa los ítems de: instrumentación, dilución del estándar, condiciones cromatográficas (HPLC-FL), inyección de la muestra, reactivos, de modo que el analista obtenga la información necesaria para la correcta aplicación de este protocolo.

2. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a todas las determinaciones de AFLAs en vinos blancos y tintos.

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 y cuantificación de AFLAs en vinos.
- Revisar y aprobar el protocolo de determinación y cuantificación de AFLAs en vinos.

Alumna tesista:

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

4. DISTRIBUCIÓN

Profesor Américo López Rivera, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina.
 Profesor Elías Obreque Slier, Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.

5. EQUIPOS Y REACTIVOS.

5.1 Equipamiento

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento equipado con: Muestreador automático (Prominence SIL-20 AC), bomba Cuaternaria (DGU-20A 5R), Detector de Fluorescencia (Shimadzu RF-10 AXL).
- Baño de Ultrasonido Branson, Ultrasonic Cleaner 2510.
- Vortex Thermolyne Maximix II.
- Desionizador Barnstead Nanopure Infinity.
- Micropipetas Glison, 100-1.000 μ L.
- Columnas de extracción (Vicam, AflaTest WB^{sf}). IAC (columna de Inmunoafinidad) de 3 mL.
- Columna analítica marca Phenomenex: SYNERGY 4 μ MAX-RP 80^a; 250 X 4.60 mm.
- Balanza de precisión 0.01 g. Boeco.
- Baño termorregulador 60 \pm 2 °C. Kotterman
- Centrifuga para tubos de 20 mL capaz de alcanzar 5000 rpm.
- Evaporador de N₂, Thermo Scientific. Reacti-Therm III # TS-18823
- pH metro. VENN, PHS-25
- Viales de 4 mL ámbar
- Pipetas volumétricas de 1-5 y 10 mL
- Viales ámbar de 2 mL para autosampler
- Tubos de centrifuga de 20 mL
- Material usual de laboratorio.

5.2 Reactivos

- Acetonitrilo, grado HPLC
- Metanol, grado HPLC
- Agua desionizada.
- Nitrógeno, gas inerte. LINDE. S.A

5.2.1 Soluciones

Solución madre de AFLA G1, B1, G2, B2: 200 μ g/mL en benceno:acetonitrilo (99: 1 v/v).

Solución de trabajo mix de AFLAs: concentración: 100 ng/ ml para B1, B2, G1, G2, preparada a partir de la solución madre y diluidas en solución acetonitrilo:agua (90:10 v/v).

Solución acondicionadora de columna PBS (Solución Buffer de fosfato salino): Disolver 8 g de NaCl, 1,16 g de Na₂HPO₄ y 0,2 g de KCl en 1 L. de agua. Ajustar pH a 7,4.

Solución de lavado Tween 20-PBS: Agregar 100 μ L de Tween 20 a 1 L. de PBS. (100/1000 v/v).

Solución de extracción Tween 20- PBS: Agregar 20 g de Tween 20 en 1 L. de PBS. (20/1000 p/v).

Solución derivatizante: Tomar 2 mL de ácido trifluoracético, 1 mL ácido acético glacial, 7 mL de agua desionizada.

5.2.2 Estándares

Estándar Aflatoxinas obtenidas de *Aspergillus flavus* (Sigma), mayor igual a 98% pureza (1mg)

B1: lote A6636

B2: lote A9887

G1: lote A0138

G2: lote A 0263

6. FUNDAMENTO.

El método está basado en la extracción de AFLAs desde vinos blancos y tintos, con la solución de extracción (Tween 20-PBS) y separación del analito mediante el uso de columnas de inmunoafinidad para su posterior análisis por técnica HPLC con detección de fluorescencia. El cálculo de la concentración de la toxina, se determinara mediante el uso de una curva de calibración realizada con vinos fortificados con mix de AFLAs.

7. DEFINICIONES.

Para los efectos de esta directriz se define como:

- **Aflatoxinas** (AFLAs; AFG1, AFB1, AFG2, AFB2): Metabolitos tóxicos producidos por especies de hongos del genero *Aspergillus*. Considerados como agentes cancerígenos, teratógenos, inmunosupresores y hepato-tóxicos. Las AFLAs han sido detectadas en numerosos alimentos como frutos secos, cereales, legumbres y vino.
- **Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento o High Performance Liquid Chromatography (HPLC):** Método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. Es la técnica analítica de separación más versátil y utilizada de entre los métodos cromatográficos, debido a su alta sensibilidad, especificidad y su gran campo de aplicación.
- **Columna de Inmunoafinidad (IAC):** Columna de extracción o de limpieza (*clean up*) que retiene al analito específicamente, basado en el principio de la afinidad antígeno-anticuerpo.
- **Tiempo de retención (t_R):** Es el tiempo que transcurre inmediatamente después de la inyección de la muestra hasta que el pico cromatográfico del analito alcanza su máximo.
- **Vino Fortificado:** Muestra de vino al cual se le ha adicionado una cantidad conocida de los analitos de interés.

8. ACTIVIDAD.

El control de calidad de este método analítico HPLC-FL para AFLAs se verifica de acuerdo al Protocolo de Procedimiento de Aseguramiento de la Calidad de los Ensayos (Anexo 2).

8.1 Curvas de Calibración

Construcción de 2 curvas de calibración para estándares puros, vino blanco y tinto fortificado con AFLAs.

8.1.1 Curva de Calibración Estándar.

Curva de calibración con estándares puros de AFLAs. Se utilizan al menos 6 puntos de concentración (2,5-100 ng/mL). Cada punto es inyectado por duplicado y replicado. Obtener curva promedio.

8.1.2 Curva de Calibración Vino Tinto y Blanco.

Para la cuantificación, determinar curva de calibración promedio de vino blanco y tinto fortificado con AFLAs. Se utilizan al menos 5 puntos de concentración (1,5-24ng/mL). Cada punto es inyectado por duplicado y replicado.

8.2 Muestras

Este método es aplicable para muestras de vino blanco y tinto

8.2.1 Recolección y Toma de Muestras.

- Colectar del mercado nacional 48 botellas de cuatro variedades previamente indicadas (Cabernet Sauvignon, Carménère, Sauvignon Blanc, Chardonnay), de los años 2011 y 2012. Con denominación de origen del Valle Central de Chile.
- Limpiar las botellas con un paño.
- Rotular los envases con el código asignado
- Abrir las botellas cortando el sello.
- Sacar el corcho lentamente para evitar que caigan restos de este al vino.

8.2.2 Protocolo de extracción

8.2.2.1 Preparación de la muestra

- En un tubo de 30 mL, con pipetas graduadas de 10 mL agregar:
- 2 mL de vino.
- 18 mL de solución de extracción
- Homogenizar por 3 minutos
- Centrifugar por 5 minutos a 5.000 rpm.

8.2.2.2 Activación de la columna.

- Colocar las columnas IAC en un soporte
- Abrir ambas tapas de la columna
- Dejar eluir la solución de fabricante del interior de la columna por gravedad
- Aplicar 3 mL de solución PBS.
- Dejar pasar el volumen por gravedad
- Repetir paso anterior y eluir hasta la mitad del volumen.
- Descartar
- No permitir secar la columna.

8.2.2.3 Aplicación de la muestra.

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

8.2.2.4 Lavado de la muestra.

- Lavar con 10 mL de solución de lavado
- Secar completamente la columna con presión manual
- Descartar

8.2.2.5 Elución del analito.

- Eluir la muestra retenida en la columna IAC con 1 mL de acetonitrilo puro
- Recoger la elución en tubo de 10 mL
- Dejar reposar a presión ambiental durante 5 minutos
- Aplicar 2 mL de acetonitrilo puro
- Eluir completamente con presión manual
- Evaporar la muestra a 40 °C hasta sequedad bajo corriente de N₂
- Reconstituir el sedimento con 500 µL de solución acetonitrilo:agua (90:10)
- Homogenizar y sonicar por 5 min.

8.2.2.6 Derivatización

- Tomar 400 µL del reconstituido.
- Agregar 400 µL de solución derivatizante.
- Homogenizar por 1 minuto.
- Aplicar baño termoregulado a 60°C por 10 minutos.
- Homogenizar por 1 minuto.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente
- Colectar el volumen en vial ámbar de 2 mL.
- Inyectar un volumen de 25 µL.

Condiciones Cromatográficas.

- Columna analítica: Phenomenex: SYNERGY 4µ RP 80^a; 250 X 4.60 mm.
- Flujo de la fase móvil: 1 ml/min.
- Longitud de onda de excitación: 360 nm
- Longitud de onda de emisión: 440 nm
- Volumen de inyección: 25 µL
- Tiempo de corrida: 20 minutos.

8.3 Calculo de la concentración de AFLAs

La concentración extrapolada de la curva de calibración que da el equipo corresponde a la concentración en ng/mL de AFLAs en 1 mL de la muestra reconstituida.

9. REFERENCIAS

- 9.1.1** Instituto de Salud Pública de Chile. 2010. Determinación de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Método HPLC con columna de inmunoafinidad. PTR-711.04-193. Sección Química de Alimentos y Nutrición. 8 p.

- 9.1.2** Rodríguez, M. 2013. Optimización de un método para el análisis de Aflatoxinas en vinos. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 45p. Santiago
- 9.1.3** Ayosa, C. 2011. Desarrollo de método HPLC y su aplicación en el análisis comparativo de la presencia de Ocratoxina A, en cuatro vinos comerciales: Carménère, Cabernet Sauvignon, Gewurztraminer y Late Harvest (Gewurztraminer). Tesis de Magister, Facultad de Química y Farmacia. Universidad de Chile. 117p. Santiago.

10. Anexos

No se requiere.

Apéndice 2

 <p>Universidad de Chile Laboratorio de Toxicología</p>	<p>PROTOCOLO DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS ANALISIS DE AFLATOXINAS (G1, B1, G2, B2) EN VINOS</p>	<p>COPIA N° 1</p> <p>20/08/2013</p>
	<p>Américo López Rivera^a, Elías Obreque Slier^b, Eliana Seguel R.^c</p> <p>^a Laboratorio de Toxicología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ^b Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas. ^c Alumna de Magister de Enología y Vitivinicultura. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.</p>	

1. OBJETIVO

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

2. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a los resultados obtenidos en la cuantificación e identificación de AFLAs en vinos mediante el uso de un método de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia desarrollado en la presente tesis.

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 aseguramiento de la 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.

- Participar en la evaluación de los resultados obtenidos.
- Registrar los resultados y la información obtenida.

4. DISTRIBUCIÓN.

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

Profesor Elías Obreque Slier, Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

5. EQUIPOS Y MATERIALES.

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

5.1 Reactivos

5.1.1 Soluciones

Vino blanco y tinto fortificado: agregar 12 μ L de solución de trabajo mix de AFLAs (100 ng/mL) a 200 mL de vino blanco y tinto (previamente analizados y designados como vinos cero)

6. FUNDAMENTO

El aseguramiento de la calidad de los resultados mediante la determinación de la reproducibilidad de la recuperación en una muestra de la matriz fortificada con una concentración conocida, permite asegurar la validez de los valores obtenidos.

7. DEFINICIONES.

Para los efectos de esta directriz se define como:

- **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 obtenido de un procedimiento y realizado a una sola muestra.
- **Material de Referencia Certificado:** Material que el fabricante certifica que se ha demostrado una o varias propiedades, por medio de un método validado, de manera que se pueda utilizar para comprobar los resultados (recuperación) de un método de medición.
- **Blanco:** Análisis practicado mediante la técnica especificada a los reactivos utilizados en ella.

8. ACTIVIDAD

Se utilizan protocolos determinados para todo los procedimientos incluidos dentro del alcance de la validación del método, incluyendo manipulación, transporte, almacenamiento y preparación de los ítems que se deben someter a análisis.

8.1. Control de Calidad de los Análisis de AFLAs (técnica HPLC-FL).

8.1.1. Uso de muestra de vino fortificado con AFLAs: Cada vez que se realiza una serie de análisis de muestras, se procesa una muestra de vino fortificado con AFLAs en una concentración de 6 ng/mL.

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

- Fase móvil.
- Muestras de vino.
- Fase móvil
- Muestra de vino fortificado con 6 ng/mL de AFLAs
- Fase móvil

El set de control cumple con las siguientes características:

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

8.2. Criterio General de Aceptación o Rechazo.

Criterios de aceptabilidad de análisis diario: Se debe realizar un test de aceptabilidad de la solución de vino (blanco o tinto) fortificado con 6 ng/mL: tiempos de retención, concentración leída, temperatura ambiental, presión de la columna analítica. Se verifica que se cumplan los siguientes criterios:

Parámetro	Criterio de aceptación
Width at 5% (W) (Medida en la base)	$0.5 \leq W \leq 1$
Concentración	$\pm 5\%$
Recuperación vino fortificado	90 % ± 5
Tiempo de retención	AFG1: 5.7 min $\pm 5\%$ AFB1: 7 min $\pm 5\%$ AFG2: 11 min $\pm 5\%$ AFB2: 14.9 min $\pm 5\%$
Temperatura ambiental	20-25°C
Presión de la columna analítica	250-260 bar

8.2.1. Pasos a seguir en caso de desviación de los criterios de aceptación.

Parámetro no satisfactorio	Pasos a seguir en caso de desviación
Width at 5% (W) (medida en la base)	-Realizar chequeo del sistema HPLC (control de flujo, funcionamiento de lámpara, presión, etc.). -Verificar la composición (%) de la fase móvil en uso. -Activar la columna por un tiempo no menor a 15 min. -Preparar un nuevo vino fortificado. -Inyectar nuevamente el vino fortificado. -cambiar la columna analítica. -Verificar composición de las soluciones de lavado, acondicionamiento y extracción -Cambiar la columna de extracción (IAC).
Concentración	
Recuperación (vino fortificado)	
Tiempo de retención	
Presión de la columna analítica	
Temperatura ambiental	

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

9. Anexos

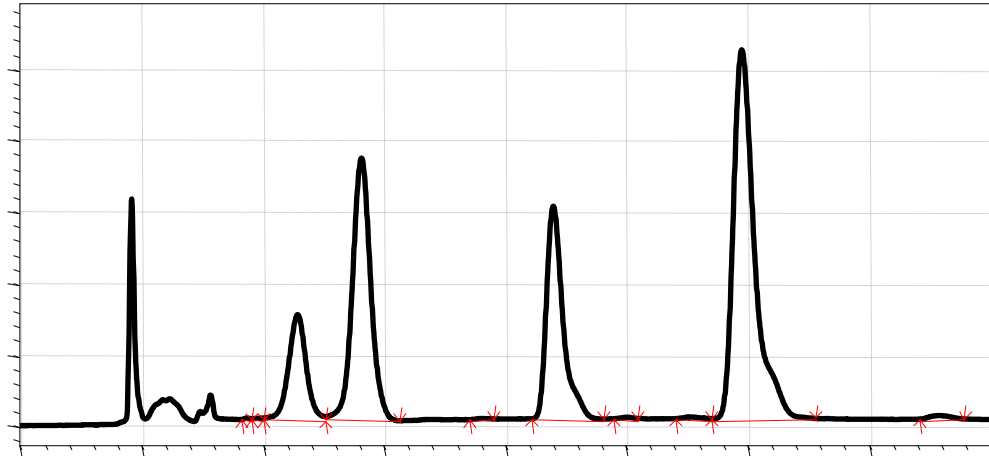


Figura 1. Cromatograma de vino blanco fortificado con 6 ng/mL de AFLAs.

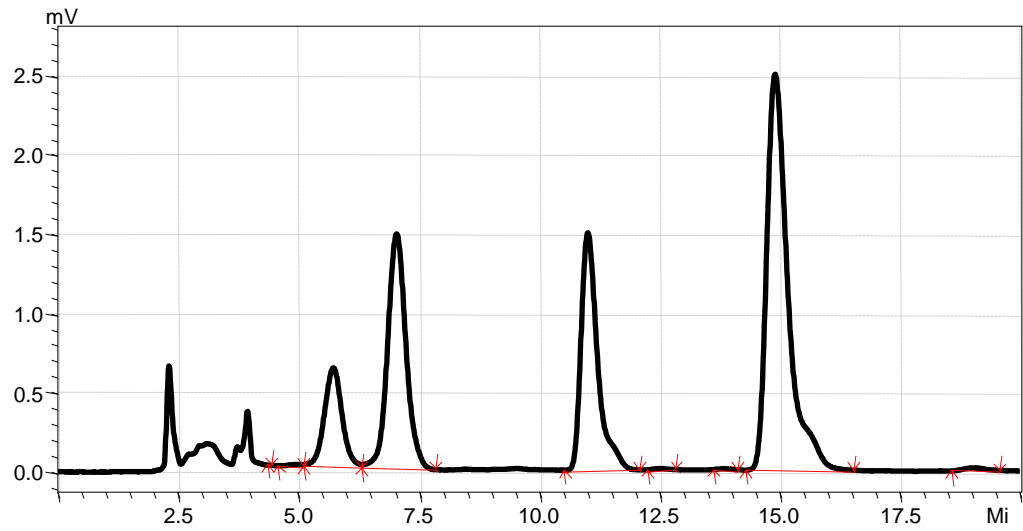


Figura 2. Cromatograma de vino tinto fortificado con 6 ng/mL de AFLAs