



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

Aplicaciones de metodologías analíticas para detectar y cuantificar AFB1, en  
piensos, creando un diseño de monitoreo en la producción avícola de la  
Provincia de Huambo, Angola

**ISABEL CAPITAO FERREIRA**

Anteproyecto para obtener el Título  
de Magíster en Ciencias Animales y  
Veterinarias  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile  
COGUIA: PEDRO ENRIQUEZ ALFARO  
Servicio Agrícola Ganadero

SANTIAGO, CHILE

2017

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	6
AGRADECIMIENTOS .....	7
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 Micotoxinas: características y generalidades .....	13
2.2 Presencia de micotoxinas en los alimentos destinados a animales o piensos ....	14
2.3 Impacto de las micotoxinas en producción animal .....	14
2.4 Aflatoxinas: características y generalidades .....	15
2.5 Presencia de aflatoxinas en climas tropicales .....	16
2.6 Métodos de análisis de aflatoxinas.....	17
2.7 Regulación de la presencia de aflatoxinas en piensos.....	18
2.8 Control de Micotoxinas.....	18
3. HIPOTESIS .....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	20
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1 Aplicación de metodología analítica screening (ELISA) para la detección de AFB1 en piensos destinados a producción animal. ....	21
6.1.1 Muestras experimentales .....	21
6.1.2 Análisis de las muestras .....	21
6.1.3 La aplicación de la Metodología Analítica por ELISA .....	21

6.1.4	Protocolo de Análisis ELISA .....	22
6.2	Aplicación una metodología analítica confirmatoria por HPLC-Fluorescencia para la cuantificación de AFB1 en piensos.....	24
6.2.1	Aplicación de la Metodología Analítica por HPLC-Fluorescencia.....	24
6.2.2	Protocolo de análisis de aflatoxinas por HPLC-Fluorescencia .....	24
6.2.3	Reactivos y Soluciones.....	25
6.2.4	Preparación de Estándares de Aflatoxinas .....	25
6.2.5	Análisis Instrumental.....	26
6.3	Propuesta de un diseño piloto para evaluar la incidencia de aflatoxinas B1 en piensos destinados a producción aviar en la provincia de Huambo, utilizando las metodologías analíticas implementadas. ....	26
6.3.1	Diseño de la propuesta.....	26
7.	RESULTADOS .....	28
7.1	Aplicación de metodología analítica screening (ELISA) para la detección de AFB1 en piensos destinados a producción animal. ....	28
7.2	Aplicación de una metodología analítica confirmatoria por HPLC-Fluorescencia para la cuantificación de AFB1 en piensos.....	31
	DISCUSIÓN .....	40
	CONCLUSIONES .....	44
	BIBLIOGRAFÍA .....	46
	ANEXOS .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Resultados obtenidos por ensayo ELISA de las 36 muestras analizadas, versus el punto de corte de 5 ng/g.....	28
<b>Tabla N° 2:</b> Relación entre área obtenida y concentración del estándar de AFB1.....	31
<b>Tabla N° 3:</b> Relación entre área obtenida y concentración del estándar AFB1 en matriz. .	33
<b>Tabla N° 4:</b> Parámetros de las muestras de pienso fortificadas con AFB1 a 5 ng/g. ....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°1:</b> Esquema de posición de las muestras y controles en la placa ELISA de ensayo. a) color rojo /estándares, b) color verde /fortificados de muestra blancos a 20 ng/g, c) color azul /muestras analizadas.....	23
<b>Figura N°2:</b> Concentraciones (ng/g) obtenidas a través del método ELISA, de las muestras analizadas (piensos) sobre el nivel de 1.00 (ng/g).....	30
<b>Figura N°3:</b> Curva de calibración, que relaciona la concentración del estándar con la absorbancia relativa..	30
<b>Figura N°4:</b> Curva de concentración de estándar de AFB1 versus señal ( área obtenida)..	31
<b>Figura N° 5:</b> Curva de concentración de estándar de AFB1 en matriz, versus señal (área obtenida).....	32
<b>Figura N° 6:</b> Cromatograma de pienso sin fortificar (blanco matriz). .....	33
<b>Figura N° 7:</b> Cromatogramas de muestras (duplicados) de pienso fortificadas a 5 ng/g. el círculo rojo corresponde a señal de AFB1 Tr.10,9 min.....	34
<b>Figura N° 8:</b> Cromatogramas obtenidos de las 10 muestras de piensos analizadas: a) muestra 252, b) muestra 253; c) muestra 255; d) muestra 318; e) muestra 319; f) muestra 658; g) muestra 574; h) muestra 656; i) muestra 659; j) muestra 706.....	36
<b>Figura N° 9:</b> Mapa de la Provincia de Huambo (Angola) y las zonas de muestreos (planteles y fábricas).....	37

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo en primer lugar al creador de los cielos y toda la tierra, al Señor de los señores, Dios es su nombre.

Para toda mi familia...en memoria de mi mamá y papá, quienes se sentirían orgullosos por los esfuerzos que han realizado por mí.

A todos mis colegas del Instituto de Investigación Veterinaria de Angola por sus ideas y motivaciones...

## AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Chilena de Cooperación Internacional por el Programa de Formación Académica, a través de la Beca Nelson Mandela, la cual me dio la posibilidad de inscribirme y ser seleccionada a su programa.

Al Instituto de Investigación Veterinaria del Ministerio de la Agricultura de Angola y a la señora Cleonice da Costa Cadete, directora del Laboratorio Alimentario, por depositar su confianza en mí.

Al Servicio Agrícola y Ganadero, en especial a don Pedro Enríquez Alfaro, Jefe del Laboratorio de Química e Inocuidad Alimentaria, a quien le agradezco haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuesta durante el desarrollo de la tesis, así como por ser parte y aceptar ser mi co-guía en este trabajo de tesis.

Debo agradecer a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en conjunto de la dirección del curso de Magíster, por aceptarme en sus dependencias, siendo una experiencia única al ser la primera vez en recibir a un estudiante del continente africano.

A mi profesora guía Javiera Cornejo Kelly, quien se dedicó pacientemente a mi persona no olvidando a todos profesores que de forma directa o indirecta contribuyeron en el incremento de los conocimientos recibidos durante estos dos años del Magíster.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todo el personal del Laboratorio de Química e Inocuidad Alimentaria por sus aporte y participación activa al desarrollo de esta tesis, debo destacar, su disponibilidad y paciencia en aquellos momentos en los que necesite su ayuda.

Muchas gracias.

## RESUMEN

Las aflatoxinas son micotoxinas consideradas altamente carcinogénicas, siendo la aflatoxina B1, carcinógeno del Grupo 1, de acuerdo al IARC. Estas micotoxinas llegan a tener impactos en la salud y económicos significativos, lo que las convierte en objetivos importantes para la detección y cuantificación. La evidencia científica ha demostrado que el clima influye en su presencia, por lo cual, las regiones tropicales y subtropicales como la provincia de Huambo-Angola, son considerados propensas a su desarrollo, asociándose principalmente a los cultivos de maíz, maní y otras semillas.

Para identificar y cuantificar la presencia de esta toxina en los granos, se implementó un método analítico de screening a través de la técnica inmunoenzimática (ELISA), mediante la cual se analizó un total de 36 muestras (32 muestras de piensos y 4 de maíz en grano para alimento animal), utilizando un valor de corte de 5 ng/g como valor referencial analíticamente aceptable, siendo todos sus resultados no detectados a un nivel de control de 5 ng/g. Posteriormente, se reanalizaron 10 de estas muestras, utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FL), técnica mediante la cual no se evidenció señal en los tiempos de retención, lo que fue concordante con los resultados obtenidos por el métodos ELISA.

Por otra parte, se implementó un diseño de programa para monitorear aflatoxinas B1 en alimentos destinado a la producción avícola, en la provincia de Huambo–Angola, contribuyendo a la entrega de información para implementar acciones de control y mitigación en la calidad e inocuidad alimentaria en la industria avícola.

**Palabras claves:** aflatoxina, screening, ELISA, HPLC-FL.

## ABSTRACT

Aflatoxins are mycotoxins considered to be highly carcinogenic, aflatoxin B1 being a carcinogen of group 1, according to IARC. These mycotoxins have significant health and economic impacts, which makes them important targets for detection and quantification. Scientific evidence has shown that climate influences their presence, therefore, tropical and subtropical regions such as Huambo - Angola province are considered prone to their development, associating mainly to the crops of corn, peanuts and other seeds.

In order to identify and quantify the presence of this toxin in the grains, an analytical method of screening was implemented through the immunoenzymatic technique (ELISA), through which a total of 36 samples were analyzed (32 samples of feed and 4 of corn for animal food), using a cut-off value of 5 ng / g as an analytically acceptable referential value, all of which results were not detected at a control level of 5 ng / g. Subsequently, 10 of these samples, using high-performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FL), a technique whereby no signal was observed in the retention times, which was consistent with the results obtained by the ELISA methods.

On the other hand, a program design was implemented to monitor aflatoxins in food destined to poultry production, in the province of Huambo-Angola, contributing to the delivery of information to implement control and mitigation actions in the quality and food safety in the poultry industry.

**Keywords:** aflatoxin, screening, ELISA, HPLC-FL

## ABREVIACIONES

CE	Comunidad Europea
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos
PHPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IARC	Organismo Internacional para la Investigación del Cáncer
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
OMS	Organización Mundial de la Salud
QAA	Laboratorio de Química e Inocuidad Alimentaria
SAG	Servicio Agrícola Ganadero
TLC	Cromatografía en capa fina
UE	Unión Europea

## 1. INTRODUCCIÓN

La influencia del clima de regiones tropicales o subtropicales con variaciones extremas de temperatura, lluvia y humedad, así como las que se presentan en la provincia de Huambo-Angola, pueden impactar fuertemente en el desarrollo de hongos en los alimentos. La presencia de hongos saprófitos o patógenos en los alimentos puede producir sustancias con efectos indeseables para las plantas, los animales y para la población. Estas sustancias, conocidas como micotoxinas, son metabolitos secundarios producidos por algunos géneros de hongos como, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, que, en condiciones de temperatura y humedad adecuadas, se suelen encontrar en grandes variedades de productos agrícolas, considerándose como los contaminantes naturales más extensos a nivel mundial.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2012), señala que la acumulación de micotoxinas en los alimentos y los piensos representa una amenaza importante para la salud humana y la sanidad animal, puesto que son la causa de muchas intoxicaciones de diferentes tipos, inducción de cáncer, mutagenicidad y trastornos estrogénicos, gastrointestinales, urogenitales, vasculares, renales y nerviosos. Algunas micotoxinas son también inmunodepresoras, por lo que pueden reducir la resistencia a las enfermedades infecciosas. Conjuntamente, la mayoría de las micotoxinas son compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento o la cocción de alimentos, entrando fácilmente a la cadena alimentaria, constituyendo así un riesgo para la salud pública.

Las aflatoxinas son micotoxinas consideradas altamente carcinogénicas, dentro de las cuales la aflatoxina B1, se encuentra como carcinógeno del Grupo 1, de acuerdo al Organismo Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC). Estas micotoxinas llegan a tener impactos en la salud y económicos significativos, lo que las convierte en objetivos importantes para la detección y cuantificación. La evidencia científica ha demostrado que el clima influye significativamente en su presencia, de esta forma, las regiones tropicales y subtropicales son considerados propensas al desarrollo de aflatoxinas, asociándose principalmente a los cultivos de maíz, maní y otras semillas.

El maíz es el cereal de mayor producción en el continente africano, especialmente en las regiones de Angola, siendo considerado la base para la alimentación de las personas, como también para los animales, al emplearse como materia prima para la elaboración de piensos. El impacto sanitario y económico que puede significar la presencia de aflatoxinas en los granos para este sector, incluye la pérdida de producción de cultivos de maíz, eliminación de alimentos y piensos contaminados, reducción de la producción ganadera, incluso pérdidas de vidas humanas y animales. De acuerdo a esta situación, es importante y necesario para la provincia de Huambo en Angola, la implementación de un programa que permita evaluar la incidencia de aflatoxinas en alimentos destinados al consumo animal, mediante el diagnóstico de aflatoxinas en granos y piensos, con el objetivo de tomar medidas de control y mitigación, para así evitar los efectos indeseados de estas sustancias sobre la producción animal y efectos sobre la salud de las personas.

Para evaluar la presencia de aflatoxinas, es necesario, en primer lugar, implementar métodos analíticos eficaces que permitan identificar y cuantificar estas toxinas en los granos. Estos métodos, no están disponibles en Angola a la fecha. La metodología de trabajo estará dividida en dos partes; se realizará screening a través de la técnica inmunoenzimática (ELISA), y como método confirmatorio se utilizará cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia.

De acuerdo a los antecedentes expuestos, el presente trabajo consiste en implementar un diseño de programa para monitorear aflatoxinas en alimentos destinado a la producción avícola, en la provincia de Huambo – Angola. De esta forma, se contribuirá a la entrega de información relevante para implementar acciones de control y mitigación que asegure la calidad e inocuidad del alimento en la producción avícola.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

El acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidades suficientes, es imprescindible para sostener la vida y promover una buena salud en la población. Se estima que, el acceso a alimentos inseguros, que contienen bacterias dañinas, virus, parásitos o sustancias químicas, causan más de 200 enfermedades que van desde la diarrea hasta el cáncer, siendo más de 600 millones de personas (1 de cada 10 personas en el mundo), las que se enferman después de comer alimentos contaminados y 420.000 mueren cada año (OMS, 2015).

Dentro de las sustancias químicas que se pueden presentar en los alimentos, las de mayor preocupación para la salud son los contaminantes ambientales y las toxinas de origen natural. En estas últimas se incluyen las micotoxinas, consideradas como compuestos tóxicos que pueden ingresar a la cadena alimentaria a través de la contaminación de productos agrícolas (OMS, 2015; Wild *et al.*, 2015). Estas toxinas pueden afectar adversamente la salud animal y la producción, causando además efectos perjudiciales a los seres humanos si se transmiten a los alimentos (Zaki *et al.*, 2012). Se estima que alrededor de 500 millones de personas de África Subsahariana, América Latina y Asia están expuestas a micotoxinas a niveles que aumentan sustancialmente la mortalidad y la morbilidad (Wild *et al.*, 2015).

De acuerdo a lo señalado por la FAO (2012), son significativas las pérdidas económicas asociadas con sus efectos en la salud humana, productividad animal y el comercio nacional como internacional. Se calcula que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, incluidos muchos alimentos básicos, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas, resultando en pérdidas mundiales de productos alimenticios debidas a las micotoxinas de 1000 millones de toneladas al año.

### **2.1 Micotoxinas: características y generalidades**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de bajo peso molecular, producidas por algunos mohos filamentosos, pertenecientes en su mayor parte a 6 géneros de mohos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* y *Stachybotrys*, presentes en productos alimenticios y piensos, antes como después de la cosecha (Demaegdt *et al.*, 2016). En la actualidad, se han descrito alrededor de 400 micotoxinas diferentes, las cuales producen

una variedad de enfermedades, colectivamente llamadas “micotoxicosis” (Murugesan *et al.*, 2015; Pleadin, 2015).

Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de reacciones de condensación, que en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos (Gimeno y Martins, 2011).

## **2.2 Presencia de micotoxinas en los alimentos destinados a animales o piensos**

Los granos que están altamente representados en la dieta humana y animal, así como en alimentos industriales y piensos, pueden contaminarse con mohos productores de micotoxinas, antes y durante la cosecha, la manipulación, el envío y el almacenamiento (Pleadin, 2015). Las pérdidas relacionadas con micotoxinas en los Estados Unidos se estiman en un rango de 767.34 USD a más de 2.302.014.12 USD al año, con un costo económico anual promedio de 1.430.318.12 USD en pérdidas de cultivo (Babu y Muriana, 2014). Por lo general, los granos de cereales son los más afectados, como también, los frutos secos, semillas oleaginosas, frutas, verduras, granos de cacao y café, vino, cerveza, hierbas y especias. Además, pueden encontrarse en productos alimenticios obtenidos a partir de animales alimentados con piensos contaminados, es decir, en la carne, los huevos, la leche y los productos lácteos (Pleadin *et al.*, 2017; Sarma *et al.*, 2017).

## **2.3 Impacto de las micotoxinas en producción animal**

Las micotoxinas consideradas de mayor relevancia para la producción animal son las aflatoxinas (AF), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN), las fumonisinas (F), la ocratoxina A (OTA) y tricotecenos (TCT) (Streit *et al.*, 2012; Zaki *et al.*, 2012).

Los animales son susceptibles de forma variable a las micotoxinas, dependiendo de factores tales como edad, especie, raza, sexo y nutrición (Zain, 2011; Pleadin, 2015). El cerdo, las aves de corral y el ganado son los animales de granja de mayor preocupación económica en términos de micotoxicosis, dentro de estos últimos, los bovinos y ovinos, son más resistentes por su población microbiana intestinal, que desempeña un papel en el proceso de desintoxicación (Pleadin, 2015). Las aflatoxinas (AF), se asocian tanto con la toxicidad y

carcinogenicidad y aumento de la mortalidad en animales de granja. Los productos lácteos también pueden servir como una fuente indirecta de AF, cuando las vacas consumen piensos contaminados con estas toxinas, biotransforman metabólicamente la AFB1 en una forma hidrolizada llamada AFM1 (Zain, 2011).

Los efectos de aflatoxinas en aves de corral, se asocian a una disminución de peso, conversión alimentaria negativa, reducción de la producción y peso de huevos, el aumento de grasa en el hígado, cambios en el peso de los órganos, reducción en los niveles de proteína en el suero, moretones en la carcasa, mala pigmentación, daño hepático, disminución de la actividades de varias enzimas implicadas en la digestión del almidón, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y la inmunosupresión (Murugesan *et al.*, 2015).

#### **2.4 Aflatoxinas: características y generalidades**

Las aflatoxinas son derivados de difuranocumarina producidos en una vía de policétidos por muchas cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, en particular, *A. flavus*, que es un contaminante común en la agricultura, logrando crecer y producir aflatoxinas en niveles bastante bajos de humedad (mínimo aproximado  $A_w$  0,82) y sobre un rango amplio de temperatura (13-37 °C) (Lawley, 2013; Ismaiel y Papenbrock, 2015). Son una familia de micotoxinas biológicamente activas estrechamente relacionadas, que pueden presentarse naturalmente en varios alimentos claves para los animales, incluyendo el maíz, semillas de algodón y paltas (Zaki *et al.*, 2012). Representan compuestos altamente tóxicos, mutagénicos, teratogénicos y carcinógenos que exhiben una actividad inmunosupresora, causando toxicidad tanto aguda como crónica en humanos y animales (Pleadin, 2015).

Las principales aflatoxinas se denominan B1, B2, G1 y G2 (basadas en su fluorescencia bajo luz UV (azul o verde) y movilidad cromatográfica relativa durante la cromatografía en capa fina) M1 y M2 (producidos en leche y productos lácteos) (Zain, 2011). Entre los 18 tipos diferentes de aflatoxinas producidas por las cepas de *A. flavus*, la aflatoxina B1 (AFB1) es el carcinógeno hepático más potente conocido en los mamíferos, y es clasificado por el Organismo Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinógeno del Grupo 1 (Ismaiel y Papenbrock, 2015; Pleadin, 2015). La AFB1 puede entrar en el sistema humano o animal a través de la ingestión, inhalación o contacto dérmico, provocando una

amplia gama de efectos tóxicos agudos y crónicos adversos (Babu y Muriana, 2014). Esta toxina puede generar disfunción hepática, reducir la producción de leche y la producción de huevos y reducir la inmunidad de los animales. El consumo a largo plazo de concentraciones bajas de AFB1 en piensos también puede resultar en toxicidad embrionaria (Pleadin, 2015).

Diversas investigaciones en productos básicos, piensos e ingredientes para piensos, revelaron que los niveles máximos de AFB1 en muestras procedentes del norte de Europa fueron de 60 µg/kg, en Europa Central de 311 µg/kg y en muestras procedentes del sur Europa y el Mediterráneo de 656 µg/kg. En esta parte del sureste de Europa, las investigaciones realizadas en Serbia durante el año 2012 apuntaron a la contaminación del maíz con AFB1, concluyendo que el cambio climático podría ser responsable de tal contaminación (Pleadin, 2015).

## **2.5 Presencia de aflatoxinas en climas tropicales**

La invasión de *A. flavus* a los cultivos de palta en el campo es favorecida por el estrés por sequía y los cultivos de maíz son vulnerables si son dañados por plagas de insectos. De igual forma, la presencia de aflatoxinas, está fuertemente influenciada por el clima y, a pesar de que se encuentran en todo el mundo, son más comunes en las regiones tropicales o subtropicales con variaciones extremas de temperatura, lluvia y humedad, un ejemplo de lo señalado, se manifiesta en la provincia de Huambo-Angola, ver (anexo N° 6) la cual presenta un clima subtropical, propicio para el desarrollo de aflatoxinas en los cereales (Lawley, 2013; Luckett *et al.*, 2016). En continentes como África, los climas cálidos y largos periodos de sequía, tienen un impacto significativo en las cantidades de alimentos producidos, siendo más propensos a la contaminación con aflatoxinas. El aumento de las temperaturas por sobre los 30°C, sería propicio para su producción (Magan *et al.*, 2011). Por lo tanto, desde una perspectiva europea, los piensos importados, tales como torta de palta, almendra de palma y la harina de gluten de maíz (dependiendo de origen) se considera que son la fuente más común de exposición a las aflatoxinas (Streit *et al.*, 2012).

La evidencia científica ha demostrado que, si un grano como el maíz se cultiva a temperatura ambiente alta, especialmente durante la sequía, se vuelve más susceptible a la formación de AFB1. Los granos almacenados bajo condiciones de alta humedad (mayor a 14%) y a altas

temperaturas (sobre los 20°C) y/o inadecuadamente secos, pueden potencialmente contaminarse (Pleadin, 2015).

## **2.6 Métodos de análisis de aflatoxinas**

El reconocimiento de que las micotoxinas afectan la salud humana y animal, ha llevado a una intensa investigación sobre los métodos para reducirlas, incluyendo la detección y eliminación o desintoxicación de las micotoxinas (Murugesan *et al.*, 2015). Debido a los bajos límites permisibles para las aflatoxinas y la alta toxicidad asociada a estas, afectando la salud incluso a niveles de exposición subcrónica, los métodos analíticos para su determinación deben ser sensibles y específicos para ser capaz de cuantificar los niveles traza (Babu y Muriana, 2014).

Entre los métodos disponibles para su detección, los métodos de inmunoensayo proporcionan seguridad durante las aplicaciones de diagnóstico de rutina debido a la alta selectividad y alta afinidad de los anticuerpos específicos para el antígeno (Babu y Muriana, 2014). Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), aunque son sólo semi-cuantitativos y se han utilizado como métodos de “*screening*”, siendo importantes en el desarrollo de ensayos rápidos, repetibles y sensibles. Estos ensayos son adecuados para el uso en el campo y la selección de productos alimenticios en las fábricas de piensos (Bryden, 2012). Otros métodos analíticos para la separación de micotoxinas incluyen la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual inició el camino para detectar múltiples micotoxinas simultáneamente en una muestra. (Zaki *et al.*, 2012; Lawley, 2013). En algunos productos, tales como en higos, las aflatoxinas fluorescente fuertemente bajo luz UV, por lo cual su análisis por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, es uno de los métodos más utilizados como una prueba de detección rápida para altas concentraciones de estas sustancias (Lawley, 2013). Por otra parte, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (tándem) (LC-MS/MS) aumentó el potencial para detectar cientos de micotoxinas simultáneamente en una muestra (Murugesan *et al.*, 2015).

## **2.7 Regulación de la presencia de aflatoxinas en piensos**

La contaminación por micotoxinas en los piensos puede derivar en riesgos para la salud humana y animal, así como, en importantes implicaciones económicas y comerciales (Pinotti *et al.*, 2016). Con el fin de evitar estos efectos nocivos, las regulaciones de las micotoxinas se han establecido en más de 100 países, de los cuales 15 son africanos, estableciendo niveles máximos permitidos o MPLs por sus siglas en inglés, en materias primas de alimentos y piensos. Estos límites no son universales para todos los países. En los Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos ha establecido niveles de acción para las aflatoxinas de 20 ng/g (ppb) para piensos, al igual que los establecidos por la UE, para la AFB1 (Directiva 2003/100/CE) (Zain, 2011; Babu y Muriana, 2014; Pinotti *et al.*, 2016). Por otra parte, la Regulación de la Comisión Europea N°1881/2006, establece un nivel máximo para Aflatoxina B1 en maíz destinado al consumo humano de 5 ng/g (CE, 2006). Actualmente el SAG de Chile, está elaborando para consulta pública un reglamento para control de aflatoxinas en alimentos destinados al consumo animal, los valores máximos en piensos se encuentran establecidos en la Resolución N°736/1992/SAG (FAO, 2003), la cual ha sido derogada recientemente para armonizar estos límites con los establecidos por la UE (Sartori, ANÓN).

## **2.8 Control de Micotoxinas**

Una vez que se ha formado una micotoxina en un pienso, es difícil reducir su concentración debido a la estabilidad de estos compuestos. Por lo tanto, es importante contar con estrategias que permitan prevenir o controlar su producción (Bryden, 2012). Es por esto, que muchos países africanos han empezado a establecer estrategias de prevención, control y vigilancia para reducir la incidencia de las micotoxinas en los alimentos (Darwish, 2014). Sin embargo, la información disponible sobre la incidencia, importancia para la salud pública, la prevención y el control de las micotoxinas en muchos países africanos aún es insuficiente. Lo cual, puede explicarse por los sistemas de monitoreo limitados y falta de adopción de medidas preventivas y de control en estos países (Domingos, 2011; Darwish, 2014).

A nivel nacional, se encuentra en proceso un plan de diseño e implementación de la estrategia para un programa de control de contaminantes en alimentos para uso animal, incluyendo dentro de este el análisis de contaminantes como las micotoxinas (Alarcón, 2013).

### **3. HIPOTESIS**

La aplicación de las metodologías analíticas: screening (ELISA) y un método confirmatorio (HPLC/fluorescencia) permiten evaluar la presencia de aflatoxinas (AFB1) en piensos, siendo aplicables a un programa de monitoreo de alimentos de aves en la Provincia de Huambo, Angola.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Aplicar las metodologías analíticas para detectar y cuantificar AFB1, en piensos, y diseñar un programa de monitoreo para la producción avícola en la Provincia de Huambo, Angola

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aplicación de una metodología analítica a través de un método de screening (ELISA) para la detección de AFB1 en piensos destinados a producción animal.
2. Aplicación de una metodología analítica a través de un método confirmatorio por HPLC-fluorescencia para la cuantificación de AFB1 en piensos destinados a producción animal.
3. Propuesta de un diseño piloto para evaluar la incidencia de AFB1 en piensos destinados a producción avícola de Huambo, utilizando las metodologías analíticas implementadas.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Aplicación de metodología analítica screening (ELISA) para la detección de AFB1 en piensos destinados a producción animal.**

La implementación del método analítico se realizó en el Laboratorio de Química e Inocuidad Alimentaria del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura de Chile, acreditado bajo la norma ISO 17025 of 2005 por la cual se realizó una capacitación previa para asegurar la correcta ejecución de los ensayos.

#### **6.1.1 Muestras experimentales**

La toma de las muestras se llevó a cabo por inspectores oficiales del SAG. Estas se obtuvieron a partir de muestras de campo de maíz y piensos destinados a producción animal, las cuales fueron analizadas a través de las metodologías analíticas implementadas. Se analizaron un total de 36 muestras de diferentes orígenes, que fueron registradas en el Laboratorio de Química e Inocuidad Alimentaria, QAA.

#### **6.1.2 Análisis de las muestras**

Para los análisis de HPLC, se considerarán los resultados positivos obtenidos mediante la técnica ELISA, en caso de no encontrar resultados positivos se consideraron 10 muestras las cuales presenten el mayor valor de absorbancia. Además, se evaluarán muestras blanco y fortificadas con aflatoxinas B1 (Supelco, EE. UU) a diferentes concentraciones: 0, 2, 5, 10 y 20 ng/g, en ensayos por duplicado (6.2.4).

#### **6.1.3 La aplicación de la Metodología Analítica por ELISA**

Para la identificación de aflatoxinas en muestras de maíz y alimentos de uso animal se utilizó el método screening ELISA. La base del método requiere el uso de antígenos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad enzimática. El

protocolo de procedimiento analítico utilizado fue el kit comercial (BIOO SCIENTIFIC, Perkin Elmer, EE. UU), el cual es un inmunoensayo – enzimático competitivo para análisis cuantitativo de Aflatoxinas B1, B2, M1, G1. Este método se caracteriza por tener una alta sensibilidad de 0,02 ng/g y un límite de detección para pienso de 0,8 ng/g. El Kit además entrega la posibilidad de establecer un punto de corte, para definir entre resultados conformes y no conformes, el cual se estableció a partir de 5 ng/g valor que está bajo los niveles de regulación conocidos para estas matrices (Directiva 2003/100/CE).

#### **6.1.4 Protocolo de Análisis ELISA**

Primero se pesaron 5 g de las muestras, en seguida se adicionaron 25 ml de Metanol 70 % y se agitó manualmente durante 3 minutos, posterior a eso se agitó en un multi-vórtex durante 10 minutos. En seguida se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 4000 rpm con una temperatura entre (20-25°C/68 -77 °F).

Posterior a la centrifugación se diluyeron 300 µL del sobrenadante y en seguida se le agregaron 900 µl de la Solución C y se agitaron las muestras en vortex por 1 minuto.

Para determinar la concentración de Aflatoxinas B1 se realizó una curva de calibración añadiendo 50 µl de diferentes patrones 0,00; 0,02; 0,06; 0,2; 0,6; 1,5 ng/ml colocada en ordenada de menor a mayores concentraciones de forma duplicada en diferentes pocillos. En seguida se fortificó en matriz de 20 ng/g utilizando el valor de referencia de Unión Europea cumpliendo con el control de calidad interno del laboratorio.

En seguida, se agregaron 50 µl de cada muestra en duplicado en diferentes pocillos. A continuación, se añadieron 100µl de conjugado (Aflatoxinas B1-HRP) y se mezcló suavemente balaceando la placa manualmente por 1 minuto, en seguida se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25) °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se vació la solución y se lavó la placa añadiendo 250 ml de la solución de lavado 1 por cada pocillo, se sacudió la placa durante 10 segundos y se vació la solución. Luego, se secó la placa con papel asegurando su sequedad.

Inmediatamente, se agregaron 100µl de substrato (TMB), mezclando la solución y agitando suavemente la placa de forma manual durante 1 minuto, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y por último se agregó la solución stop conocida por solución Buffer (Anexo N°1).

Por último, la lectura fue efectuada por un equipo Espectrofotómetro de marca Biotek Modelo EL\*800 con un nivel de absorbancia de 450 nm. Los resultados obtenidos fueron registrados mediante un programa de Excel BiooMax Signal de ELISA entregado por el fabricante.

En el ensayo ELISA se analizaron de forma simultánea los controles de la curva de calibración/duplicados, fortificados y las muestras, la posición de cada muestra en el pocillo del ensayo (96 pocillos), se describen en la Figura N° 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Std1	Std1	M1	M1	M9	M9	M17	M17	M25	M25	M33	M33
<b>B</b>	Std2	Std2	M2	M2	M10	M10	M18	M18	M26	M26	M34	M34
<b>C</b>	Std3	Std3	M3	M3	M11	M11	M19	M19	M27	M27	M35	M35
<b>D</b>	Std4	Std4	M4	M4	M12	M12	M20	M20	M28	M28	M36	M36
<b>E</b>	Std5	Std5	M5	M5	M13	M13	M21	M21	M29	M29		
<b>F</b>	Std6	Std6	M6	M6	M14	M14	M22	M22	M30	M30		
<b>G</b>	F1	F2	M7	M7	M15	M15	M23	M23	M31	M31		
<b>H</b>	F1	F2	M8	M8	M16	M16	M24	M24	M32	M32		

**Figura N°1:**Esquema de posición de las muestras y controles en la placa ELISA de ensayo.

a) color rojo /estándares, b) color verde /fortificados de muestra blancos a 20 ng/g, c) color azul /muestras analizadas.

## **6.2 Aplicación una metodología analítica confirmatoria por HPLC-Fluorescencia para la cuantificación de AFB1 en piensos.**

### **6.2.1 Aplicación de la Metodología Analítica por HPLC-Fluorescencia**

Para realizar una detección confirmatoria de aflatoxinas B1, se ocupó la Cromatografía Líquida de Alta Presión utilizada por el Laboratorio de QAA-SAG, en su instructivo para la detección de micotoxinas, tomada desde la referencia de Aflatest Instruction Manual-VICAM (1987).

### **6.2.2 Protocolo de análisis de aflatoxinas por HPLC-Fluorescencia**

Se pesaron 25 g de pienso y 50 g de muestras de maíz molidas y se adicionaron de 5 g de cloruro de sodio, para posteriormente añadir 125 ml de la mezcla de metanol /agua en las proporciones 80/20. Luego, se agitó en la licuadora durante 3 min, para posteriormente ser filtradas a través de papel de fibra de vidrio y recibidas en una probeta de 50 ml. A continuación, se tomaron 20 ml del filtrado y se agregaron 20 ml agua destilada. Consecutivamente, se pasaron por la columna de afinidad (Vicam) en la jeringa, y se hicieron pasar 10 ml del filtrado a través de la columna, con un flujo de 2 gotas por segundo. Se lavó la columna 2 veces con 10 ml de agua cada vez y se eluyeron con 1 ml de metanol HPLC con un flujo de 2 gotas por segundo, colectando y eluido en un tubo eppendorf de 2 ml.

Posteriormente, se secaron bajo suave flujo de nitrógeno y se realizó la derivatización de las muestras, para lo cual, se disolvió el residuo en 400 µl de n-hexano HPLC, agitando y vorteando por un minuto, y por último se agregaron 400 µl de ácido trifluoracetico (TFA) como derivatizante, para luego agitar por un minuto y calentar por 10 min en baño de agua a 40°C.

Finalmente, se evaporó bajo suave flujo de nitrógeno, disolviendo en 1000 µl de solución metanol-agua 50/50, agitando por 10 minutos, posterior se sónico por 3 minutos para su disposición en viales ámbar y su posterior análisis cromatógrafo (Anexo N°2). La entrega de los viales al equipo de HPLC-Fl se ve acompañado por una hoja de trabajo (Anexo N°5)

### 6.2.3 Reactivos y Soluciones

Para la cuantificación de Aflatoxinas en muestras de granos se utilizaron los siguientes reactivos y solventes: Hexano (grado analítico o HPLC), benceno HPLC, metanol HPLC, cloruro de sodio p.a, ácido trifluoracético (TFA), acetonitrilo HPLC y nitrógeno gaseoso.

La preparación de las soluciones fueron las siguientes:

- Metanol/agua 80/20: se midieron 80 ml de metanol p.a y se agregaron 20 ml de agua destilada.
- Solución Metanol/Agua 50/50: se midieron 50 ml de metanol y se agregaron 50 ml de agua destilada.
- Solución de Acetonitrilo/Agua/Metanol 30/60/10: se midieron 300 ml de acetonitrilo y se agregaron 600 ml de agua destilada y 100 ml de metanol.

### 6.2.4 Preparación de Estándares de Aflatoxinas

Para la preparación del estándar de Aflatoxinas de marca Supelco, se utilizó una ampolla Mixta de 1 ml que contiene una concentración de AFB1 de 1000 ng/ml con una pureza del 99%.

- **Solución Mixta**: Se tomó 1ml de la ampolla de la solución mixta certificada de Aflatoxina total y se llevó a volumen de 10 ml con Benceno - Acetonitrilo (98:2)

La curva de calibración: Se tomaron alícuotas crecientes de la solución Mixta N°1 (Anexo N°3) y (Anexo N° 4) según los ramos de concentraciones requeridas, evaporando a sequedad bajo corriente de nitrógeno y siguiendo los pasos para la derivatización (Anexo N°2) a partir del punto 9.

### **6.2.5 Análisis Instrumental**

Para el análisis instrumental de las muestras se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Resolución de la marca Agilent, modelo Agilent 1200, equipado por la bomba cuaternaria, Autosampler, de alta sensibilidad que nos brindó respuestas rápidas del analito en estudio. El Software utilizado es Agilent Chem Station, con el detector de fluorescencia excitación 360 nm y emisión 450 nm. Para mantener las mejores condiciones cromatográficas se mantuvo un flujo de fase móvil de 0.4 ml/min. La columna utilizada para fase de separación fue la columna de fase inversa C-18 250× 4.6 mm, 5µm tamaño de partícula y la pre columna C18 4× 3.5 mm. Como fase móvil se utilizó una solución: Acetonitrilo- metanol-agua en las proporciones de (30:10:60) respectivamente, con un volumen de inyección de 50 µl.

### **6.3 Propuesta de un diseño piloto para evaluar la incidencia de aflatoxinas B1 en piensos destinados a producción aviar en la provincia de Huambo, utilizando las metodologías analíticas implementadas.**

#### **6.3.1 Diseño de la propuesta.**

Para la implementación de este diseño, se consideraron los puntos que se indican a continuación, tomándose como referencia al Proyecto de Resolución de Contaminantes en Alimentos para Animales del SAG (2017) y el Programa Oficial de Control de Residuos de Productos Pecuarios del SAG (2016):

- Presencia de un laboratorio de análisis con capacidades analíticas para la implementación y validación de las técnicas antes descritas, estableciendo sistemas de control de calidad analítico para los ensayos que aseguren la confiabilidad de los resultados. Este laboratorio de Veterinaria es una estructura acoplada al Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV), localizada la provincia de Huambo, considerando que el Laboratorio Central de Veterinaria del Ministerio de la Agricultura de Angola cuenta con el equipamiento para estos análisis.

- Se contará con las revisiones de las normas de Aflatoxinas en piensos de la Unión Europea, como referencia para establecer los valores aceptables.
- Implementación de un plan de muestreo, en planteles avícolas y fábricas de formulación de consumo animal, de acuerdo al catastro en la provincia de Huambo. De acuerdo a la información anterior y a las capacidades analíticas del laboratorio se consideró tomar tres muestras por cada plantel de producción y tres muestras en cada fábrica de formulación, bajo un protocolo de muestreo, lo cual se replicará en una segunda temporada, considerando dos temporadas de muestreo por año.
- Con los resultados obtenidos, y de haber resultados positivos, se evaluarán los puntos críticos que pueden estar relacionados con generación de aflatoxinas, realizando de ser posible, la trazabilidad de las muestras positivas. Asimismo, se expondrá a las autoridades competentes los resultados de este programa piloto para sensibilizar, mejorar y ampliar la cobertura de muestra para una segunda etapa.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aplicación de metodología analítica screening (ELISA) para la detección de AFB1 en piensos destinados a producción animal.

Se analizaron 36 muestras totales, siendo 32 muestras de piensos y 4 de maíz (granos secos) para alimento animal, de diferentes categorías, procedente de distintas regiones de Chile. Posteriormente la lectura fue realizada por un equipo espectrofotómetro (Biotek/ modelo EL\*800), a longitud de onda de 450 nm, emitiendo los siguientes resultados ver la Tabla N°1.

**Tabla N° 1:** Resultados obtenidos por ensayo ELISA de las 36 muestras analizadas, versus el punto de corte de 5 ng/g.

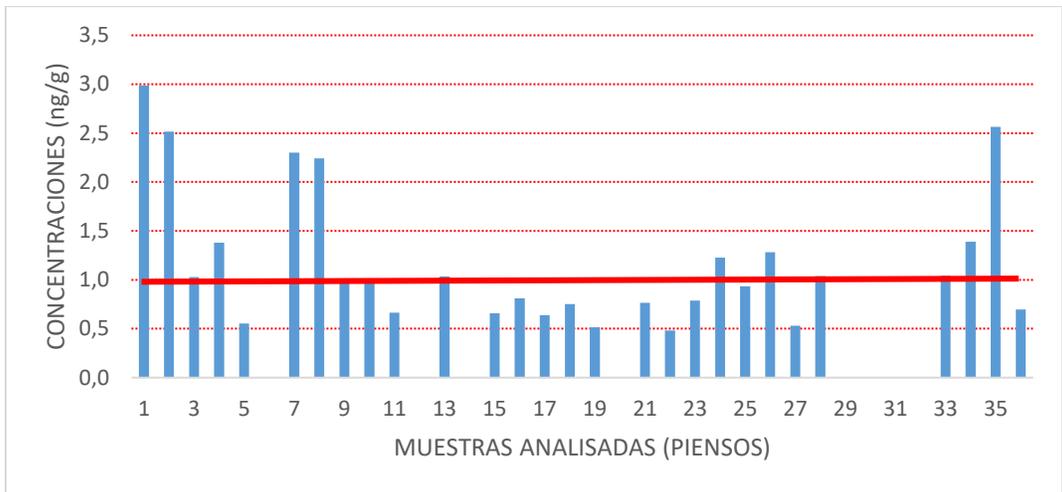
Muestras N°	*Absorbancia Promedio obtenido a 450nm (D.O)	Concentraciones (ng/g)	Resultados Mayor/Menor al 5 ng/g
F1	0.285	13.606	>
F2	0.247	17.224	>
1	0.528	2.987	<
2	0.555	2.514	<
3	0.698	1.030	<
4	0.651	1.381	<
5	0.798	0.554	<
6	0.970	0.000	<
7	0.569	2.302	<
8	0.574	2.243	<
9	0.702	1.010	<
10	0.704	0.995	<
11	0.769	0.663	<
12	0.935	0.000	<
13	0.698	1.035	<
14	0.985	0.000	<
15	0.770	0.659	<

16	0.737	0.811	<
17	0.775	0.637	<
18	0.748	0.753	<
19	0.810	0.515	<
20	0.873	0.000	<
21	0.746	0.764	<
22	0.820	0.482	<
23	0.741	0.787	<
24	0.670	1.227	<
25	0.714	0.935	<
26	0.663	1.283	<
27	0.804	0.532	<
28	0.697	1.039	<
29	1.198	0.000	<
30	0.899	0.000	<
31	0.933	0.000	<
32	0.910	0.000	<
33	0.696	1.043	<
34	0.650	1.389	<
35	0.552	2.564	<
36	0.761	0.698	<

- Menor: resultado bajo el valor del nivel de corte de 5 ng/g
- Mayor: resultado sobre el valor de corte de 5 ng/g.
- F1 y F2: muestras control fortificadas a 20 ng/g.

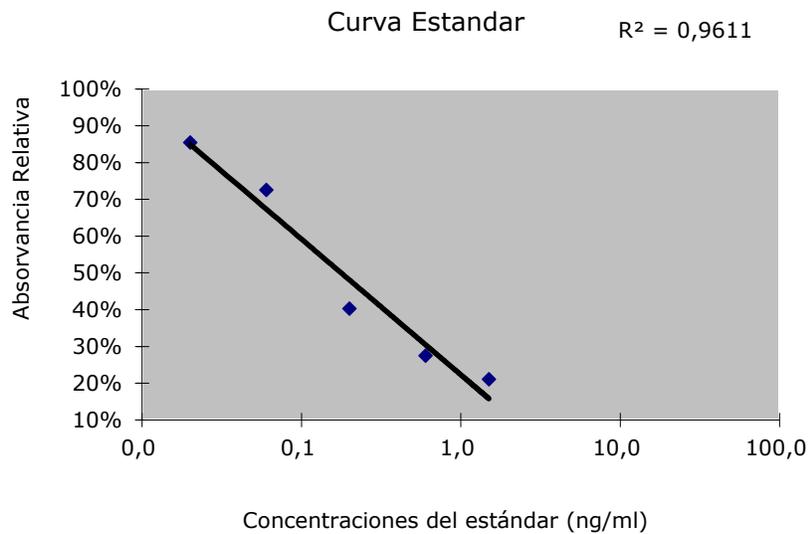
\* El parámetro de absorbancia promedio, no es más que una porción de luz que incide y logra atravesar una muestra, manteniendo una longitud de onda determinada (D.O).

A partir de los resultados de la tabla N° 1, se seleccionaron 10 muestras para análisis por HPLC, las cuales correspondieron a aquellas muestras cuya concentración fue mayor que 1.00 ng/g (Figura N° 2).



**Figura N°2:** Concentraciones (ng/g) obtenidas a través del método ELISA, de las muestras analizadas (piensos) sobre el nivel de 1.00 (ng/g).

Como control de calidad del ensayo ELISA, se evaluó una curva de calibración con estándares a seis concentraciones diferentes, una curva lineal nos dice que hay una relación entre la concentración del estándar y la señal obtenida, luego el kit es apropiado para el propósito (Figura N° 3).



**Figura N°3:** Curva de calibración, que relaciona la concentración del estándar con la absorbancia relativa.

El cálculo de las concentraciones de Aflatoxina, fueron realizados mediante un programa de cálculo entregado por el fabricante, que incluye una curva con estándares de aflatoxinas B1, donde relaciona la absorbancia relativa de cada estándar y su concentración en ng/ml,

generando una curva que relaciona ambos parámetros. La curva de calibración del estándar dio un 96% de coeficiente de determinación, explicando que hay una correlación entre las variables de ambos ejes, y que estos se ajustan donde la absorbancia relativa depende de las concentraciones estándares (Figura N° 3).

Los ensayos de fortificados a 20 ng/g (ELISA), realizados en duplicado dieron un promedio de 75% de recuperación entre los ensayos (Tabla N° 1).

## 7.2 Aplicación de una metodología analítica confirmatoria por HPLC-Fluorescencia para la cuantificación de AFB1 en piensos.

Para este ensayo se realizaron dos procesos de control, una curva con estándares de AFB1 para determinar la respuesta del equipo, detectar a esta sustancia y evaluar la correlación entre la respuesta del estándar (área obtenida) v/s concentración de la aflatoxinas (Figura N°4), las concentraciones del estándar y áreas obtenidas, se resumen en la tabla N° 2.

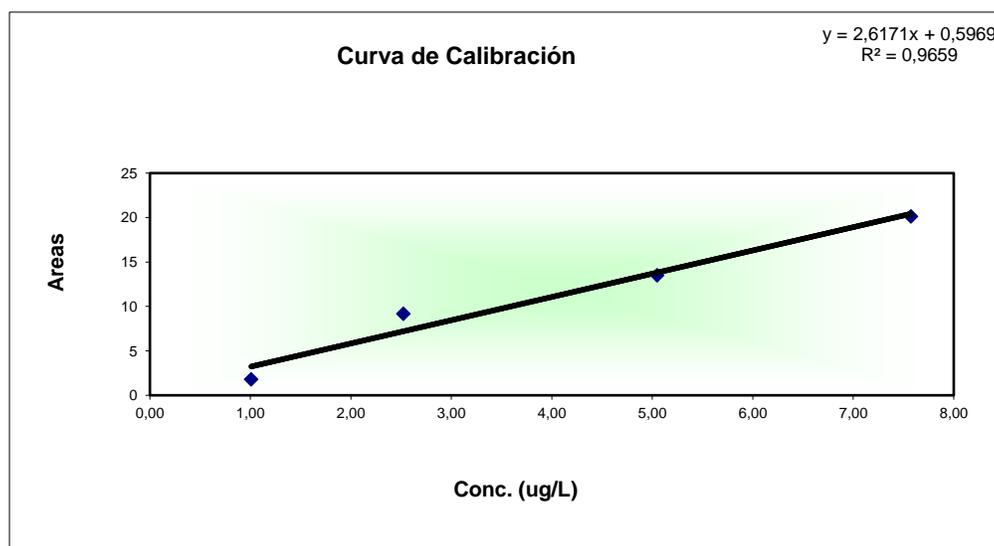


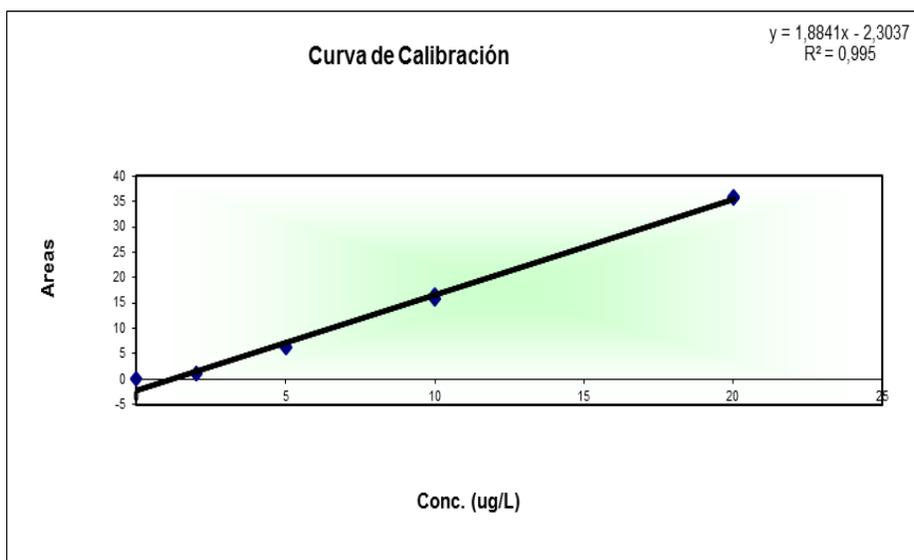
Figura N°4: Curva de concentración de estándar de AFB1 versus señal ( área obtenida).

Tabla N° 2: Relación entre área obtenida y concentración del estándar de AFB1.

Curva de Calibración AFB1	Concentraciones (ng/ml)	Área (AU)
Std 1	1	3.15
Std 2	2,5	7.19
Std 3	5	16.08
Std 4	7,5	23.80

Coefficiente de correlación  $R^2$ : 0,9659      Pendiente m: 2,617      Intercepción I: 0,60

Posteriormente, se realizó una curva de concentración de estándar aflatoxina B1 en matriz, utilizando una muestra blanco de control y cuatro muestras fortificadas a diferentes concentraciones desde 2 a 20 ng/g. Estos ensayos se realizaron por duplicado donde los resultados en función del área obtenida de la señal, mostraron la precisión entre muestras duplicadas y la linealidad de la respuesta (Figura N° 5, Tabla N° 3), lo que sugiere que el método puede ser utilizado en para el propósito previsto.



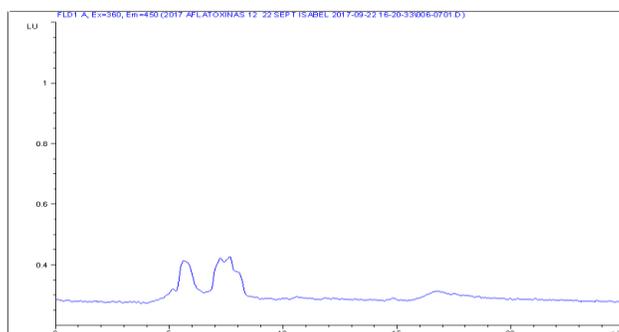
**Figura N° 5:** Curva de concentración de estándar de AFB1 en matriz, versus señal (área obtenida).

**Tabla N° 3:** Relación entre área obtenida y concentración del estándar AFB1 en matriz.

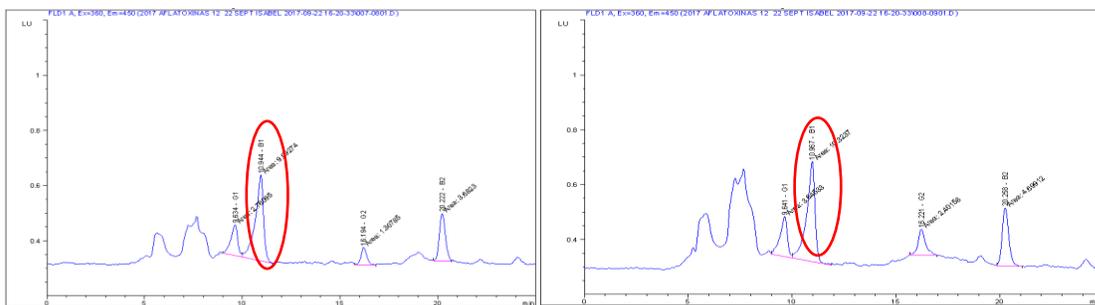
Vial de Inyección en (duplicado)	Concentración (ng/g) de AFB1	Área (AU)
Blanco matriz	0	0
	0	0
Fortificado 1	2	1,00
	2	1,15
Fortificado 2	5	6,30
	5	6,34
Fortificado 3	10	15,77
	10	16,49
Fortificado 4	20	35,62
	20	36,02

Considerando los resultados de las curvas de estándar puro y de fortificados en matriz, que nos demuestran que el método puede ser utilizado en el análisis de AFB1, se procedió al análisis de las 10 muestras seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en el ensayo ELISA (Figura N° 2). Este procedimiento incluyó un control blanco (matriz sin fortificar) (Figura N° 6), y dos muestras (duplicados) de la misma matriz fortificada con AFB1 a una concentración de 5 ng/g (ppb) cada una (Figuras N° 7). Los parámetros cromatógrafos de ambos fortificados, se muestran en la Tabla N° 4.

Los tiempos de retención (Tr), obtenidos para las aflatoxinas al inicio de los ensayos con HPLC, y determinados con inyecciones de estándares individuales, fueron: AFB1 10,9 min; AFB2 20 min; AFG1 9,6 min y AFG2 16,2 min.



**Figura N° 6:** Cromatograma de pienso sin fortificar (blanco matriz).



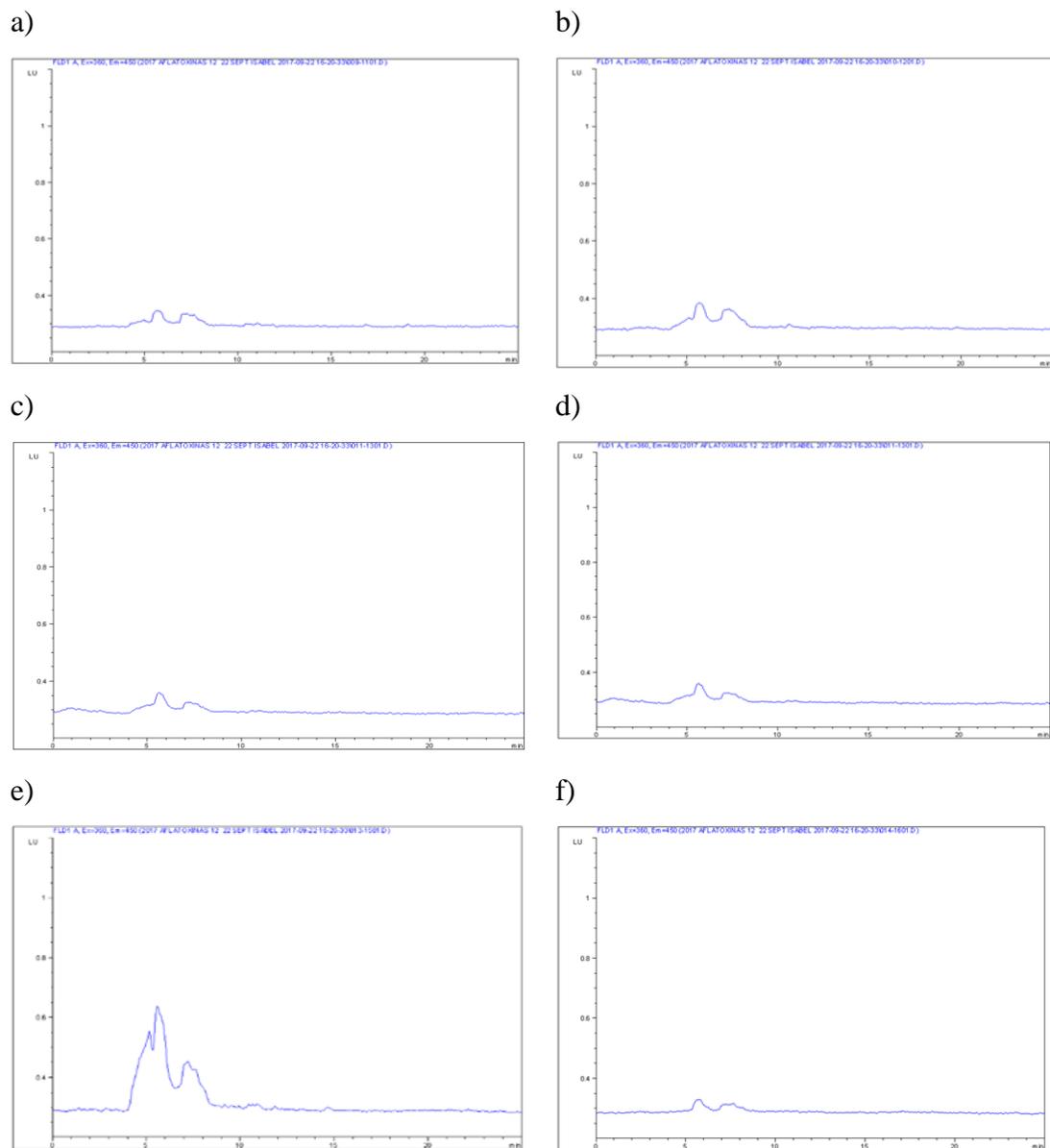
**Figura N° 7:** Cromatogramas de muestras (duplicados) de pienso fortificadas a 5 ng/g. el círculo rojo corresponde a señal de AFB1 Tr.10,9 min.

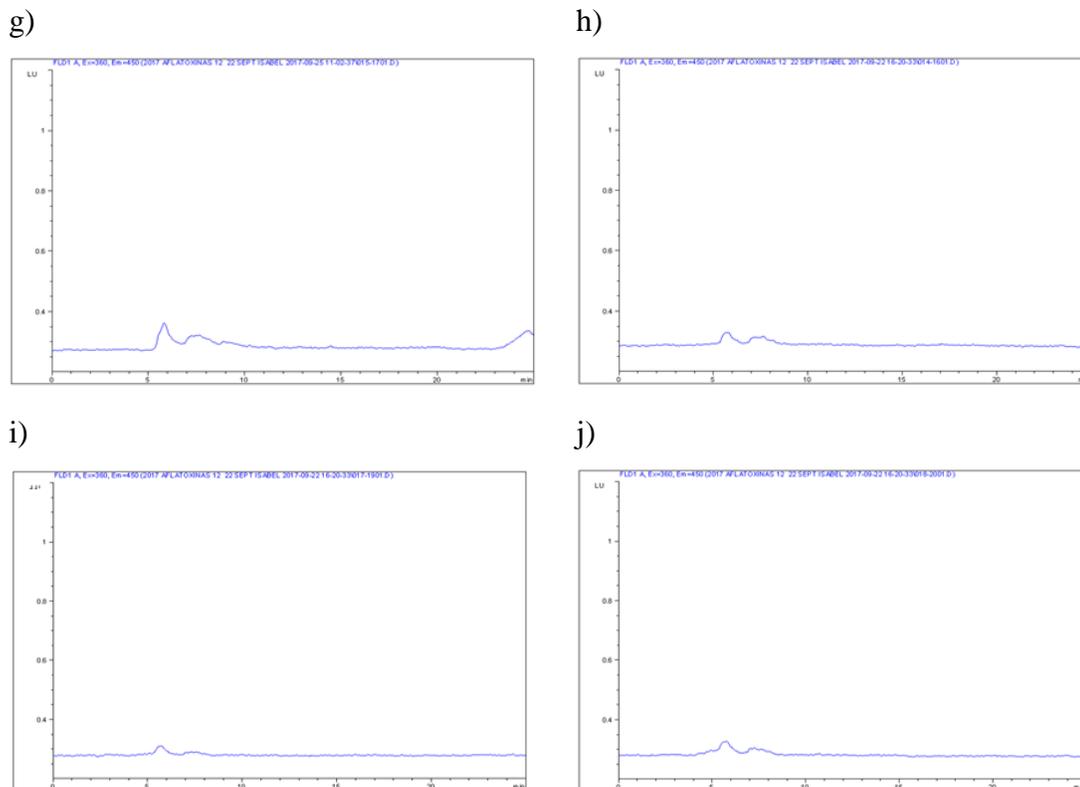
**Tabla N° 4:** Parámetros de las muestras de pienso fortificadas con AFB1 a 5 ng/g.

Compuesto	Tiempo retención (min)	Área (AU)	Concentración (ng/g)
(a) Aflatoxina G1	9,6	3,14	5
(b) Aflatoxina G1	9,6	3,64	
(a) Aflatoxina B1	10,9	9.42	5
(b) Aflatoxina B1	10,9	10,32	
(a) Aflatoxina G2	16,2	1.46	5
(b) Aflatoxina G2	16,2	2,96	
(a) Aflatoxina B2	20,2	3,68	5
(b) Aflatoxina B2	20,3	4,69	

(a) muestra fortificada 1, (b) muestra fortificada 2.

Los cromatogramas de las 10 muestras analizadas de los piensos seleccionados se observan en la Figura N° 8.





**Figura N° 8:** Cromatogramas obtenidos de las 10 muestras de piensos analizadas: a) muestra 252, b) muestra 253; c) muestra 255; d) muestra 318; e) muestra 319; f) muestra 658; g) muestra 574; h) muestra 656; i) muestra 659; j) muestra 706.

### 7.3 Propuesta de un diseño piloto para evaluar la incidencia de Aflatoxinas B1 en piensos destinados a producción aviar en la provincia de Huambo, utilizando las metodologías analíticas implementadas.

De acuerdo a los antecedentes presentados en este trabajo, y considerando la importancia de evaluar la incidencia de aflatoxinas B1 en alimentos destinado a la producción aviar, se propone un plan piloto para realizar un programa de monitoreo en granjas de producción de aves en la provincia de Huambo, Angola.

Este programa contempla, los siguientes aspectos:

**Objetivos:** Evaluar Aflatoxinas en piensos destinados a producción aviar.

- Alcance:**
- a) Planteles avícolas de producción de huevos y de aves para consumo (7 granjas).
  - b) Fábricas de formulación y distribución de alimentos para aves (2 fábricas).

**Laboratorios de análisis:** Implementar y validar en laboratorio central del Huambo del IIV, las capacidades analíticas (screening ELISA y confirmatoria HPLC- fluorescencia) para realizar análisis de aflatoxinas en piensos.

**Plan de muestreo:** Diseño de un programa de muestreo de acuerdo a las capacidades analíticas disponible en el laboratorio, este programa se llevará a cabo con inspectores oficiales del IIV considerando el 100% de las granjas registradas (7) y 100% de las fabricas (2) ver (Figura N° 9).



**Figura N° 9:** Mapa de la Provincia de Huambo (Angola) y las zonas de muestreos (planteles y fábricas).

Se considera recolectar muestras de maíz y alimentos procesados para la producción aviar, al inicio de las temporadas de calor iniciando en el mes de septiembre siendo el segundo muestreo al final la estación de calor e inicio de la estación de frio iniciando el mes de mayo, por último, al final de agosto finalizando la época de frio. El objetivo es evaluar la incidencia temporal de la presencia o no de aflatoxinas. En cada temporada se recolectarán 27 muestras,

de las cuales 21 muestras serán de los plantares avícolas y 6 de las fábricas de alimentos teniendo en cuenta los tipos de alimentos por categorías animales.

Para que el método sea optimizado se pretende programar la toma de muestras en una semana, para su posterior análisis de todas ellas en la semana siguiente.

**Diseño protocolo de muestreo, registro y conservación de muestras:** Se diseñará un protocolo de muestreo para los inspectores encargados de la toma de muestras, y los procedimientos relacionados con su manipulación y conservación.

**Actividades:**

1.- Exponer propuesta a plan piloto de monitoreo de aflatoxinas a autoridades competentes del IIV y responsables de granjas y plantas de formulación y distribución de alimentos para aves.

2.- Desarrollo y validación de la técnica HPLC-Fluorescencia en laboratorio central de Huambo. La técnica será implementada y validada de acuerdo al protocolo de validación (QAA/I-130/03), del laboratorio de Química e Inocuidad Alimentaria. Este protocolo contempla los siguientes aspectos:

a)	Objetivo y el alcance de la validación
b)	Nombres de los responsables de la validación
c)	Descripción del método
d)	Descripción de los equipos y/o Instrumentos, materiales, reactivos, soluciones y estándares analíticos utilizados.
e)	Descripción detallada de cada prueba experimental que se llevará durante la validación.
f)	Parámetros a evaluar; - Selectividad - Rango de trabajo (linealidad) - Exactitud - Precisión - Porcentaje recuperación

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Límite de detección (LD)</li> <li>- Límite de cuantificación (LC/LQ)</li> <li>- Robustez</li> </ul>
g)	<p>Descripción detallada de cómo se realizan cálculos, reporte y revisión de los resultados</p> <p>Criterios de aceptación para cada parámetro de desempeño que se evaluar.</p>
h)	<p>Procedimientos de control de calidad que aseguren la confiabilidad de los resultados.</p>

Al finalizar la validación se emitirá un informe de validación para el reportar el resultados y conclusiones.

3.- Capacitación y transferencia de conocimientos técnicos a analistas y técnicos del laboratorio de Huambo en preparación, procesamiento y análisis de muestras (ELISA – HPLC) para aflatoxinas en piensos.

4.- Capacitación a inspectores del IIV en toma de muestras, transporte y conservación.

5.- Elaboración plan de muestreo:

- Fechas de muestreo:
- N° muestras x granja identificada
- N° muestras/cantidad x planta formuladora- distribución identificada
- Codificación muestras
- Cantidad de muestra y contra muestra
- Identificación de muestreadores (inspectores IIV)
- Registro ingreso laboratorio

6.- Emisión, interpretación y presentación resultados.

## DISCUSIÓN

La toxicidad y la potencia de las aflatoxinas las convierten en un peligro para la salud, siendo responsables de pérdidas asociadas con la contaminación de alimentos y alimentos procesados. La determinación de su concentración en alimentos es, por lo tanto, muy importante. Sin embargo, debido a su baja concentración en alimentos y piensos, los métodos analíticos para la detección y cuantificación de aflatoxinas deben ser específicos, sensibles y sencillos (Wacoo *et al.*, 2014).

### **Aplicación de metodología analítica screening (ELISA) para la detección de AFB1 en piensos destinados a producción animal.**

El método de ELISA es un método ampliamente utilizado por su alta sensibilidad, simpleza, especificidad y rapidez (Bryden, 2012), utilizándose en diagnósticos clínicos tanto en humanos como en animales y vegetales. Muchos laboratorios usan esta técnica como un primer ensayo screening en detección de micotoxinas, puesto que permite realizar análisis de un amplio espectro de matrices como, orina, tejidos animales, alimentos y drogas veterinarias.

En este trabajo, se utilizaron kits ELISA competitivo, definida como una técnica directa, puesto que se busca el antígeno Aflatoxina B1 presente en las muestras en análisis. Para nuestro ensayo, se definió el punto de corte a 5 ng/g, permitiendo la existencia de una gran sensibilidad de la señal del analito de interés en la matriz, lo que concuerda con estudios realizados previamente en matrices alimentarias (Leszczynska *et al.*, 2001; Hyunh *et al.*, 2012), siendo las señales muy diversas, ya que las muestras correspondieron a alimentos destinados a producción animal (pienso), lo cual genera un efecto matriz, donde los componentes de las muestras pueden interferir con los resultados, arrojando valores más altos o más bajos de lo esperado (Hyunh *et al.*, 2012).

Por lo anterior, este punto de corte, que es superior a la sensibilidad de 0,02 ng/g (ppb) del kit (sensibilidad al estándar puro Aflatoxina B1), permite contrarrestar los efectos de supresión e interferencias de la matriz, evitando generación de resultados falsos positivos y/o negativos, como también, minimizar la reactividad cruzada con otras Aflatoxinas que pudieran estar presentes ocasionando problemas de interferencia. Igualmente, y considerando

que las regulaciones para estas matrices son de orden de 20 ng/g, el valor asignado está en un margen aceptable de análisis de acuerdo a la Directiva 2003/100/CE.

La curva de calibración del kit, con estándares de Aflatoxinas B1, presento una buena correlación lineal entre la señal y la concentración del analito, donde se relaciona la absorbancia relativa de cada estándar y su concentración en ng/ml, generando una curva que relaciona ambos parámetros. La curva de calibración del estándar dio un 96% de coeficiente de determinación, explicando que hay una correlación entre las variables de ambos ejes, y que estos se ajustan donde la absorbancia relativa depende de la concentración estándar, valor aceptable comparando por curva estándar entregado por el certificado control de calidad.

La eficiencia realizada en duplicado dio un promedio de 75% de recuperación, siendo este un valor aceptable bajo el criterio de aceptación, a pesar de que el proceso de extracción del método de ELISA presenta uso limitado de solvente orgánicos (Anexo N°1).

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el método de ELISA, se demuestra que este método presenta gran sensibilidad y selectividad al igual que lo descrito por Leszczynska *et al.*, 2001, arrojando resultados bajo el límite de corte establecido de 5 ng/g. En contraste, con el estudio realizado por Kang'ethe y Lang'a, (2009), en el cual los piensos evaluados a partir de agricultores, productores y minoristas de centros urbanos productores de Kenya, excedieron el límite de 5ng/g para Aflatoxina B1.

### **Aplicación una metodología analítica confirmatoria por HPLC-Fluorescencia para la cuantificación de AFB1 en piensos**

Para estos ensayos se seleccionaron 10 muestras que corresponden a los valores más altos detectados por el ensayo ELISA.

Se realizaron dos curvas control, donde se evaluó la respuesta instrumental frente al analito de interés, estimando el intervalo por la cual se deberían cuantificar las muestras.

La curva de fortificado en matriz (Figura N°5), donde también se demuestra que hay una proporcionalidad entre la señal y la concentración definida para cada muestra, reconfirmando que el método es funcional, y entregando un rango lineal detectable a las concentraciones más bajas de 2 ng/g hasta la concentración mayor de 20 ng/g. Las concentraciones fueron

definidas para la curva matriz incluyendo la muestra blanca, siendo un punto de curva a la concentración de 0 ng/g.

Por otro lado, la curva de estándares puros (Figura N°4), evidencio una correlación lineal entre la concentración del estándar y la señal instrumental, con una pendiente de 26,6% por lo que el equipo y las condiciones establecidas en él, permitieron obtener una buena sensibilidad para la detección de estas sustancias. Sin embargo, comparando las señales de ambas curvas, se evidencia un claro efecto matriz a niveles de 5 ng/g, entre la curva de fortificado y la curva de estándar puro, efecto que genera una supresión de señal de un 50% aproximado, causado por pérdidas asociadas a los procesos de extracción, como también posible supresión por efecto matriz.

El cromatograma de control blanco, no evidencio señales en los tiempos de retención de las aflatoxinas, por lo que se descartan efectos de interferencia de señal. Igualmente, considerando ambos ensayos de fortificados a 5 ng/g (ppb), se evidencio la reproducibilidad del método y precisión de los resultados obtenidos, en función del área.

Los resultados para las 10 muestras de ensayo (figuras N°8 de a, b, c, d, e, f, g, h, i, j) no evidenciaron señales, en los tiempos de retención a diferencia del método de ELISA, el cual presenta mayor sensibilidad que el método HPLC, cuyo límite de detección es cercano a 3 ng/g. Sin embargo, este método es recomendable para la detección rápida y con mayor precisión de AFB1 en muestras de piensos (Han *et al.*, 2006). A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, Khayoon *et al.*, (2010), describen una alta presencia de aflatoxinas en ocho (n=42) de las muestras de piensos analizadas, con un rango entre 6.51 a 101 ng/g.

### **Propuesta de un diseño piloto para evaluar la incidencia de Aflatoxinas B1 en piensos destinados a producción aviar en la provincia de Huambo, utilizando las metodologías analíticas implementadas.**

Por otra parte, la evidencia científica ha demostrado que existe la necesidad de prevenir y controlar la aparición de hongos y la producción de sus metabolitos secundarios (micotoxinas), especialmente en el continente africano, donde se presentan las condiciones climáticas favorables para su producción (Babu y Muriana, 2014), con la finalidad de obtener alimentos inocuos para proteger la salud de las personas y animales, así como minimizar las

pérdidas comerciales en la industria de alimentos y piensos. Para esto es necesario, contar con métodos rápidos y confiables para la detección y cuantificación de las aflatoxinas. De acuerdo a lo anterior, resulta necesario desarrollar y establecer programas de monitoreo permanente de estas micotoxinas, que permitan mejorar y asegurar alimentos más sanos e inocuos para la población y también para los animales de granja.

El diseño de muestreo presentado en esta memoria de tesis, contempla la posibilidad de cubrir esta necesidad, enfocando el monitoreo de aflatoxinas a planteles avícolas de producción de huevos y de aves para consumo, además de las fábricas de formulación y distribución de alimentos para aves. Sin embargo, no incluye dentro de este programa el monitoreo en planteles rurales no regulados, los cuales presentan una alta producción de maíz para consumo animal y humano, lo cual podría ser considerado en el futuro.

La importancia de las aflatoxinas, queda expresada en el trabajo de Domingos (2011), quien, analizó 60 muestras de maíz, provenientes de mercados informales rurales y no regulados, en los alrededores de Luanda, Angola, aislándose una incidencia de aflatoxinas entre 18% y 81,7% por TLC y HPLC respectivamente, con concentraciones de 0,4-425,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Un estudio futuro, podría incluir a las aflatoxinas como parte de un diseño de monitoreo en sectores rurales de producción y uso de maíz para alimento animal.

## CONCLUSIONES

- De acuerdo a la literatura, las micotoxinas y en especial las aflatoxinas, son descritas como sustancias altamente tóxicas, que pueden afectar de forma crónica o aguda la salud de animales y las personas.
- Las condiciones ambientales y de almacenamientos de alimentos juegan un papel importante en la mantención de la calidad e inocuidad de alimentos susceptibles a contaminación por hongos toxicogénicos, en especial la temperatura y humedad.
- Las técnicas instrumentales ELISA y HPLC, se han descrito ser altamente efectiva en la determinación y cuantificación de aflatoxinas en alimentos.
- Los resultados de las muestras de alimentos analizadas por métodos ELISA resultaron todas bajo el nivel de control o corte de 5 ng/g, los ensayos de control, como la curva de calibración de estándares, así como el control de fortificados dieron las respuestas esperadas para el kit de ensayo, lo que, valida los resultados de las muestras, de igual modo los ensayos duplicados de cada muestra fueron concordantes entre si tanto para los controles como para las muestras ensayadas.
- De acuerdo a los niveles de regulación tanto para la UE, como la propuesta en Chile en su regulación, las 36 muestras ensayadas mediante método ELISA cumple con las regulaciones mencionadas y serian aptas para el consumo animal.
- Los resultados de los análisis HPLC- fluorescencia, en las 10 muestras analizadas, fueron concordantes con los resultados obtenidos por el método ELISA, siendo todas “no detectado”, a un nivel de 3 ng/g como límite de detección.
- Los controles aplicados en los análisis por HPLC como: curvas de control de fortificados, muestras blancas y fortificado de control, los resultados fueron concordante con lo esperado, lo que validan los resultados de las 10 muestras ensayadas.

- De acuerdo la experiencia y capacidad analítica desarrollada aprendida, estos métodos pueden ser replicados en el IIV de Huambo, para lo cual se requiere en el caso de HPLC la validación previa del método. Para el caso de ELISA, los ensayos control, como curva de estándares y fortificado control, son la información que permiten la validación del kit para el ensayo.
  
- En consideración del objetivo tres, con la experiencia analítica aprendida en este trabajo de tesis, y considerando la experiencia en Chile, y el conocimiento de regulaciones para las matrices de alimentos de animal, es posible el desarrollo de este objetivo en las condiciones actuales del laboratorio del IIV en Huambo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ALARCON, J.** 2013. Diseño e Implementación de la Estrategia para un Programa de Control de Contaminantes en Alimentos para uso Animal. {diapositivas}. Santiago. Chile. Servicio Agrícola y Ganadero.

**BABU, D.; MURIANA, P.** 2014. Sensitive quantification of aflatoxin B1 in animal feeds, corn feed grain, and yellow corn meal using immunomagnetic bead-based recovery and real-time immunoquantitative-PCR. *Toxins*. 6(12): 3223-3237.

**BRYDEN, W. L.** 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*. 173(1), 134-158.

**CE. COMISION EUROPEA.** 2006. Commission Regulation N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. 2014-014.001-1.

**DARWISH, W. S.; IKENAKA, Y.; NAKAYAMA, S.; ISHIZUKA, M.** 2014. An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *Journal of Veterinary Medical Science*. 76(6): 789-797.

**DEMAEGDT, H.; DAMINET, B.; EVRARD, A.; SCIPPO, M.; MULLER, M.; PUSSEMIER, L.; VANDERMEIREN, K.** 2016. Endocrine activity of mycotoxins and mycotoxin mixtures. *Food and Chemical Toxicology*. 96: 107-116.

**DOMINGOS, J.** 2011. The Incidence of Fungi and their Mycotoxins in Angolan Food and Crops with Particular Reference to Maize. Seminario Título Ciencias Titulares. Angola. University of Johannesburg. 100p.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO.** 2003. [en línea]. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>>. [Consulta: 10-05-2017].

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** 2012. <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>>. [Consulta: 12:05:2017].

**GIMENO, A.; MARTINS, M. L.** 2011. *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. Special Nutrients Incorporated. 3ra edición. Miami. Florida. USA. 128p.

**HAN, EUN-MEE; SOO JUNG HU; KI-SUNG KWON; HYOMIN LEE; MI-SUN HA, KYUNG-MI KIM, EUN-JUNG KO, SANG-DO HA; HYANG SOOK CHUN; DUCK-HWA CHUNG; DONG-HO BAE.** 2006. Monitoring of Aflatoxin B1 in Livestock Feeds Using ELISA and HPLC. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(4): 643-646.

**HYUNH, T., KNIGHT, P., WOLDE-MARIAM, W.** 2012. Quantitation of Aflatoxin B1 by ELISA in Commodities that Pose a Matrix Effect. In Presented at AOAC 126th Annual Meeting. 10p.

**ISMAIEL, A.; PAPENBROCK, J.** 2015. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*. 5(3): 492-537.

**KANG'ETHE, E.; LANG'A, K.** 2009. Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. *African Health Sciences*, 9(4).

**KHAYOON, W.; SAAD, B.; YAN, C.; HASHIM, N.; ALI, A.; SALLEH, M.; SALLEH, B.** 2010. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food Chemistry*, 118(3): 882-886.

**LAWLEY, R.** 2013. Aflatoxins. [en línea]. <<http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/aflatoxins/>>. [Consulta: 10-05-2017].

**LESZCZYŃSKA, J.; MASŁOWSKA, J.; OWCZAREK, A.; KUCHARSKA, U.** 2001. Determination of aflatoxins in food products by the ELISA method. *Czech Journal of Food Science*, 19: 8-12.

**LUCKETT, R., MUGIZI, R., LOPES, S.; ETOSSI, R.; ALLAN, R.** 2016. The Role of Laboratory Supervision in Improving the Quality of Malaria Diagnosis: A Pilot Study in Huambo, Angola. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 94(3): 659-662.

**MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D.** 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest. *Plant Pathology*. 60(1), 150-163.

**MURUGESAN, G.; LEDOUX, D.; NAEHRER, K.; BERTHILLER, F.; APPELEGATE, T.; GRENIER, B.; SCHATZMAYR, G.** 2015. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies 1. *Poultry science*. 94(6): 1298-1315.

**OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2015. Food Safety. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. [Consulta: 12:05:2017].

**PIERRON, A.; ALASSANE-KPEMBI, I.; OSWALD, I. P.** 2016. Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. *Animal Nutrition*. 2(2): 63-68.

**PINOTTI, L.; OTTOBONI, M.; GIROMINI, C.; DELL'ORTO, V.; CHELI, F.** 2016. Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal byproducts. *Toxins*. 8(2): 45.

**PLEADIN, J.** 2015. Mycotoxins in grains and feed-contamination and toxic effect in animals. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 31(4): 441-456.

**PLEADIN, J.; STAVER, M.; MARKOV, K.; FRECE, J.; ZADRAVEC, M.; JAKI, V.; KRUPIĆ I.; VAHČIĆ, N.** 2017. Mycotoxins in organic and conventional cereals and cereal products grown and marketed in Croatia. *Mycotoxin Research*. 1-9.

**SAG. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO.** 2017 **PROYECTO de RESOLUCION de CONTAMINATES en ALIMENTOS para ANIMALES.** [en consulta pública].

**SAG. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO.** 2016. **PROGRAMA OFICIAL de MONITOREO de CONTROL de RESIDUIOS PECUARIOS.** [en línea] [www.sag.cl/ambitos-de-accion/programa-de-contrl-de-residuos-prc/.../puplicaciones](http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/programa-de-contrl-de-residuos-prc/.../puplicaciones) [Consultado: 11.08.2017]. 1-23.

**SARMA, U., BHETARIA, P., DEVI, P., VARMA, A.** 2017. Aflatoxins: Implications on Health. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 1-10.

**SARTORI, A. ANON.** Establece límites máximos de contaminantes en insumos destinados a la alimentación animal y deroga resolución n° 736 de 1992. Servicio Agrícola y Ganadero. 6p.

**STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I. P.** 2012. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. *Toxins*. 4(10): 788-809.

**STREIT, E.; NAEHRER, K.; RODRIGUES, I.; SCHATZMAYR, G.** 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(12): 2892-2899.

**WACOO, A., WENDIRO, D., VUZI, P., HAWUMBA, J.** 2014. Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops. *Journal of Applied Chemistry*, 2014: 15.

**WILD, C.; MILLER, J.; GROOPMAN, J.** 2015. Mycotoxin control in low-and middle-income countries. *IARC Working Group Report*. v8.

**ZAIN, M.** 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15(2): 129-144.

**ZAKI, M.; EL-MIDANY, S.; SHAHEEN, H.; RIZZI, L.** 2012. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. 4(1): 13-28.

## ANEXOS

### ANEXO N° 1

#### Carta de Trabajo de la Metodología de ELISA

1. Pesar 5 g de las muestras
2. Adicionar 25 ml de Metanol 70 %
3. Vortear por 3 minutos manual posteriormente 10 minutos por multi-vorte
4. Centrifugar las muestras a 10 minutos a 4000rpm a una temperatura de (20-25°C/68-77°F)
5. Diluir 300 µL del sobrenadante y en seguida se le agrega 900 µl de la Solución C
6. Vortear por 1 minuto
7. Para la curva de estándares, se le agrega 50 µl de cada estándar de Aflatoxina B1 por duplicado en los diferentes pocillos. En seguida se le agregue los 6 Estándares a la placa por duplicado en el orden de menor a mayor concentración
8. Posteriormente le agregue 50 µl de la dilución de las muestras en diferentes pocillos de forma dupla
9. Le agrega 100µl solución de conjugado Aflatoxina B1-HRP a cada pocillo y mezcla bien, balanceando suavemente durante 1 minuto de forma manual
10. Se incuba la placa durante 30 minutos
11. Vaciar la solución y añadir 250 ml de 1x solución de lavado por cada pocillo sacudir la placa y seca con toallas de papel asegurando que seque bien se repite por dos veces
12. Adición del substrato 100µl de substrato TMB mezcla suave por 1 minuto e incubar la placa a 15 minutos a temperatura ambiente (20-25) °C. El cambio de color es un indicador de la presencia ausencia de aflatoxina
13. Agrega una solución Stop de la reacción (solución buffer)
14. Se hace la lectura con Espectrofotómetro con un nivel de absorbancia de 450nm

El Kit de Estándares Aflatoxinas B1 test de Elisa

Aflatoxina B1 Plate	Amount 1x 96 –Well Plate (8wellsx 12 strips)
Control Negativo ( frasco de color blanco)	0.8ml
0.02 ng/ml ( frasco de color amarillo)	0.8ml
0.06 ng/ml ( frasco de color laranja)	0.8ml
0.2 ng/ml ( frasco de color rosado)	0.8ml
0.6 ng/ml( frasco de color morado)	0.8ml
1.5 ng/ml ( frasco de color azul)	0.8ml
1000 ng/ml ( spiking, optional, red cap tube)	0.8ml

## ANEXO N°2

### Carta de Trabajo de la Metodología HPLC/FL

1. Pesar 25 g muestras molida de pienso o 50 g maíz molido y para evitar la formación de emulsiones se adicionan de 5 g de cloruro de sodio en el vaso de la Licuadora, agregar 125 ml de la mezcla de la de metanol HPLC/agua desionizada 80/20.
2. Se agitar en licuadora durante 1 minuto aproximadamente.
3. Se filtrarán por papel fibra de vidrio para atrapar todo residuos que puedan interferir en lectura de muestras y se recibe en una probeta de 50 ml.
4. Posteriormente se tomarán 20 ml del filtrado y agregar 20 ml agua destilada y mezclar bien.
5. Colocar la columna de afinidad en jeringa marca Vican.
6. Hacer pasar 10 ml del filtrado a través de la columna con ayuda de la presión ejercida por la bomba de aire, con un flujo de 2 gotas por segundo, sin dejar secar la columna.
7. Lavar la columna 2 veces con 10 ml cada vez, después del segundo lavado dejar pasar aires por la columna para secar bien.
8. Eluír la columna con 1 ml de metanol HPLC con un flujo de 2 gotas por segundo colectando el eluido en un tubo eppendorf de 2 ml.
9. Evaporar a sequedad el metanol bajo corriente de nitrógeno.
10. Derivatización: Disolver el residuo en 400 $\mu$ l de n-hexano HPLC, vortear por 1 minuto, agregar 400 $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA) para derivatizar, vortear y calentar por 10 minutos en baño de agua a 40°C posteriormente enfriar.
11. Evaporar a sequedad en corriente de nitrógeno, aproximadamente.
12. Disolver en 1000 $\mu$ l de solución metanol-agua 50/50, filtrar mediante filtro acrodisco de 0,45 $\mu$ m.
13. Centrifugar 5 minutos por 4000 rpm
14. Sonicar por 3 minutos
15. Traspasar a un vial ámbar y tapar.
16. Inyectar 50 $\mu$ l en el HPL

### ANEXOS N° 3

Tabla N°1 Preparación de curva de calibración en solvente

Curva de Calibración AFB1 (ng/g)	Concentración AFB1 (ng/ml)	Alícuota de Std. Solución Mixta N°1 ( $\mu$ L)	Alícuota de Solvente MeOH /H2O 50/50 ( $\mu$ L)
Std 1	1	10	990
Std 2	2,5	25	975
Std 3	5	50	950
Std 4	7,5	75	925

### ANEXO N° 4

Preparación de curva de calibración en matriz

Curva de Calibración AFB1	Alícuota de Std. Solución Mixta N°1 ( $\mu$ l)	Alícuota de Solvente MeOH /H2O 50/50 ( $\mu$ l)
Std 1	50	950
Std 2	125	875
Std 3	250	750
Std 4	500	500

**ANEXO N° 5**

Hoja de Trabajo/ análisis de Residuos de: Aflatoxinas

Código: QAA/P-01

Fecha de Extracción	Inicio:12/09/17	Final:13/09/17
Realizado por: Isabel Ferreira	Matriz Alimento (Piensos)	
Responsable Fortificado	Equipo HPLC - Agilent	
Instructivo/Método empleado	Fecha secuencia	

Serie de Análises	Peso (g)	Alícuota Std Trabajo	Volumen Final
FM	-	-	1ml
Std 1	-	10 µl	-
Std 2	-	25 µl	-
Std 3	-	50 µl	-
Std 4	-	75 µl	-
Bco	25	-	-
F1	25	1250 µl	-
F2	25	1250 µl	-
Muestras			
252	25	-	-
253	25	-	-
255	25	-	-
318	25	-	-
319	25	-	-
658	25	-	-
574	25	-	-
656	25	-	-
659	25	-	-
706	25	-	-

