



---

# Análisis de micotoxinas en alimentos infantiles

---

**Ana Belén Martínez Piernas**

**Máster Química Avanzada Aplicada**

**Almería, Junio 2012**

# **Análisis de micotoxinas en alimentos infantiles**

Memoria de trabajo fin de máster para optar al título de “Máster en Química Avanzada Aplicada”.  
Los resultados aquí expuestos se han realizado en la empresa Sica AgriQ en la modalidad de Prácticas Externas (Orientación Profesional).

Ana Belén Martínez Piernas

Dirigida por:

**Dra Ana Agüera**

Departamento de Hidrogeología  
y Química Analítica

Universidad de Almería

**Dra Piedad Parrilla**

Departamento de Hidrogeología  
y Química Analítica

Universidad de Almería

**Dr Antonio Belmonte**

Director Sica AgriQ

# Índice de contenido

1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Micotoxinas .....	6
2.1.1 Aflatoxinas.....	6
2.1.1.1 Características .....	6
2.1.1.2 Toxicología.....	8
2.1.1.3 Legislación .....	8
2.1.2 Ocratoxina A.....	9
2.1.2.1 Características .....	9
2.1.2.2 Toxicología.....	10
2.1.2.3 Legislación.....	10
2.1.3 Fumonisinas.....	10
2.1.3.1 Características .....	10
2.1.3.2 Toxicología.....	11
2.1.3.3 Legislación.....	12
2.1.4 Tricotecenos.....	12
2.1.4.1 Características.....	12
2.1.4.2 Toxicología.....	14
2.1.4.3 Legislación.....	15
2.1.5 Zearalenona.....	15
2.1.5.1 Características.....	15
2.1.5.2 Toxicología.....	16
2.1.5.3 Legislación.....	16
2.2 Tratamiento de muestra.....	17
2.3 Métodos de análisis.....	18
2.3.1 Cromatografía Líquida.....	18
2.3.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	19
2.3.3 Interfase Electrospray (ESI).....	20
2.3.4 Espectrometrómetro de masas.....	22
3. PLAN DE TRABAJO.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Reactivos y productos químicos.....	26
4.2 Equipos.....	29
4.3 Condiciones de análisis por UPLC-MS/MS.....	29
4.4 Preparación de la muestra.....	30
4.5 Análisis de muestras reales.....	31
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
5.1 Optimización de la determinación UPLC-MS/MS.....	32
5.2 Optimización del procedimiento de extracción.....	33
5.3 Validación del método.....	42
5.3.1 Efecto matriz.....	42
5.3.2 Linealidad.....	49
5.3.3 Exactitud.....	49
5.3.4 Precisión.....	51
5.3.5 LODs y LOQs.....	52
5.4 Análisis de muestras reales.....	53
6. CONCLUSIONES.....	54
7. AGRADECIMIENTOS.....	54
8. BIBLIOGRAFÍA.....	55

# 1. OBJETIVOS

En los últimos años se han desarrollado métodos rápidos y sencillos para el análisis de micotoxinas en rutina, debido a que la presencia de estos compuestos en alimentos puede producir tanto toxicidad crónica como aguda y diversas lesiones en el sistema nervioso central. Para prevenir estos daños en la salud humana es necesaria la aplicación de métodos sensibles para el análisis de estos analitos en alimentos, y especialmente en los infantiles. Por ello, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Evaluar la viabilidad del empleo del método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) para la extracción simultánea de 12 micotoxinas: Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1), Fumonisinias (B1 y B2), Toxinas T-2 y HT-2, Ocratoxina (OTA), Zearalenona (ZEA) y Deoxinivalenol (DON).

- Desarrollar y optimizar un método de análisis sensible y selectivo para la determinación de estos compuestos mediante cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

- Aplicar el método desarrollado en el análisis de alimentos infantiles con base de cereales, y en leche para lactantes y leche de continuación.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, de composición variada, producidos por organismos del reino fungi, que incluye setas, mohos y levaduras. Son contaminantes naturales de una gran variedad de materias primas y alimentos destinados a consumo humano y animal. Estas toxinas se encuentran en los alimentos como consecuencia de la colonización de hongos toxicogénicos que, en función del medio ambiente, son capaces de producir estos metabolitos. Los sustratos pueden ser cereales, oleaginosas, alimentos elaborados, balanceados, pasturas, etc. Los hongos son especies biológicas de gran ubicuidad, por lo que son habitualmente saprofitos del suelo, agua y aire.

El deterioro biológico es el resultado neto de la acción de numerosos agentes de deterioro relacionados entre sí, que pueden clasificarse de forma general en agentes biológicos, químicos, físicos, macroambientales y microambientales. No obstante, los efectos relativos de cada uno de estos agentes estarán a menudo determinados en gran medida por el carácter y la magnitud de la intervención del hombre.

Los principales factores que contribuyen al deterioro biológico dentro de un ecosistema son la humedad, la temperatura y las plagas. Los mohos pueden proliferar en un amplio intervalo de temperaturas y, por lo general, la tasa de crecimiento de los mohos será menor cuanto menor sea la temperatura y la cantidad de agua disponible.

Las actividades acuosas necesarias para la proliferación de mohos suelen estar comprendidas en el intervalo de 0,70 a 0,99. La actividad acuosa, o actividad de agua, se define como la relación que existe entre la presión de vapor de un alimento dado en relación con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura, y es un parámetro estrechamente ligado a la humedad del alimento, lo que permite determinar su capacidad de conservación, de propagación microbiana, etc. La actividad de agua y la propensión a la proliferación de mohos es mayor cuanto mayor es la temperatura. No obstante, dada la complejidad de los ecosistemas que sustentan la producción de micotoxinas, no se han definido aún con precisión las condiciones necesarias para que los mohos toxicógenos produzcan micotoxinas .

Un 25% de las cosechas anuales están contaminadas por micotoxinas, y esa contaminación puede llegar a ser del 80% o incluso del 100% en terrenos que estén sometidos a estrés hídrico, ataque de insectos o que hayan sido cosechados o almacenados en condiciones inapropiadas.



**Figura 1: Maíz contaminado con Aflatoxinas**

Probablemente, las micotoxinas han ocasionado enfermedades desde que el hombre comenzó a cultivar plantas de forma organizada. Se ha conjeturado, por ejemplo, que la intensa reducción demográfica experimentada en Europa occidental en el S. XIII se debió a la sustitución de centeno por trigo, importante fuente de micotoxinas del hongo *Fusarium*. La producción de toxinas de *Fusarium* en cereales almacenados durante el invierno ocasionó también en Siberia durante la segunda guerra mundial la muerte de miles de personas y diezmó pueblos enteros.

La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, con resultados que van desde la muerte, a efectos nocivos en los sistemas nervioso central, cardiovascular y respiratorio, y en el aparato digestivo. Las micotoxinas pueden también ser agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos e inmunodepresores. Actualmente está muy extendida la opinión de que el efecto más importante de algunas micotoxinas, particularmente en los países en desarrollo, es su capacidad de obstaculizar la respuesta inmunitaria y, por consiguiente, de reducir la resistencia a enfermedades infecciosas .

La toxicidad de una micotoxina, tras la exposición (por ingestión, inhalación o contacto con la piel), está determinada por una secuencia de fenómenos que comprenden la administración, absorción, transformación, farmacocinética, interacciones moleculares, distribución y excreción de la toxina y sus metabolitos. A su vez, la toxicidad de una micotoxina se manifestará por sus efectos sobre la salud y la productividad de los cultivos, las personas y los animales, y estos efectos influirán en el valor económico de las actividades humanas y los productos agrícolas y pecuarios.

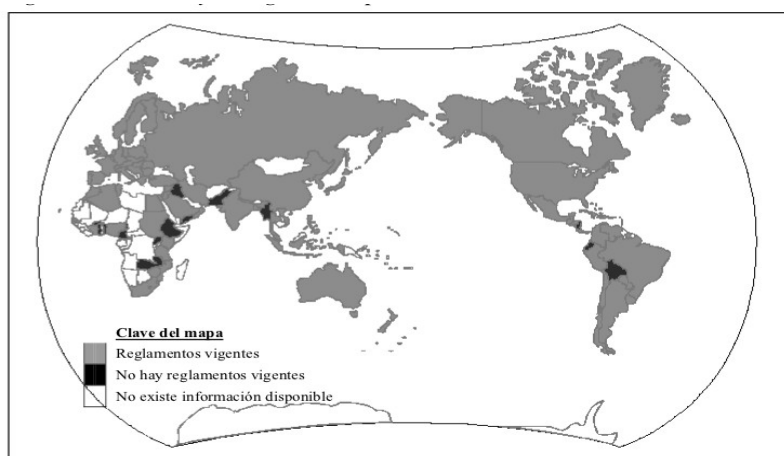
En la actualidad se conocen más de 300 micotoxinas diferentes, considerándose "importantes" si se demuestra su capacidad para tener efectos notables sobre la salud de las personas y la productividad de los animales.

**Tabla 1: Mohos y micotoxinas de importancia mundial**

<b>Especie de moho</b>	<b>Micotoxinas producidas</b>
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, M1, B2, G1 y G2
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B1, M1 y B2
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2 y HT-2
<i>Fusarium graminearum</i>	Desoxinivalenol y Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisina B1 y B2
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A

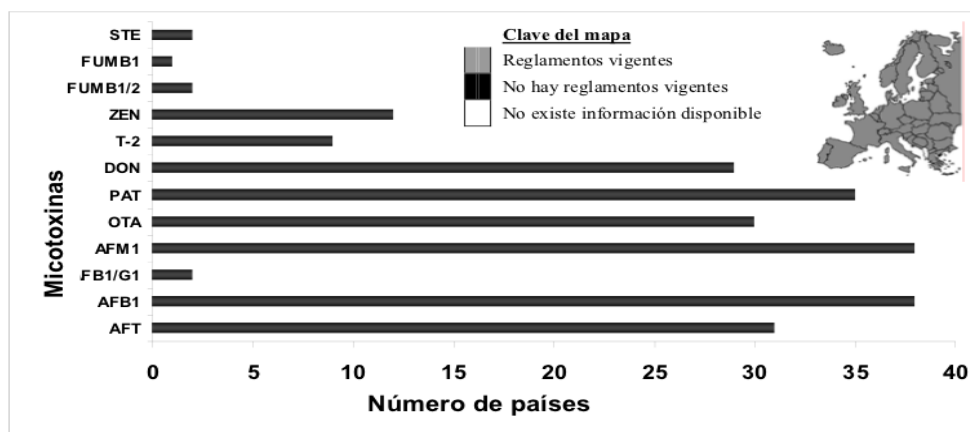
Mundialmente, al menos 99 países tenían reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o en las raciones en el año 2003 (ver Figura 1), un aumento de aproximadamente un 30 por ciento comparado con 1995. La población total en estos países representa aproximadamente 87 por ciento de los habitantes del globo.

La Figura 2 muestra la proporción de la población mundial que vive en regiones con reglamentos vigentes para las micotoxinas en 1995 y en el año 2003. En 1995, el 23 por ciento de la población mundial vivía en una región en la que no estaba vigente ningún reglamento conocido para las micotoxinas. Este porcentaje había disminuido al 13 por ciento en el año 2003, en razón de un ligero aumento en América Latina y Europa e incrementos más significativos en África y Asia/Oceanía.

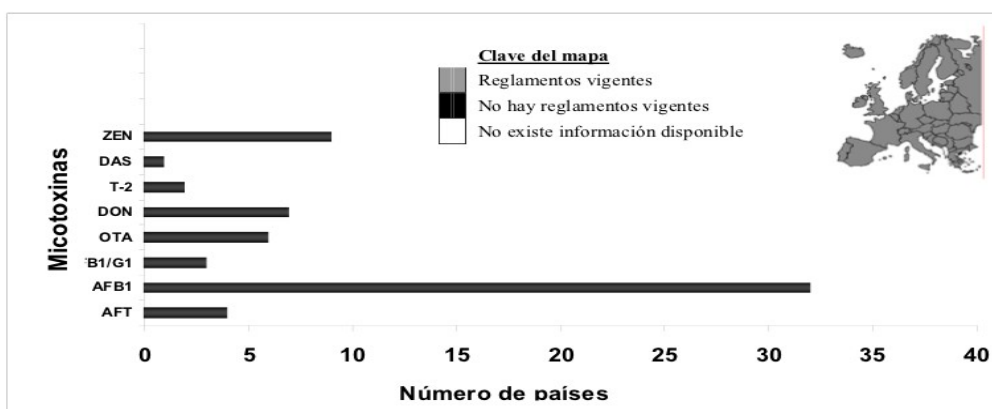


**Figura 2: Países con y sin reglamentos para las micotoxinas**

En Europa, 39 países, representando aproximadamente el 99 por ciento de la población del continente, contaban con reglamentos específicos para micotoxinas en el año 2003. Las Figuras 3 y 4 ilustran, respectivamente, la presencia de límites reglamentarios para diversas las micotoxinas en Europa en los alimentos y en las raciones.



**Figura 3: Micotoxinas en los alimentos reglamentados en Europa**



**Figura 4: Micotoxinas en las raciones reglamentadas en Europa**

Comparativamente con otras regiones, Europa cuenta con reglamentos para las micotoxinas en los alimentos más extensos y detallados. En la UE existen reglamentos armonizados para las Aflatoxinas en diversos alimentos, para la Aflatoxina M1 en la leche, para la Ocratoxina A en los cereales y en los frutos secos de la vid y para la Aflatoxina B1 en diversas raciones. Se han fijado límites guía para el Deoxinivalenol en los cereales y en los productos de cereales. Cabe señalar que muchos de los miembros recientes de la UE cuentan, a menudo, con reglamentos para las micotoxinas más detallados que los vigentes actualmente en la UE.



## 2.1 Micotoxinas

A continuación, se van a describir los tipos de micotoxinas objeto de estudio, sus características físico-químicas y estructurales, su toxicidad y la legislación actual de los límites máximos de residuos (LMRs) estipulados por la Comunidad Europea para cada una de ellas [24].

### 2.1.1 Aflatoxinas

#### 2.1.1.1 Características

Las Aflatoxinas son un tipo de micotoxinas, producidas por especies de hongo del género *Aspergillus*. El término genérico Aflatoxina puede referirse a cuatro tipos diferentes de micotoxinas, conocidas como B1, B2, G1 y G2. Después de la entrada en el cuerpo, la Aflatoxina B1 se metaboliza en el hígado creando un metabolito hidroxilado, la Aflatoxina M1.

La actividad de agua óptima para la proliferación de *Aspergillus flavus* es alta (alrededor de 0,99); el valor máximo es al menos 0,998 y el mínimo no se ha determinado aún con precisión. En general, parece que una actividad de agua alta favorece la producción de toxinas. Se ha descrito que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 43°C. La tasa de crecimiento óptima, hasta 25 mm al día, se produce a una temperatura ligeramente superior a 30°C. *A. flavus* produce Aflatoxinas en el intervalo de temperaturas de 15 a 37°C. No es posible especificar una temperatura óptima para la producción de toxinas, aunque se ha descrito que entre 20 y 30°C la producción es considerablemente mayor que a temperaturas más altas o más bajas.

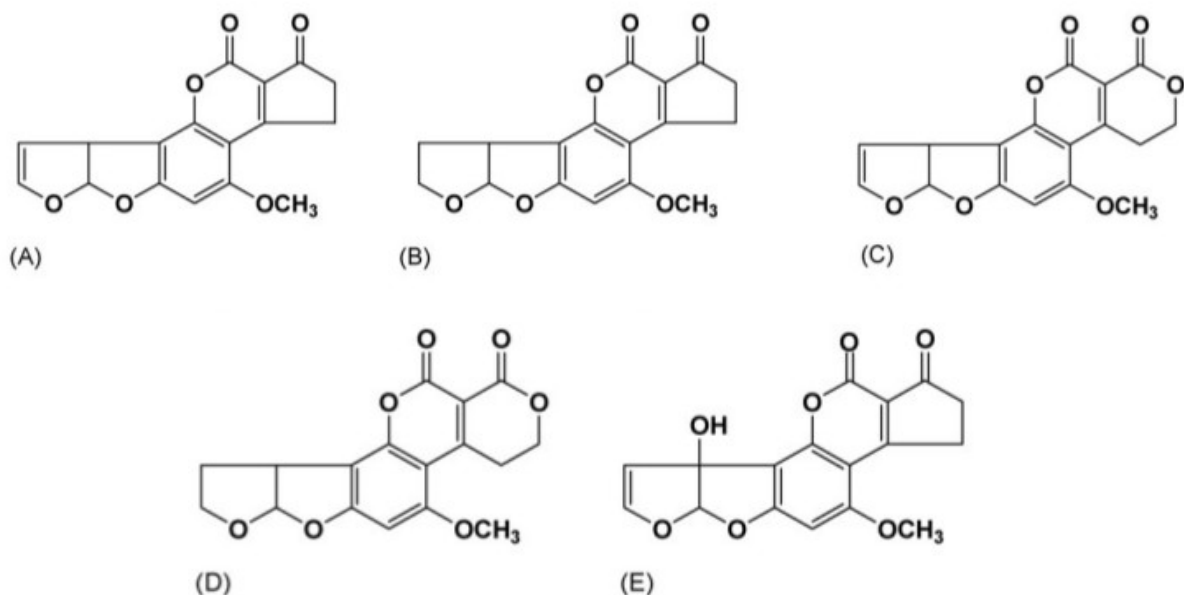


**Figura 5:** Imagen de *Aspergillus flavus*

Los efectos de la actividad de agua y la temperatura sobre el comportamiento de *Aspargillus parasiticus* son similares a los antes descritos para *A. flavus*. Pitt y Miscamble han referido un valor mínimo de 0,83 aproximadamente para el crecimiento, y de 0,87 aproximadamente para la producción de Aflatoxinas. Hay pocos datos acerca de los efectos de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de Aflatoxinas de *A. parasiticus*. Se han descrito valores óptimos para el crecimiento y para la producción de toxinas de aproximadamente 30 y 28°C, respectivamente [27].

Los mohos productores de Aflatoxinas están muy extendidos por todo el mundo, en climas templados, subtropicales y tropicales, y pueden producir Aflatoxinas, tanto antes como después de la cosecha, en numerosos alimentos y piensos, especialmente semillas oleaginosas, nueces comestibles y cereales.

Las Aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales de los cereales como maíz, trigo y arroz, y en subproductos de cereales, tortas de oleaginosas como algodón, maní, colza, coco, girasol, etc., en yuca y en otra cantidad de productos alimenticios para animales y humanos dentro de los cuales se destacan salchichas, frutos secos, vinos, frutas, leche y derivados.



**Figura 6: Estructuras de las Aflatoxinas (A) AFB<sub>1</sub>, (B) AFB<sub>2</sub>, (C) AFG<sub>1</sub> (D) AFG<sub>2</sub> y (E) AFM<sub>1</sub>**

### **2.1.1.2 Toxicología**

Las Aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica, lo que las hace tema importante de salud pública y de ahí la importancia que tiene su control y prevención. .

De una forma indirecta a través de la inmunosupresión, las Aflatoxinas pueden perjudicar la reproducción. El efecto inmunosupresivo predispone al organismo para que sea invadido por microorganismos patógenos, algunos de los cuales pueden dar lugar a problemas de mamitis, agalactia y metritis. Parece ser que estas micotoxinas pueden producir alteraciones espermáticas en verracos, con una disminución en la concentración y supervivencia de los espermatozoides, y un aumento de éstos anormales.

La Aflatoxina B1 es cancerígena para el hombre [26] y es uno de los agentes causantes de cáncer de hígado más potentes que se conocen. En 1974 fallecieron 104 personas a causa de intoxicación aguda por Aflatoxinas en la India, cuando las lluvias intempestivas y la escasez de alimentos impulsaron el consumo de maíz muy contaminado. Si la acción inmunodepresora de las Aflatoxinas en el ganado se manifiesta de forma similar en las personas, es posible que las Aflatoxinas desempeñen un papel importante en la etiología de las enfermedades que sufre la población en algunos países en desarrollo en los que se ha comunicado una alta exposición a estas toxinas. En 2004, 125 personas fallecieron y unas 200 otras enfermaron en Kenia como consecuencia de consumir maíz contaminado por Aflatoxinas.

### **2.1.1.3 Legislación**

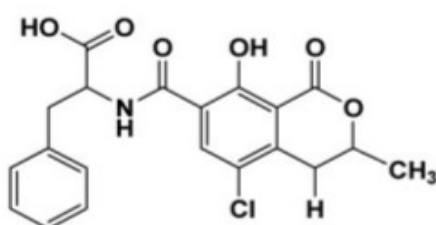
La actual legislación comunitaria sobre contenidos máximos de micotoxinas en productos alimenticios de la Comunidad Europea marca los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para alimentos infantiles elaborados a base de cereales y de preparados para lactantes y leche de continuación son de 0.1 µg/Kg para la Aflatoxina B1, y en preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y leche de continuación son de 0.025 µg/Kg para la Aflatoxina M1.

## 2.1.2 Ocratoxina A

### 2.1.2.1 Características

*A. ochraceus* crece más despacio que *A. flavus* y *A. parasiticus*, pero puede crecer con una actividad de agua de sólo 0,79. Se ha descubierto también el crecimiento a temperaturas de 8 a 37°C, y diversas fuentes han señalado valores óptimos de 25 a 31°C. Se produce Ocratoxina A a temperaturas de 15 a 37°C, con una producción entre 25 y 28°C.

*P. verrucosum* crece a temperaturas de 0 a 31°C y con una actividad de agua mínima de 0,80. Se produce Ocratoxina A en todo el intervalo de temperaturas y pueden producirse cantidades considerables de toxinas a temperaturas de sólo 4°C y con una actividad de agua de 0,86.



**Figura 7: Estructura de la Ocratoxina A**

Al parecer, la exposición a la Ocratoxina A (OTA) se produce principalmente en zonas templadas del hemisferio norte donde se cultiva trigo y cebada [26]. Las concentraciones de OTA notificadas en estos productos oscilan entre cantidades ínfimas y concentraciones de 6 000 mg/kg, en trigo de Canadá. En el Reino Unido, se han notificado concentraciones comprendidas entre menos de 25 y 5000 mg/kg y entre menos de 25 y 2700 mg/kg, en cebada y trigo respectivamente. La OTA también está presente en el maíz, el arroz, los guisantes, los frijoles, el caupí, los frutos de plantas trepadoras y sus productos, el café, las especias, las nueces y los higos.

Aunque los cereales se consideran la principal fuente de OTA en la alimentación humana, se ha indicado que los productos de cerdo pueden ser también una fuente importante de esta toxina. La detección en Europa de la presencia de esta micotoxina en productos de carne de cerdo vendidos en establecimientos minoristas y en sangre de cerdo, ha demostrado que esta toxina puede pasar de los piensos a los productos de origen animal.

Se ha encontrado OTA en la sangre y en la leche de personas de diversos países europeos, como Francia, Italia, Alemania, Dinamarca, Suecia, Polonia, Yugoslavia y Bulgaria. Una de las concentraciones más altas notificadas es 100 ng/ml de OTA en sangre procedente de Yugoslavia [27], mientras que en Italia se han registrado concentraciones de OTA en leche de 6,6 ng/ml [28].

#### **2.1.2.2 Toxicología**

Se ha relacionado la Ocratoxina A con la nefropatía endémica de los Balcanes, una enfermedad renal crónica mortal que afecta a los habitantes de algunas regiones de Bulgaria, la ex Yugoslavia y Rumania.

#### **2.1.2.3 Legislación**

Al menos once países de la UE han proyectado reglamentos sobre la OTA. Las concentraciones permitidas varían de 1 a 50 mg/kg en alimentos y de 100 a 1 000 mg/kg en piensos. En Dinamarca, para determinar si los productos de una determinada canal de cerdo son aceptables se analiza el contenido de OTA de un riñón de dicha canal. La carne y determinados órganos del cerdo pueden consumirse como alimentos si el contenido de OTA del riñón no es superior a 25 y 10 mg/kg, respectivamente.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios ha recomendado una ingesta semanal tolerable provisional de OTA de 100 ng/kg de peso corporal, correspondiente a aproximadamente 14 ng diarios por kg de peso corporal.

La actual legislación comunitaria sobre contenidos máximos de micotoxinas en productos alimenticios de la Comunidad Europea marca el LMR de OTA en 0.5 µg/Kg para alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.

### **2.1.3 Fumonisinias**

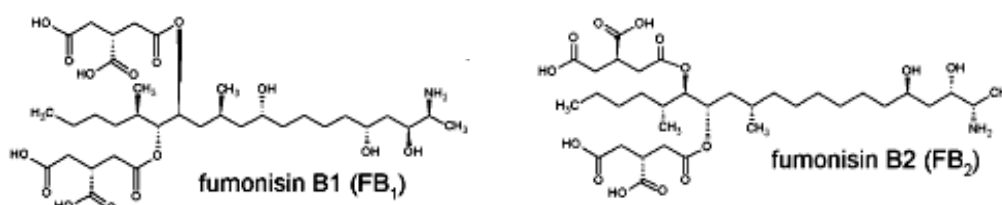
#### **2.1.3.1 Características**

Las Fumonisinias son un grupo de micotoxinas caracterizado recientemente y producidas por *F. moniliforme*, un moho presente en todo el mundo y que se encuentra con frecuencia en el maíz [26]. Existen 6 tipos Fumonisinias: B1, B2, B3, B4, A1 y A2. Sin embargo, las más frecuentes e importantes por su toxicidad son la B1 y B2. El grupo amino libre de la serie B parece ser el

responsable de la actividad biológica y toxicológica de dichos compuestos.

Se ha certificado la presencia de Fumonisina B1 en maíz (y sus productos) en diversas regiones agroclimáticas de países como Estados Unidos, Canadá, Uruguay, Brasil, Sudáfrica, Austria, Italia y Francia. La producción de toxinas es particularmente frecuente cuando el maíz se cultiva en condiciones calurosas y secas. *F. moniliforme* es una de los géneros de hongos con mayor capacidad para producir micotoxinas si las condiciones son favorables.

La actividad de agua mínima para el crecimiento de *F. moniliforme* es 0,87; el límite máximo registrado es superior a 0,99. Las temperaturas de crecimiento mínima, óptima y máxima son 2,5 a 5,0, 22,5 a 27,5 y 32,0 a 37,0°C, respectivamente. No existe información sobre las condiciones necesarias para la producción de Fumonisina B1.



**Figura 8: Estructura química de las Fumonisinas**

### 2.1.3.2 Toxicología

Los efectos principales que producen son leucoencefalomalacia, nefrotoxicidad, edema pulmonar, edema cerebral, hepatotoxicidad y lesiones cardiacas. Los órganos afectados son el cerebro, pulmón, riñón y corazón.

Hasta la fecha, la interferencia con la biosíntesis de esfingolípidos es la principal causa de toxicidad en seres humanos y animales. En el ser humano producen cáncer de esófago y cáncer de hígado, mientras que en animales puede dar lugar a la leucoencefalomalacia equina y al edema pulmonar porcino. Estos metabolitos tóxicos inhiben la síntesis de lipoproteínas denominadas esfingolípidos

La presencia de Fumonisinas en maíz se ha relacionado con casos de cáncer de esófago en habitantes de la zona de Transkei, África austral y China. Se ha estudiado la relación entre la exposición a *F. moniliforme*, en maíz de producción doméstica, y la incidencia de cáncer de esófago

en la zona de Transkei durante el decenio 1976-86. El porcentaje de granos infectados por *F. moniliforme* fue significativamente mayor en la zona de alto riesgo de cáncer durante todo el período, y las concentraciones de FB1 y FB2 fueron significativamente mayores en maíz mohoso obtenido de zonas de alto riesgo en 1986 [29].

### 2.1.3.3 Legislación

La actual legislación comunitaria sobre contenidos máximos de micotoxinas en productos alimenticios de la Comunidad Europea marca los LMRs para alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad en 200 µg/Kg para la suma de FB1 y FB2.

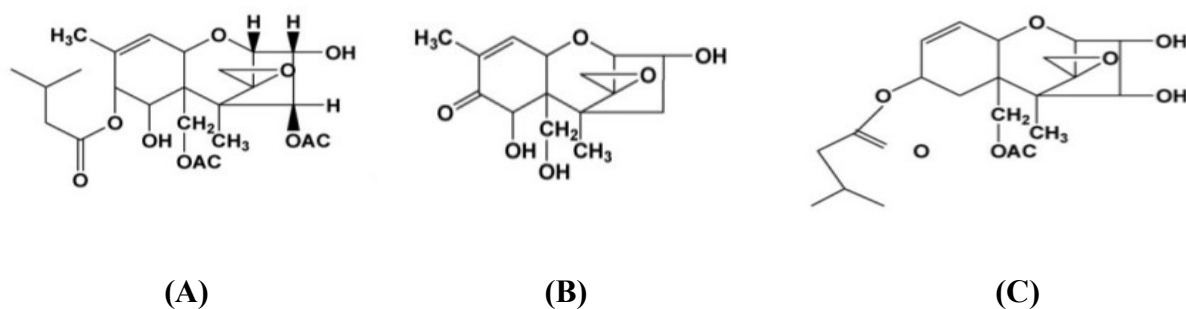
## 2.1.4 Tricotecenos

### 2.1.4.1 Características

Estos metabolitos tóxicos son producidos principalmente por el *F. sporotrichioides* y *F. graminearum* entre otros. La toxina T-2, la toxina HT-2 y el desoxinivalenol (DON) pertenecen a un amplio grupo de sesquiterpenos relacionados desde el punto de vista estructural, que se conocen como "Tricotecenos". Reciben este nombre por poseer en su molécula el esqueleto tetracíclico 12, 13 – epoxitricotec – 9 - eno. Presentan diferencias en su grupo funcional, lo cual permite dividirlos en cuatro clases:

- *Grupo A*: Esta clase se caracteriza por un grupo funcional no acetónico en el carbono 8. Esta clase es la más numerosa y entre sus miembros se incluyen las toxinas T-2 y HT-2.
- *Grupo B*: Caracterizada por un grupo carbonilo en el carbono 8, esta clase incluye los Tricotecenos 4-deoxivalenol (DON) y nivalenol, ambos producidos por *F. graminearum* y *F. culmorum*.
- *Grupo C*: Esta clase cuenta con un segundo grupo epóxido en los carbonos 7 y 8, o 9 y 10. Son producidos por pocas especies.
- *Grupo D*: Contienen un anillo macrocíclico entre los carbonos 4 y 15 con dos enlaces estéricos. Entre ellos, cabe destacar la satratoxina, producida por el género *Stachybotrys*. *Myrothecium* también produce Tricotecenos pertenecientes a esta clase.

Este trabajo sólo se va a centrar en los Tricotecenos T-2, HT-2 (grupo A) y DON (grupo B).



**Figura 9: Estructura de Tricotecenos (A) T-2, (B) DON, (C) HT-2**

Las toxinas Tricotecenos pueden estar presentes como contaminantes naturales en los cereales como maíz, cebada, avena, trigo, arroz, mijo, y subproductos de estos. Los principales sistemas a los que afectan son el digestivo, circulatorio, nervioso y a la piel.

La toxina T-2 se produce en cereales en muchas partes del mundo y está relacionada en particular con períodos prolongados de tiempo lluvioso durante la cosecha. Es probablemente la causa de la "aleucia tóxica alimentaria" (ATA), enfermedad que afectó a miles de personas en Siberia durante la segunda guerra mundial [26].

El deoxinivalenol, que es probablemente la micotoxina de *Fusarium* más corriente, contamina diversos cereales, especialmente el maíz y el trigo, tanto en países desarrollados como en desarrollo.

La actividad de agua mínima para el crecimiento de *F. sporotrichioides* (T-2, HT-2) es 0,88, y el límite máximo notificado es superior a 0,99. Las temperaturas mínima, óptima y máxima para el crecimiento son -2,0, 22,5 a 27,5 y 35,0°C, respectivamente. Como en el caso de otros mohos del género *Fusarium*, no hay información sobre las condiciones necesarias para la producción de la toxina T-2.

En el caso de *F. graminearum* (DON), no se han publicado los límites de las temperaturas que favorecen el crecimiento, aunque se ha estimado que la temperatura óptima es de 24 a 26°C. La actividad de agua mínima para el crecimiento es 0,90; el límite máximo notificado es superior a 0,99. No se dispone de información acerca de los efectos de la actividad de agua y la temperatura



sobre la producción de desoxinivalenol.

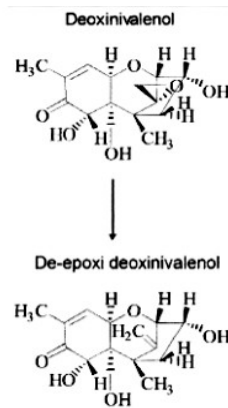
#### **2.1.4.2 Toxicología**

La acción tóxica principal de los Tricotecenos es la necrosis extensiva de la mucosa de la piel y de la boca cuando hay contacto con la micotoxina. Se producen problemas agudos a nivel del tracto gastrointestinal, degeneración de la médula ósea y depresión muy severa del sistema inmunitario.

La toxina T-2 ha causado brotes de enfermedad hemorrágica en animales y está relacionada con la formación de lesiones bucales y efectos neurotóxicos en aves de corral. El efecto más importante de la toxina T-2 es su actividad inmunodepresora, que se ha demostrado claramente en animales de experimentación y que probablemente está relacionado con el efecto inhibitor de la biosíntesis de macromoléculas de esta toxina. Hay escasas pruebas de la carcinogenicidad de la toxina T-2 en estudios con animales de experimentación.

La ingestión de DON ha ocasionado brotes de micosis agudas en la población de la India, China y zonas rurales del Japón. El brote surgido en China en 1984-85 se debió al consumo de maíz y trigo mohosos; en un plazo de entre cinco y treinta minutos aparecían síntomas como náuseas, vómitos, dolores abdominales, diarrea, mareos y cefaleas [26].

La absorción, distribución y eliminación del DON es rápida si es vía oral o parenteral. No hay evidencia de que se acumule en los tejidos o se transmita a los huevos o a la leche. El DON da origen a un derivado llamado de-epoxi-deoxinivalenol por una vía metabólica que implica la pérdida de la función epoxi-O (de epoxidación). Dicho metabolito es predominante en heces, orina y plasma de animales y seres humanos. También se ha detectado DON y/o sus metabolitos en niveles bajos en leche, carne y huevos de animales (ver figura 10).



**Figura 10: Metabolismo del DON**

El DON no se acumula en el organismo y produce solamente toxicidad aguda. Los valores de DL50 oral son de aproximadamente 78 a 46 mg/kg de peso corporal.

#### **2.1.4.3 Legislación**

La actual legislación comunitaria sobre contenidos máximos de micotoxinas en productos alimenticios de la Comunidad Europea marca el LMR de DON para alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad en 200 µg/Kg. Para las toxinas T-2 y HT-2 no se han impuesto LMRs en Europa, pero sí el SCF ha establecido los niveles de ingesta diaria tolerable (TDI) en 0.06 mg/Kg.

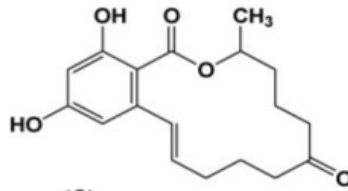
### **2.1.5 Zearalenona**

#### **2.1.5.1 Características**

La Zearalenona (ZEA) es producida principalmente por *Fusarium graminearum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium tricinctum* y *Fusarium roseum culmorum*, entre otros. Existen unos 16 derivados de Zearalenona de los cuales los más importantes son el Alfa y Beta Zearalenol. La Zearalenona se puede encontrar como contaminante en maíz y sus subproductos, cebada, trigo, avena, sorgo, semillas de sésamo, heno y ensilados.

La Zearalenona es una micotoxina estrogénica de distribución amplia, presente principalmente en el maíz, en bajas concentraciones, en Norteamérica, Japón y Europa. Sin embargo, pueden encontrarse concentraciones altas en países en desarrollo, especialmente donde se cultiva maíz en climas más templados, por ejemplo en regiones de tierras altas. Su presencia, en

grandes cantidades, es debida su incorrecto almacenamiento más que a su desarrollo en el campo. *F. graminearum* produce Zearalenona junto con Desoxinivalenol, y se ha señalado la posible relación de ambas sustancias con brotes de micotosis agudas en personas.



**Figura 11: Estructura ZEA**

#### **2.1.5.2 Toxicología**

La ZEA tiene una relativa baja toxicidad (> 4.000 a 20.000 mg/kg pc). El nivel sin efecto observable (NOEL) es de 40 µg/kg pc/día y de 100 µg/kg pc/día (cerdos y ratas).

Las investigaciones sobre los efectos crónicos determinan que el efecto estrogénico es una consecuencia importante para los mamíferos incluso a niveles más bajos que 1.5-3 mg/kg. Esta micotoxina causa alteración en el tracto reproductivo de animales de laboratorio, afecta al útero disminuyendo la hormona luteinizante y la secreción de progesterona.

En humanos, la ZEA ha sido investigada en el tejido endometrial de 49 mujeres. 27 de ellas presentaban adenocarcinoma endometrial. Otras 11 tenían hiperplasia endometrial. Y el resto presentaban características endometriales normales.

Al sureste de Hungría se han detectado concentraciones desde 18.9 hasta 103.5 µg/ml en suero. Además, también se ha encontrado ZEA en las muestras de los alimentos consumidos en esa zona. Se ha demostrado que la ZEA puede estimular el crecimiento de carcinomas mamarios.

#### **2.1.5.3 Legislación**

La actual legislación comunitaria sobre contenidos máximos de micotoxinas en productos alimenticios de la Comunidad Europea marca el LMR de ZEA para alimentos elaborados a base de cereales y de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad en 20 µg/Kg.

## 2.2 Tratamiento de muestra

La mejora de los métodos de muestreo y la preparación de la muestra utilizada para detectar micotoxinas en alimentos y piensos sigue siendo una alta prioridad entre los organismos reguladores, las organizaciones internacionales, las industrias y los productos básicos en todo el mundo. En la siguiente tabla se recogen las últimas investigaciones sobre estos analitos, métodos de extracción, tipo de cromatografía, compuestos estudiados y matrices evaluadas en cada uno de ellos.

**Tabla 2: Resumen estudios recientes**

<b>Autor</b>	<b>Método extracción</b>	<b>Técnica cromatográfica</b>	<b>Analitos</b>	<b>Matriz</b>
Njumbe et al [1]	SPE	UPLC-ESI-MS/MS	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, T2, HT2, OTA, ZEA, FB2	Avellana y Maíz
Soleimany et al [2]	ASE	HPLC-ESI-MS/MS	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, ZEA, DON, FB1, FB2, T2, HT2	Cereales
Desmarchelier et al [3]	QuEChERS	HPLC-ESI-MS/MS	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, T2, HT2, FB1, FB2, OTA, ZEA	Maíz, Trigo, Arroz, Avena, Alimentos infantiles, Centeno, Cebada, Soja
Rasmussen R. et al [6]	QuEChERS	HPLC-ESI-MS/MS	DON, OTA, ZEA, FB1, FB2, T2	Maíz
Rubert J. et al [7]	MSPD	HPLC-ESI-MS/MS	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, FB1, FB2, DON, T2, HT2, ZEA	Chufa
Jin P et al [11]	SPE	UPLC-ESI-MS/MS	DON, ZEA, OTA	Maíz
Beltrán et al [12]	SPE	UPLC-ESI-MS/MS	AFG1, AFG2, AFB1, AFB2, AFM1, OTA	Alimentos infantiles con base de cereales y leche
Cavaliere C et al [13]	SPE	HPLC-ESI - APPI-MS/MS	AFM1	Leche de vaca
Frenich A et al [16]	SPE	UPLC-ESI-MS/MS	DON, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, FB1, FB2, OTA, HT2, T2, ZEA	Maíz, Nuez, Galleta, Cereales de desayuno
Sörensen L et al [17]	SPE	HPLC-ESI-MS/MS	OTA, ZEA, FB1, FB2, T2, HT2, DON, AFM1	Leche
Solfrizzo M et al [18]	SPE	HPLC-ESI-MS/MS	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, FB1, FB2, DON, ZEA, T2, HT2	Maíz
Ren Y et al [19]	SPE	UPLC-ESI-MS/MS	DON, T2, HT2, ZEA, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, OTA	Cebada
Romero et al [20]	QuEChERS	UPLC-ESI-MS/MS	AFG1, AFG2, AFB1, AFB2, HT2, T2, OTA	Trigo
Sospedra et al [21]	QuEChERS	HPLC-ESI-MS/MS	DON, T2, HT2	Leche

## 2.3 Métodos de análisis

### 2.3.1 Cromatografía Líquida

La cromatografía líquida es una técnica de separación física en la cual los componentes de una muestra se separan en función de su distinta afinidad entre dos fases, una fase estacionaria contenida en una columna y una fase móvil líquida, normalmente constituida por una mezcla de disolventes de distinta fuerza eluotrópica, que fluye a través de la columna. El proceso cromatográfico ocurre como resultado de una repetición de etapas de absorción/desorción durante el movimiento de los analitos a través de la fase estacionaria. Finalmente, la separación es consecuencia de los diferentes coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, jugando un papel fundamental la elección de la columna y de la fase móvil. El tipo de cromatografía líquida llevada a cabo en este estudio se denomina Cromatografía líquida de alta presión o *High pressure liquid chromatography* (HPLC).

Una mejora introducida a la técnica de HPLC es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto y separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria.

Uno de los tipos de HPLC es la cromatografía en fase reversa, utilizada en este estudio. La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se le denomina HPLC sin ninguna especificación adicional.

Este tipo de cromatografía se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Aparte de la hidrofobicidad, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón para controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

### **2.3.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)**

El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfica constituye una herramienta que permite que se resuelvan con las suficientes garantías los problemas de identificación y cuantificación de sustancias. En efecto, cuando los detectores de masas por impacto electrónico operan en modo SCAN proporcionan una información espectral muy precisa sobre la identidad del producto, y cuando operan en modo SIM (modo de selección de ion) proporcionan una excelente sensibilidad con una alta especificidad, lo que posibilita el análisis cuantitativo.

Los últimos diez años han supuesto un cambio importante en la investigación en el campo de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS). Cada interfase aplica una tecnología diferente para resolver los dos problemas principales que plantea este tipo de conexión: a) eliminar la gran cantidad de gas, y vapor procedente de la fase móvil antes de entrar a la región de alto vacío del MS; y b) transformar las moléculas en solución de la fase móvil en iones en fase gaseosa sin que se produzca degradación térmica.

La sensibilidad del análisis por LC-MS va a depender tanto del analito que se trate, como de la interfase empleada. En este sentido, la LC-MS es una técnica adecuada para el análisis de sustancias polares, de peso molecular elevado y de sustancias termolábiles, sin tener que recurrir al proceso de derivatización .

### 2.3.3 *Interfase Electrospray (ESI)*

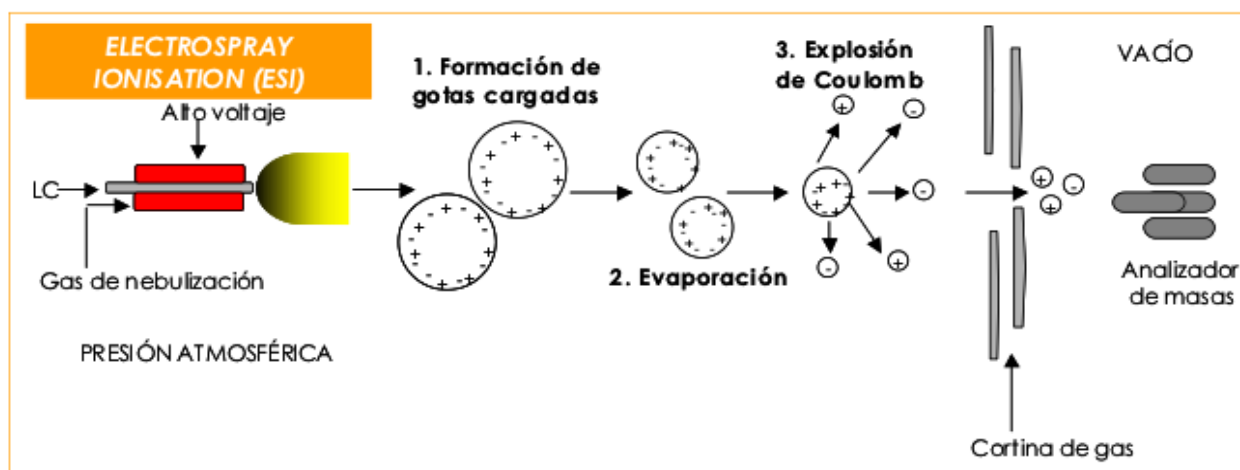
El nacimiento del acoplamiento de LC-ESI-MS fue descrito en 1984 casi simultáneamente por Yamashita y Fenn. A partir de este momento, el incremento de aplicaciones mediante el uso de esta técnica ha sido espectacular. En efecto, se trata de la técnica más extendida actualmente y la que cuenta con un mayor número de aplicaciones.

El proceso físico del electrospray se conoce desde hace bastante tiempo y es el mismo utilizado para procesos tan comunes como la producción de aerosoles para pintar, en la ciencia nuclear, en la liberación de fármacos para inhalación, etc.

En 1917 Zeleny descubre que un alto potencial eléctrico aplicado a un capilar produce la ruptura del solvente en finos hilos que posteriormente se desintegran en pequeñas gotas, y esta es todavía la base del diseño de todas las fuentes comerciales de ESI existentes.

En la fuente de ESI se distinguen dos electrodos: uno es el capilar de ES y el opuesto lo constituye la entrada de la cámara de presión intermedia del MS. Los valores normales de tensión en el capilar se sitúan entre 3 y 4 kV para la producción de iones positivos; ligeramente inferior y de polaridad opuesta para la producción de iones negativos. Es necesario mantener una diferencia de potencial en todo el recorrido que deben establecer los iones hasta el detector. La polaridad seleccionada dependerá de la carga (negativa o positiva) que posean los iones que interese analizar.

Bajo la influencia del campo eléctrico aplicado los iones de la misma polaridad migran hacia el líquido en el extremo del capilar, cuya superficie se alarga formando el denominado “cono de Taylor”. Cuando la acumulación de un exceso de iones de la misma polaridad en la superficie del líquido hace que la fuerza de repulsión columbimétrica supere a la tensión superficial del líquido, se emiten desde el capilar multitud de minúsculas gotas ( $\pm 1 \mu\text{m}$ ) cargadas de iones de la misma polaridad. Estas gotas van reduciendo su tamaño debido a fenómenos de evaporación del solvente (por efecto del gas y de la temperatura) y a la desintegración de las mismas gotas en otras de menor tamaño (3-10 nm) capaces de producir iones en fase gaseosa. Se consigue de esa manera una ionización muy suave de los analitos que se encontraban en la fase móvil.



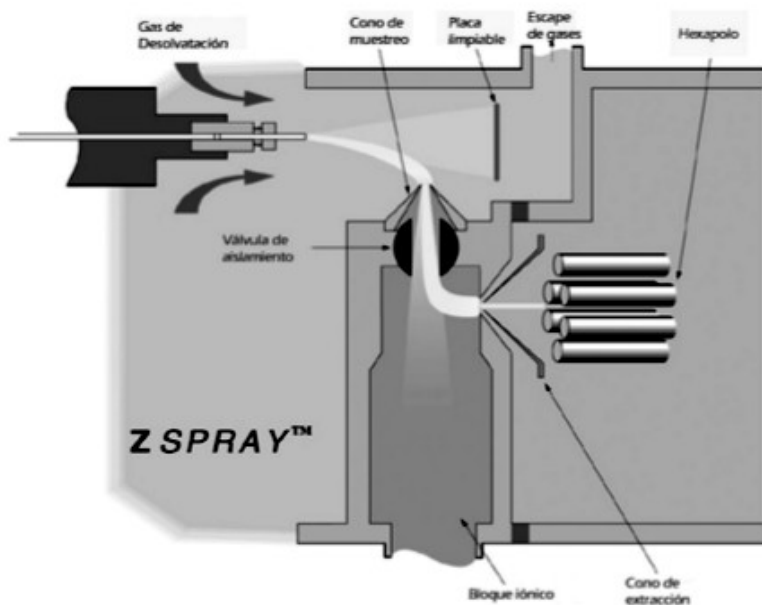
**Figura 12: Esquema conceptual de la ionización por electro spray**

Los iones formados se “extraen” del spray gracias a la diferencia de potencial existente entre el capilar y el cono de entrada. Al entrar en la cámara de presión intermedia las moléculas neutras y los aductos iónicos del solvente son eliminados gracias a una corriente de gas en sentido contrario que impide la entrada de dichas sustancias y a la aceleración de los iones hacia la zona de baja presión del MS. Si se aumenta la aceleración de los iones (aumentando la diferencia de potencial entre los dos electrodos), se puede producir su ruptura por fenómenos de colisión con moléculas de gas residual procedente de la fase móvil y del N<sub>2</sub> utilizado como gas de nebulización.

Esta interfaz no proporciona una ionización universal, todavía existen numerosos compuestos que no pueden ser ionizados por esta técnica, por lo que el desarrollo de nuevas interfases que solventen este problema sigue en constante evolución.

En este proyecto se ha utilizado la interfase en electro spray, cuyo esquema se muestra en la siguiente figura. Una sonda que proporciona un flujo de gas concéntrico a la corriente de fase móvil ayuda a la formación de gotas desde el líquido.





**Figura 13: Esquema de la interfase electrospray empleada**

La interfase electrospray es posiblemente la más utilizada ya que es aplicable a una gran variedad de analitos polares y térmicamente lábiles, tanto de bajo como de elevado peso molecular, y además es compatible con un amplio rango de condiciones HPLC.

### 2.3.4 Espectrometrómetro de masas

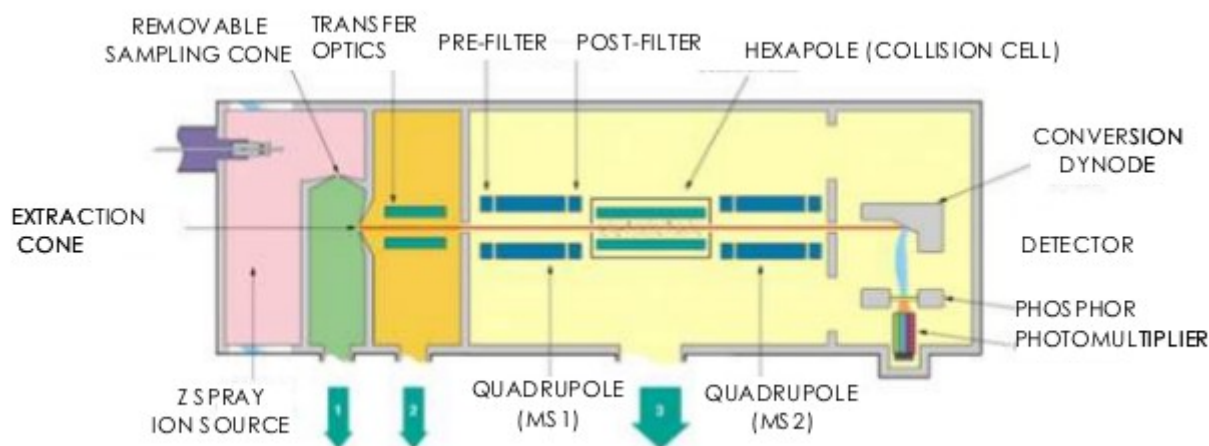
La principal distinción entre los diversos espectrómetros de masas se encuentra en el tipo de analizador utilizado. El analizador es la parte del instrumento que permite separar, trabajando a muy bajas presiones, los iones en fase gaseosa que se han formado en la fuente de ionización, en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Los cinco analizadores de mayor relevancia que se pueden encontrar actualmente son el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), trampa de iones (IT, LIT), sector magnético y resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICRMS). Como todos los análisis de este proyecto se han realizado con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) voy a pasar a describir sus características, funcionamiento, ventajas e inconvenientes.

#### Triple cuadrupolo (QqQ)

Cuando se desea utilizar MS para la elucidación estructural es necesaria una mayor información que la obtenida por los iones generados en el proceso de ionización. Esta información adicional se puede obtener a partir de la fragmentación de estos iones, es decir, a partir de la espectrometría de masas en tándem.

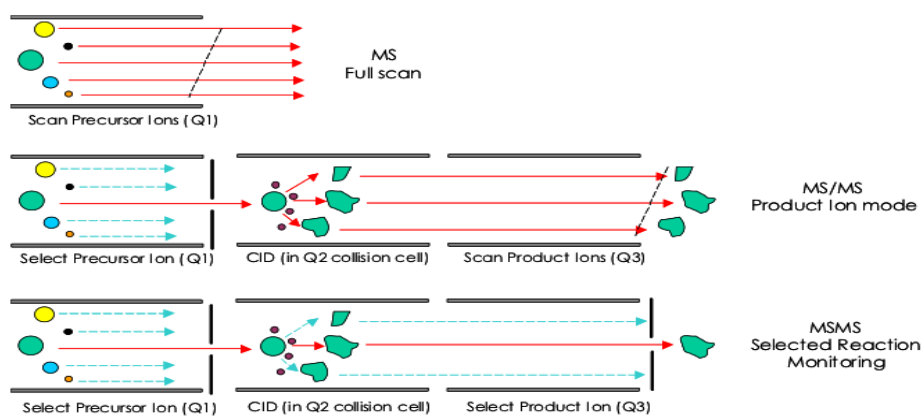
En el caso de instrumentos de filtro cuadrupolar, el uso de MS/MS implica necesariamente la adición de dos cuadrupolos extra a un instrumento de cuadrupolo lineal, tal y como se muestra en la Figura 14.

La fragmentación se produce por colisión del ion seleccionado (ion precursor) con moléculas de gas inerte (generalmente argón). Este proceso recibe el nombre de disociación inducida por colisión (CID) y se produce en dos etapas: en la primera, la energía translacional del ion se convierte en energía interna tras colisionar con las moléculas del gas inerte; en la segunda, esta energía interna se utiliza para romper el ion en varios fragmentos (iones producto). Así, en el primer cuadrupolo se puede aislar un ion de  $m/z$  determinada que pasa al segundo cuadrupolo, usado como celda de colisión, donde tiene lugar la fragmentación de los iones al chocar contra las moléculas de gas inerte.



**Figura 14: Estructura de un triple cuadrupolo**

Cuando se trabaja con un triple cuadrupolo se pueden utilizar distintos modos de barrido en función del objetivo final del análisis. Así, en modo MS se puede realizar un barrido de todos los iones (full scan) o seleccionar un ion concreto para ser monitorizado (Selected Ion Monitoring, SIM). Cuando se trabaja en modo MS/MS se pueden realizar barridos de iones producto, barridos de iones precursores, de pérdidas neutras, o la monitorización de una transición concreta (Selected Reaction Monitoring, SRM), aumentando la sensibilidad y la selectividad (Figura 15).



**Figura 15: Esquema de los modos de barrido utilizados**

Mediante el uso de LC-MS/MS se consigue aumentar tanto la sensibilidad como la selectividad de los métodos de análisis, aumentando la seguridad de que el compuesto determinado incluso a muy bajos niveles de concentración, es el analito buscado y no otro componente de la matriz. La gran selectividad que proporciona la técnica evita, en general, tener que realizar separaciones cromatográficas exhaustivas, incluso en compuestos de polaridades muy similares que coeluyen entre sí.

Así, en LC-MS/MS podemos obtener una “doble separación”, una producida en la columna cromatográfica y la otra en el analizador. De este modo, se pueden diferenciar analitos con idéntico tiempo de retención pero con distintas transiciones y viceversa. A pesar de ello, no debe menospreciarse el papel que juega la cromatografía en la disminución del efecto matriz y en las posibles interferencias que podrían afectar a alguna de las transiciones adquiridas.

El inconveniente que tienen los métodos LC-MS/MS es la exaltación o supresión de la señal analítica como consecuencia del efecto que tienen compuestos interferentes presentes en la matriz en el proceso de ionización del analito. Este hecho puede afectar directamente a la calidad de los resultados provocando que se reporten datos cuantitativamente incorrectos cuando se utilizan patrones preparados en ausencia de matriz.

El efecto matriz depende de factores como la interfase utilizada, la matriz objeto de análisis, las características físico-químicas del analito y sobre todo, de los interferentes que eluyen al mismo tiempo de retención que él. Con motivo de disminuir al máximo este efecto se va optar por realizar rectas de calibrado en matriz, ya que no requiere ninguna etapa adicional de tratamiento de muestra y, generalmente, permite cuantificaciones satisfactorias .

### 3. PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo los objetivos descritos anteriormente, en primer lugar se ha realizado una búsqueda bibliográfica sobre las micotoxinas, sus características, toxicología, matrices en las que se encuentran, efectos adversos en la salud en humanos y los límites estipulados por la Comunidad Europea. Además, se han recopilado los distintos métodos de extracción en fase sólida y de análisis de estos compuestos y las consideraciones generales para su análisis mediante LC-MS/MS.

En segundo lugar se ha realizado la puesta a punto de las condiciones del espectrómetro de masas para determinar el ion precursor y los dos iones producto más importantes para llevar a cabo la cuantificación y confirmación de cada analito; así como los diversos parámetros de ionización.

Seguidamente se estudiaron las condiciones óptimas del método cromatográfico mediante la inyección de patrones estándar de cada analito. Se investigaron el gradiente de elución, la velocidad de flujo, la temperatura de análisis y el volumen de inyección en el sistema cromatográfico para obtener la mayor eficacia en la cromatografía.

Después se realizó una comparativa entre las recuperaciones obtenidas con dos métodos de extracción en fase sólida, el método convencional [11, 15, 19] y el método QuEChERS, optando por éste último debido a la notable mejora de las recuperaciones de algunos analitos de estudio.

Por último se llevó a cabo la validación del método en términos de selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión interdía, límites de cuantificación (LOQs) y también se analizó cómo afecta el efecto matriz para cada una de las micotoxinas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos y productos químicos

Ácido fórmico (pureza > 98%) fue obtenido de Panreac, acetonitrilo para HPLC (pureza > 99.9 %), metanol para HPLC (pureza > 99.9%) y agua para HPLC se han obtenido de Sigma-Aldrich. Sulfato magnésico anhidro extra puro (pureza > 98%), cloruro sódico (pureza > 99.5 %) y citrato trisódico dihidratado (pureza > 99.5%) se obtuvieron de Scharlau, ácido cítrico sesquihidratado (pureza > 99%) de Acros Organics. Kit de Clean-up de Sampli-Q: C18, PSA y sulfato magnésico. Los patrones de micotoxinas (pureza > 98% en todos los casos) se obtuvieron de Doctor Ehrenstorfer y Fluka.

Para la preparación de las disoluciones patrón primarias de micotoxinas se han utilizado los siguientes volúmenes y concentraciones:

**Tabla 3: Disoluciones patrón primarias**

Analito	Concentración disolución patrón 1 <sup>aria</sup> (mg/L)	Volumen final (ml)	Disolvente utilizado
Aflatoxina B1	97.50	50	Acetonitrilo HPLC
Aflatoxina B2	99.70	50	Acetonitrilo HPLC
Aflatoxina G1	98.00	50	Acetonitrilo HPLC
Aflatoxina G2	97.10	50	Acetonitrilo HPLC
Aflatoxina M1	0.50	2	Acetonitrilo HPLC
Deoxinivalenol	99.40	50	Acetonitrilo HPLC
Fumonisina B1	97.60	50	Acetonitrilo HPLC:Agua (50:50)
Fumonisina B2	50.00	2	Acetonitrilo HPLC:Agua (50:50)
Ocratoxina A	99.50	50	Acetonitrilo HPLC
Toxina HT-2	100.00	2	Acetonitrilo HPLC
Toxina T-2	99.70	50	Acetonitrilo HPLC
Zearalenona	91.45	50	Acetonitrilo HPLC

Para la preparación de las disoluciones patrón secundarias de micotoxinas se han dividido las distintas micotoxinas en 5 grupos (resaltados con distintos colores) según sus LMRs. Se han utilizado los siguientes datos, siendo el volumen final de todas las disoluciones (por grupos) de 10 ml:

**Tabla 4: Disoluciones patrón secundarias**

Disolución	Analito	C disolución patrón 1 <sup>aria</sup> (mg/L)	V pipeteado disolución patrón 1 <sup>aria</sup> (µl)	C disolución patrón 2 <sup>aria</sup> (mg/L)	V de disolución 2 <sup>aria</sup> final (ml)
A	Aflatoxina B1	97.50	5000	0.1	10
	Aflatoxina B2	99.70	5000	0.1	
	Aflatoxina G1	98.00	5000	0.1	
	Aflatoxina G2	97.10	5000	0.1	
B	Aflatoxina M1	0.50	25.00	0.00125	10
C	Deoxinivalenol	99.40	1323.73	10	10
	Fumonisina B1	97.60	512.30	5	
	Fumonisina B2	50.00	1000.00	5	
D	Ocratoxina A	99.50	50.25	0.1	10
E	Toxina HT-2	100.00	100.00	1	10
	Toxina T-2	99.70	100.30	1	
	Zearalenona	91.45	109.35	1	

Las disoluciones de trabajo que se utilizaron para las rectas de calibrado se obtuvieron a partir de las disoluciones patrón secundarias de cada uno de los grupos anteriores. Para ello, se utilizaron los siguientes volúmenes de la disolución patrón secundario que se recogen en la Tabla 5:

**Tabla 5: Disoluciones de trabajo para recta de calibrado**

Disolución	Analito	C disolución patrón 2 <sup>aria</sup> (mg/L)	V pipeteado disolución patrón 2 <sup>aria</sup> (µl)	C disolución de trabajo (mg/L)	V de disolución de trabajo (ml)
A1	Aflatoxina B1	0.1	50	0.0005	10
	Aflatoxina B2				
	Aflatoxina G1				
	Aflatoxina G2				
B1	Aflatoxina M1	0.00125	1000	0.000125	10
C1	Deoxinivalenol	10	1000	1	10
	Fumonisina B1	5	1000	0.5	
	Fumonisina B2	5	100	0.5	
D1	Toxina HT-2	1	1000	0.1	10
	Toxina T-2				
	Zearalenona				
E1	Ocratoxina A	0.1	250	0.0025	10

La Tabla 6 muestra los volúmenes de estas disoluciones de trabajo (A1, B1, C1, D1 y E1) que son necesarios para construir los puntos de las rectas de calibrado (Tabla 8), enrasando hasta un volumen de 2 ml con una mezcla agua:metanol (90:10).

**Tabla 6: Volúmenes de la disolución de trabajo para construir rectas de calibrado**

Punto de la recta	P1	P2	P3	P4	P5
V pipeteado de cada disolución de trabajo (µl)	25	50	125	250	500
V disolución TPP 0.5 ppm (µl)	50	50	50	50	50
V ACN al 0.1% de fórmico (µl)	275	250	175	50	0

Para realizar los fortificados en matriz se han utilizado las mismas disoluciones secundarias que en el caso de las rectas de calibrado, pero en este caso las concentraciones de las disoluciones de trabajo son 10 veces más concentradas que las de las rectas de calibrado.

**Tabla 7: Disoluciones de trabajo para fortificados**

Disolución	Analito	C disolución patrón 2 <sup>aria</sup> (mg/L)	V pipeteado disolución patrón 2 <sup>aria</sup> (ml)	C disolución de trabajo (mg/L)	V de disolución de trabajo (ml)
A2	Aflatoxina B1	0.1	0.5	0.005	10
	Aflatoxina B2				
	Aflatoxina G1				
	Aflatoxina G2				
B2	Aflatoxina M1	0.00125	10	0.00125	10
C2	Deoxinivalenol	10	10	10	10
	Fumonisina B1	5	10	5	
	Fumonisina B2	5	1	5	
D2	Toxina HT-2	1	10	1	10
	Toxina T-2				
	Zearalenona				
E2	Ocratoxina A	0.1	2.5	0.025	10

Tanto para la recta de calibrado en matriz como para los fortificados, las concentraciones en µg/Kg o ppb de cada uno de los puntos son las mismas y se resumen en la Tabla 8:

**Tabla 8: Concentraciones de la recta de calibrado y fortificados para cada analito**

<b>Analito</b>	<b>P1 (ppb)</b>	<b>P2 (ppb)</b>	<b>P3 (ppb)</b>	<b>P4 (ppb)</b>	<b>P5 (ppb)</b>
Aflatoxina B1	0.05	0.10	0.25	0.50	1.0
Aflatoxina B2	0.05	0.10	0.25	0.50	1.0
Aflatoxina G1	0.05	0.10	0.25	0.50	1.0
Aflatoxina G2	0.05	0.10	0.25	0.50	1.0
Aflatoxina M1	0.0125	0.025	0.0625	0.125	0.250
Fumonisina B1	50	100	250	500	1000
Fumonisina B2	50	100	250	500	1000
Toxina T-2	10	20	50	100	200
Toxina HT-2	10	20	50	100	200
Zearalenona	10	20	50	100	200
Ocratoxina A	0.25	0.50	1.25	2.50	5.0
Deoxinivalenol	100	200	500	1000	2000

## 4.2 Equipos

El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo en un sistema ACQUITY UPLC *H CLASS* (Waters, Milford, MA, USA), usando una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2.1 mm), con 1.7  $\mu$ m de tamaño de partícula, de Water. La detección mediante MS/MS se realizó usando un Acquity TQD, espectrómetro de masas triplecuadrupolo en tándem Xevo TQ-S (Waters, Manchester, UK). El instrumento opera usando ionización en electrospray (ESI) en modo positivo. La adquisición de los datos se ha llevado a cabo en el software MassLynx versión 4.1 con el software QuanLynx (Waters). La balanza analítica de alta resolución es del modelo XP-Excellences Plus (Mettler Toledo, Greinfesee, Suiza), la centrífuga utilizada ha sido una Orto Alresa Digitor 21. También se ha utilizado para la extracción de la muestra un agitador rotatorio Agytax SR1-CP38 y para la homogeneización de la matriz una trituradora SKE-8 (Sammic).

## 4.3 Condiciones de análisis por UPLC-MS/MS

El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo usando una elución en gradiente con una fase acuosa (A) compuesta formiato amónico 2 mM en agua y 0.1% de ácido fórmico y una fase orgánica (B) compuesta por metanol con un 0.1% de ácido fórmico. El gradiente escogido es:



**Tabla 9: Gradiente de análisis**

T (min)	Inicial	0.5	0.7	6.00	8.50	9.50	11.50	12.50	13.50	14.50	15.50	16.50	16.60	19.0
Fase A (%)	5	20	20	40	55	55	65	65	70	75	85	100	5	5
Fase B (%)	95	80	80	60	45	45	35	35	30	25	15	0	95	95

La velocidad de flujo fue 400  $\mu\text{l}/\text{min}$ , la temperatura se fijó en 50 °C y el volumen de muestra inyectado en el sistema cromatográfico fue de 10  $\mu\text{l}$ .

Para la detección MS/MS, los parámetros de ionización fueron: voltaje de capilar 1.0 kV, voltaje de extractor 50 V, temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 450 °C, flujo gas de cono 150 L/h y flujo de gas de desolvatación 1000 L/h (ambos gases fueron nitrógeno). La disociación por colisión se llevó a cabo con argón como gas de colisión a la presión de  $4.03 \times 10^{-3}$  mbar en la célula de colisión y flujo de gas de colisión 0.18 ml/min. Las transiciones en modo MRM, energías de colisión y tiempos de retención se resumen en la Tabla 10.

#### 4.4 Preparación de la muestra

Las micotoxinas se han extraído de las muestras usando el método QuEChERS. Para ello, se pesan 5 g de matriz (trigo y leche en polvo) en un tubo de teflón, se añaden 10 ml de agua (ya que no son matrices hidratadas) y 10 ml de acetonitrilo con tetrafenilporfirina (TPP), el cual actúa como patrón subrogado y sirve para medir la eficiencia de la extracción. Se ha elegido el TPP ya que esta molécula presenta propiedades similares a las de las micotoxinas que se quieren cuantificar. De esta forma, se añade una determinada cantidad conocida al inicio del análisis para determinar la cantidad de dicho patrón subrogado que perdemos durante la extracción.

Se agita vigorosamente la mezcla durante 10 segundos y se adicionan: 4 g de sulfato magnésico anhidro, 1 g de cloruro sódico, 1 g de citrato trisódico dihidratado y 0.5 g de citrato disódico sesquihidratado. Después se introduce el tubo en el Agitax con el método MICOTOXINAS LC-MS/MS (amplitud 120 mm, velocidad 2 m/s, aceleración  $60 \text{ m/s}^2$ , brusquedad nivel 5, delay 0 segundos) durante 25 minutos. Seguidamente se centrifuga durante 5 minutos a 4500 rpm, quedando separadas la fase orgánica y la fase acuosa por las sales.

Para el análisis de ambas matrices es necesario hacer una etapa previa de clean-up o SPE dispersiva, debido a que las dos matrices tienen un contenido  $> 1\%$  en ácidos grasos y lípidos, concretamente, la leche en polvo utilizada contiene un porcentaje de grasa del 13.64%. Para ello, se transfiere 1 ml del extracto a un microtubo de centrifuga y se le adicionan 25 mg de PSA, 25 mg de C18 y 150 mg de  $MgSO_4$ . Se agita durante 30 segundos en un Wortex y posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm. Por último se extraen 250  $\mu$ l de la fase orgánica, se vierten en un vial específico para cromatografía líquida y se le añaden 750  $\mu$ l de disolución acuosa al 0.1% de ácido fórmico. Por último se inyecta la muestra en el sistema UPLC-MS/MS.

#### **4.5 Análisis de muestras reales**

Para el análisis se recopilieron varias muestras de trigo de un supermercado de la localidad de Vúcar (Almería, España), un bote de leche en polvo Nutribén Crecimiento 3 comprado en una farmacia de la misma zona y varias muestras de papilla de cereales adquiridas en la empresa Hero España, S.A. Se analizaron antes de que expirase la fecha de caducidad. Todas las muestras se evaluaron siguiendo el procedimiento descrito y aquellas en las que no se observaron los compuestos de interés, se utilizaron como muestras blancas para la preparación de fortificados.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este proyecto se ha desarrollado un método sencillo y rápido para la determinación de micotoxinas en alimentos infantiles con base de cereales y leche para lactantes y leche de continuación mediante UPLC-MS/MS.

### 5.1 Optimización de la determinación UPLC-MS/MS

Para poder seleccionar las transiciones apropiadas de cada uno de los analitos se prepararon estándares de cada uno de ellos con una concentración de 1ppm en metanol:agua acidificada al 0.1% con ácido fórmico (90:10) (v/v). Estas disoluciones se infundieron directamente en el detector masas.

Se realizó un barrido en full-scan y un barrido de iones producto con ionización en modo positivo para obtener al menos un ion precursor y dos iones producto de cada compuesto para identificación y cuantificación, seleccionando el ion producto más abundante para cuantificación y el segundo para confirmación, tal y como recomienda la guía Sanco en la versión del año 2011. La Tabla 10 muestra los tiempos de retención (min), las transiciones MS/MS así como las energías de colisión (EC) y voltajes de cono (V) optimizados para cada compuesto.

**Tabla 10: Parámetros MS/MS**

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Transición de Cuantificación	EC (eV)	Transición de Confirmación	EC (eV)	Voltaje de cono (V)
Deoxivalenol	2.42	297.1>249	13	297.1>231	10	20
Aflatoxina B1	7.43	313>285	37	313>241	23	50
Aflatoxina B2	6.86	315.1>259.1	30	315.1>287.1	26	50
Aflatoxina G1	6.31	329>243	25	329>283	25	40
Aflatoxina M1	5.90	329>273	25	329>259	20	30
Aflatoxina G2	5.74	331.1>245.1	30	331.1>257.1	30	50
Toxina HT-2	9.66	447.3>345	20	447.3>285	16	35
Toxina T-2	10.92	484>215	10	484>305	10	10
Fumonisina B1	10.41	772.3>334.3	40	722.3>352.3	38	50
Fumonisina B2	12.81	706.3>336.3	40	706.3>318.3	40	50
Ocratoxina A	11.97	404.1>239.1	19	404.1>358.1	14	31
Zearalenona	11.45	319.1>187	19	319.1>185	2	20

En todos los casos, el compuesto  $[M+H]^+$  ha sido el seleccionado como el compuesto padre, excepto para las toxinas T-2 y HT-2 y para la Ocratoxina A. Para las toxinas se ha seleccionado el aducto de amonio  $[M+NH_4]^+$ ; mientras que para la Ocratoxina A la transición más intensa es 358 m/z, y corresponde a la pérdida de agua y de monóxido de carbono, y la transición de confirmación seleccionada es 239 m/z, que corresponde a la pérdida de fenilalanina [22].

Aunque hay publicaciones en las que se determinan Deoxinivalenol y Zearalenona en ESI en modo negativo [17], en mi caso no he tenido problemas para determinarlas en modo positivo.

El gradiente elegido para el análisis de micotoxinas es el mismo que se tiene implantado para el método multiresiduo de plaguicidas de dicho laboratorio, y en muestra a los buenos resultados obtenidos tanto para micotoxinas como para una batería de 230 plaguicidas se decidió no modificar ni las fases móviles ni el gradiente. Lo mismo ocurre con otros parámetros como la velocidad de flujo, el volumen de inyección y la temperatura de la columna. En próximos trabajos está previsto desarrollar un método multiresiduo de análisis simultáneo de micotoxinas y plaguicidas; y es por ello por lo que el gradiente llega hasta los 19 minutos de análisis.

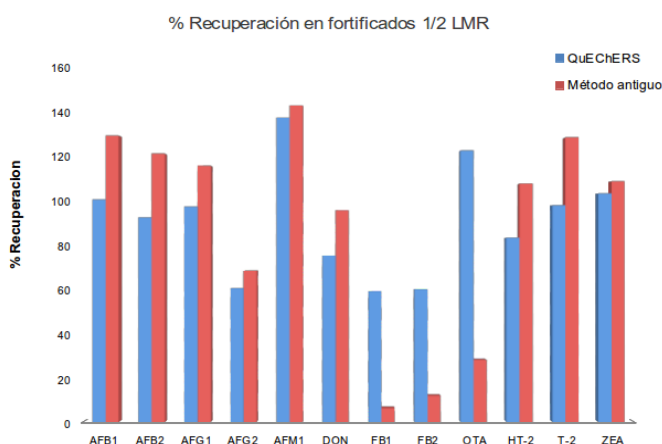
La cromatografía se realizó en condiciones ácidas debido a que las Fumonisinias tienen grupos carboxílicos en su estructura molecular, por lo que para obtener picos representativos se adicionó ácido fórmico al 0.1% a la fase móvil acuosa.

## **5.2 Optimización del procedimiento de extracción**

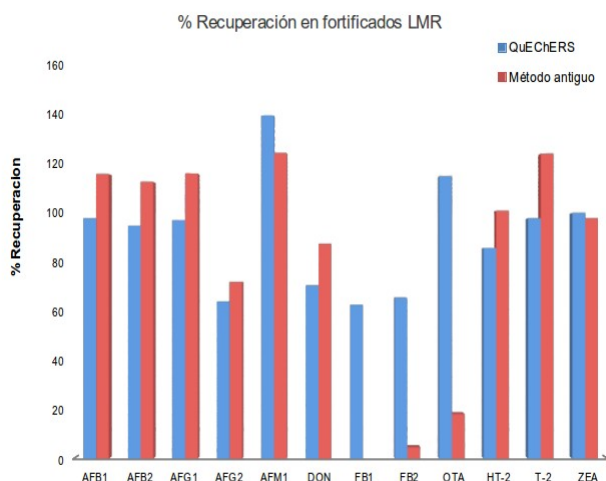
Antes de realizar la extracción con el método QuEChERS descrito anteriormente, se empleaba el método de extracción en fase sólida que más se utiliza para el análisis de micotoxinas, y que está ampliamente recogido en bibliografía [11, 15, 19]. Se llevaba a cabo de la siguiente forma: se pesaban 5 g de matriz, se adicionaban 10 mL de AcN:H<sub>2</sub>O (80:20) al 0.1 % en ácido fórmico + TPP, después se politroneaba durante 1 min en un Ultraturrax, se centrifugaba durante 5 minutos a 4500 rpm y 3 ml del extracto se pasaban por un cartucho Bond Elut Micotoxinas. Por último, 250 µl del extracto se introducían en un vial específico de cromatografía líquida y se le adicionaban 750 µl de agua al 0.1 % en fórmico.

Mediante este método, se conseguía extraer la mayoría de las micotoxinas de análisis con buenas recuperaciones, pero se obtenían recuperaciones muy bajas o nulas para las Fumonisinias B1 y B2, y para la Ocratoxina A.

Por ello, se decidió probar el método QuEChERS. El hecho de obtener resultados muy parecidos por ambos métodos en las recuperaciones del resto de micotoxinas en trigo y leche en polvo, y de poder extraer con mayor efectividad tanto las Fumonisinias como la Ocratoxina A llevó a la implantación definitiva del QuEChERS como método óptimo para la extracción. Además, el método QuEChERS es el utilizado en los demás análisis de la empresa, por lo que se prefirió tener un sólo método de extracción independientemente de la matriz y del tipo de análisis a realizar. La variación de las recuperaciones dependiendo del método de extracción se puede observar en las Figuras 16 y 17:

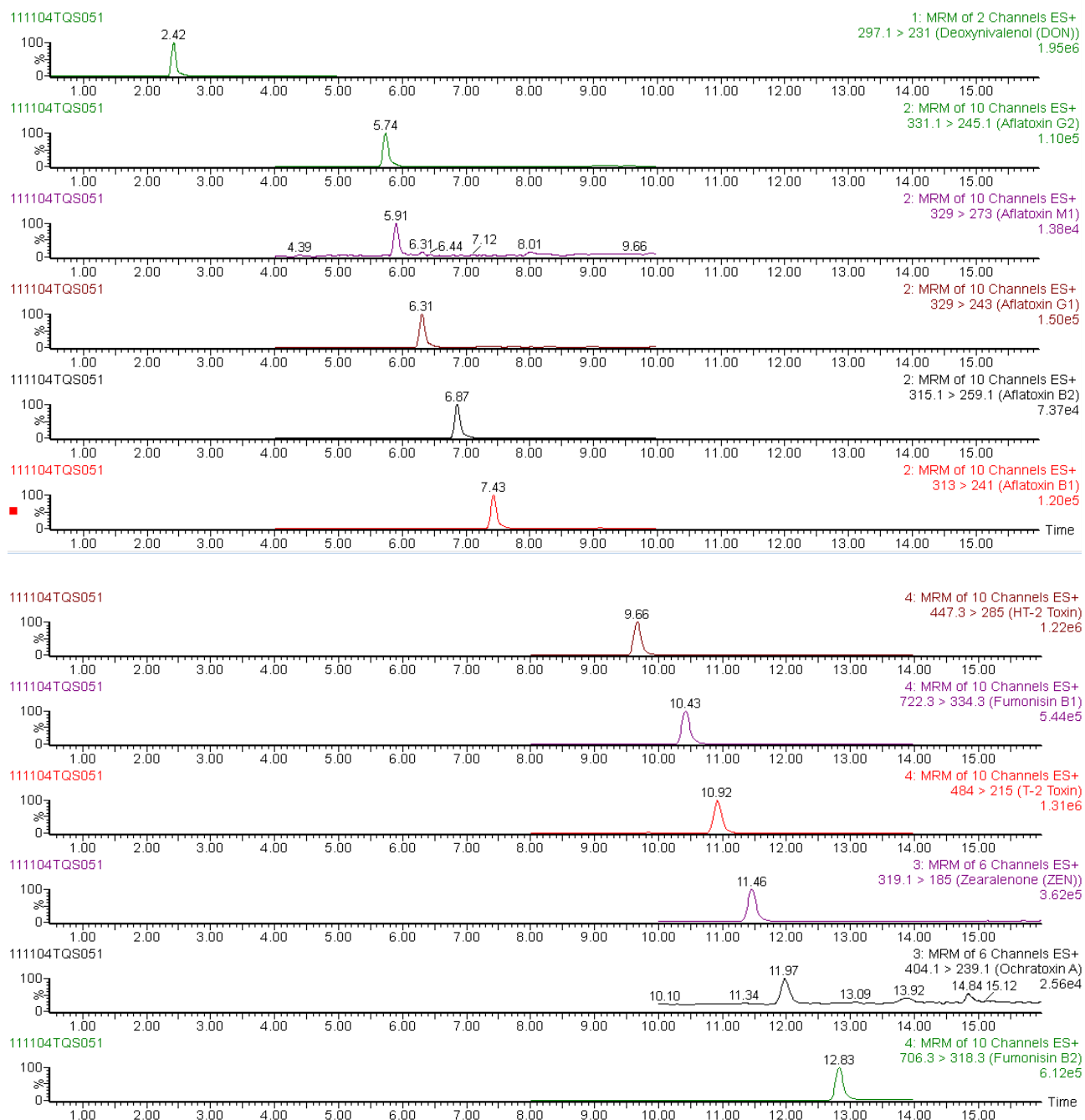


**Figura 16: Comparación del % Recuperación en fortificados entre método QuEChERS y método antiguo a concentraciones de 1/2 del LMR**



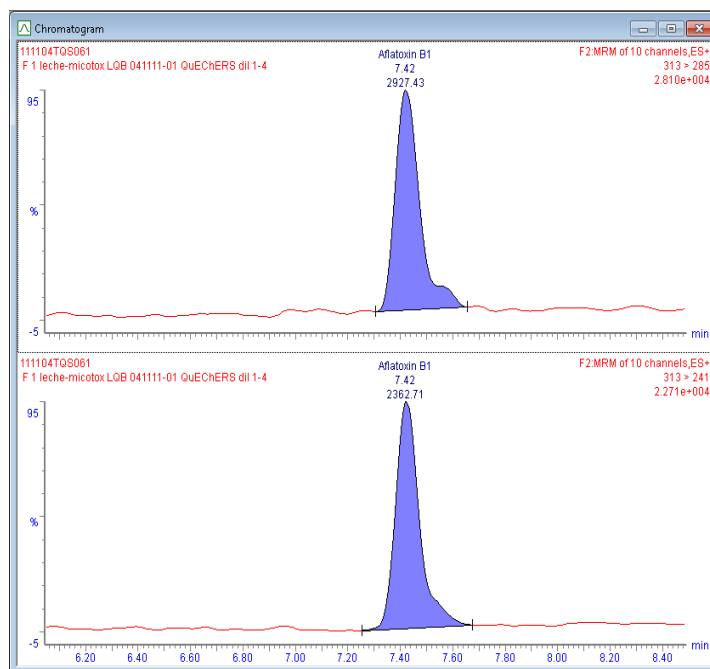
**Figura 17: Comparación del % Recuperación en fortificados entre método QuEChERS y método antiguo a concentraciones en el LMR**

La figura 18 representa los cromatogramas correspondientes a una muestra blanca de leche en polvo contaminada con todos los analitos en el nivel del LMR (P2 de la Tabla 8), y muestra todas las micotoxinas por separado y ordenadas por sus respectivos tiempos de retención. Se puede observar que mediante el procedimiento de extracción acoplado a MS/MS propuesto se obtienen cromatogramas limpios y sin interferencias a estos niveles de concentración tan bajos.

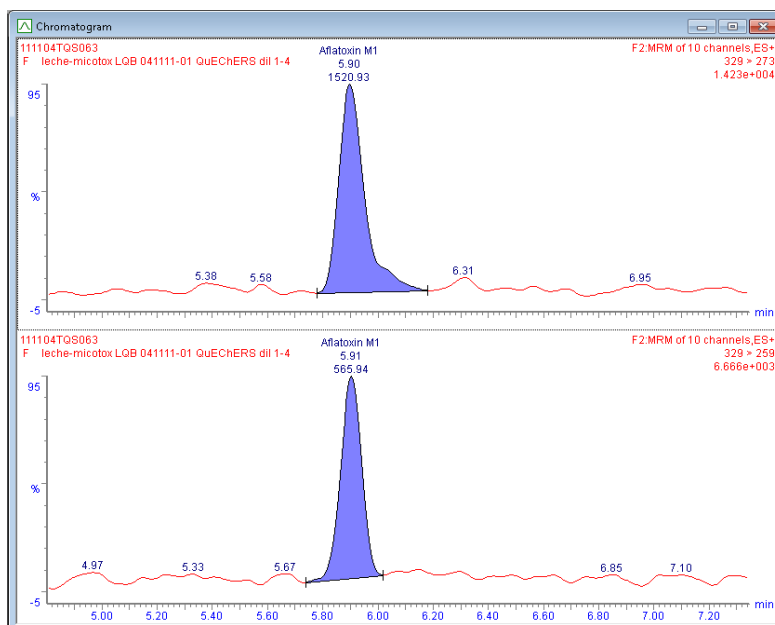


**Figura 18: Cromatograma UPLC-MS/MS obtenido de una muestra blanca de leche en polvo contaminada con los analitos en el nivel del LMR para cada uno de ellos (P2 Tabla 8)**

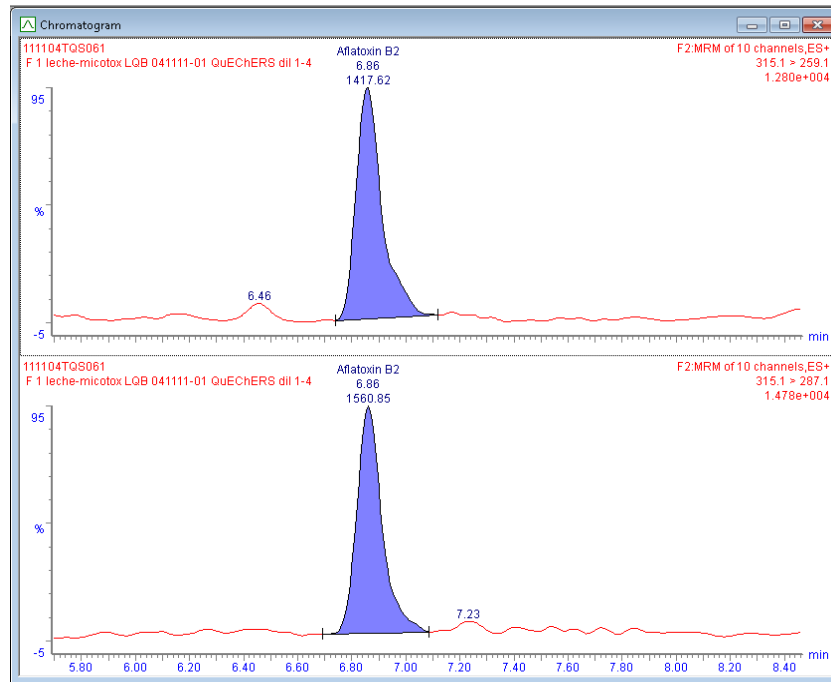
Para asegurar la sensibilidad del equipo a concentraciones tan bajas en muestras reales contaminadas, se adjuntan las siguientes imágenes (Figuras 19 - 30); las cuales representan cromatogramas de muestras blancas de leche en polvo contaminadas con todas las micotoxinas a concentraciones en el LMR.



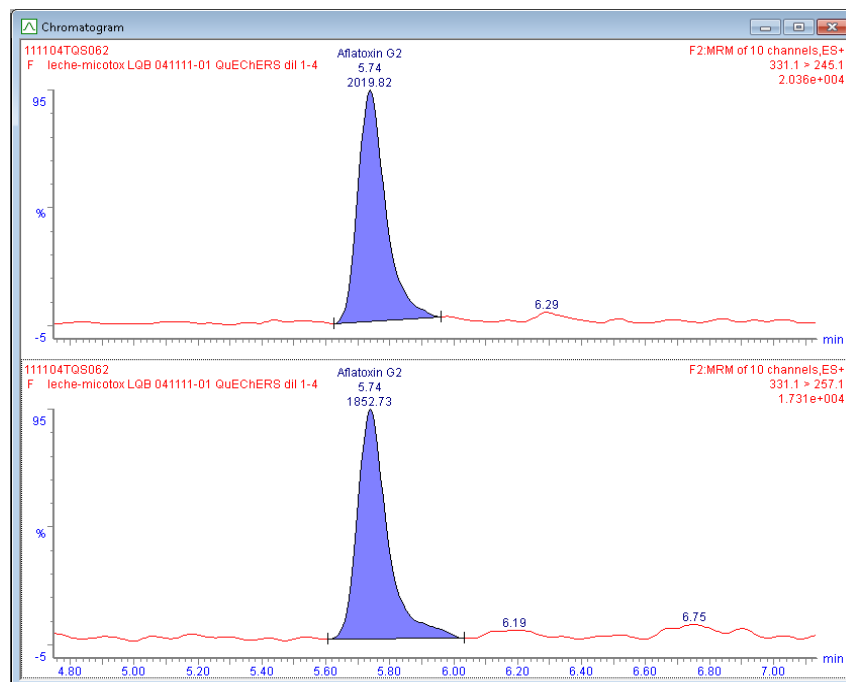
**Figura 19: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con AFB1(0.1 µg/Kg). Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



**Figura 20: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con AFM1(0.025µg/Kg). Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**

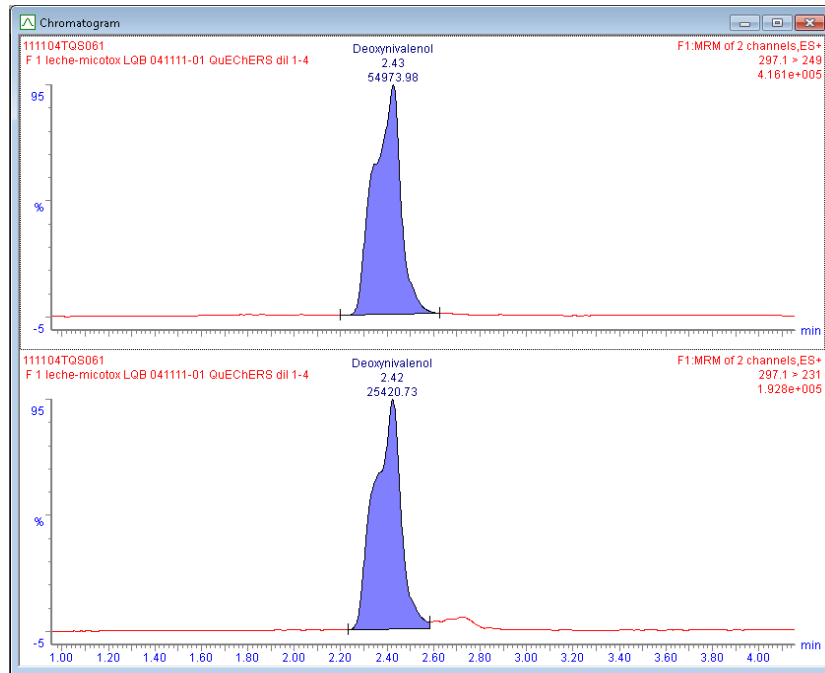


**Figura 21: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con AFB2 (0.1 µg/Kg). Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**

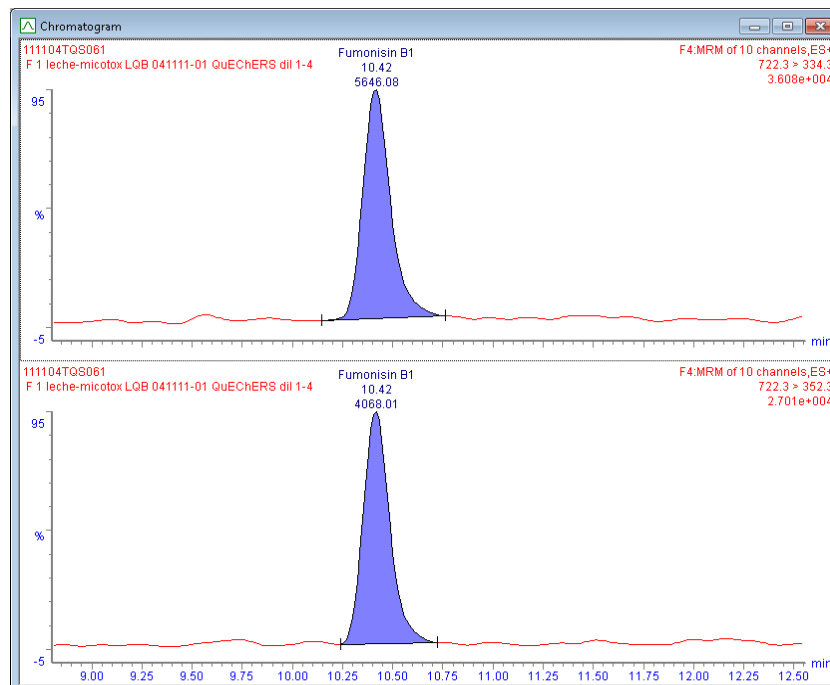


**Figura 22: Cromatograma de muestra real de leche en polvo contaminada con AFG2 (0.1µg/Kg). Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**

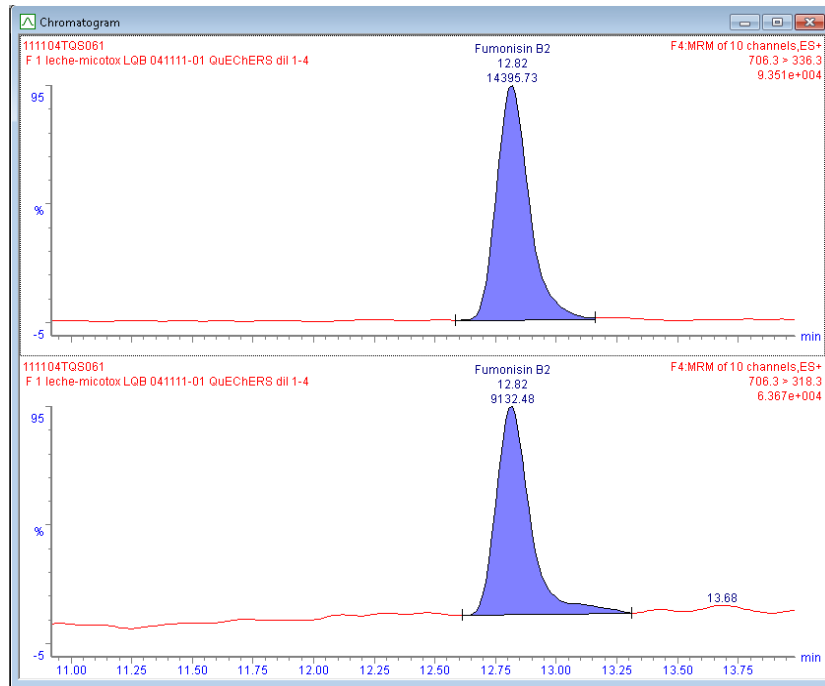




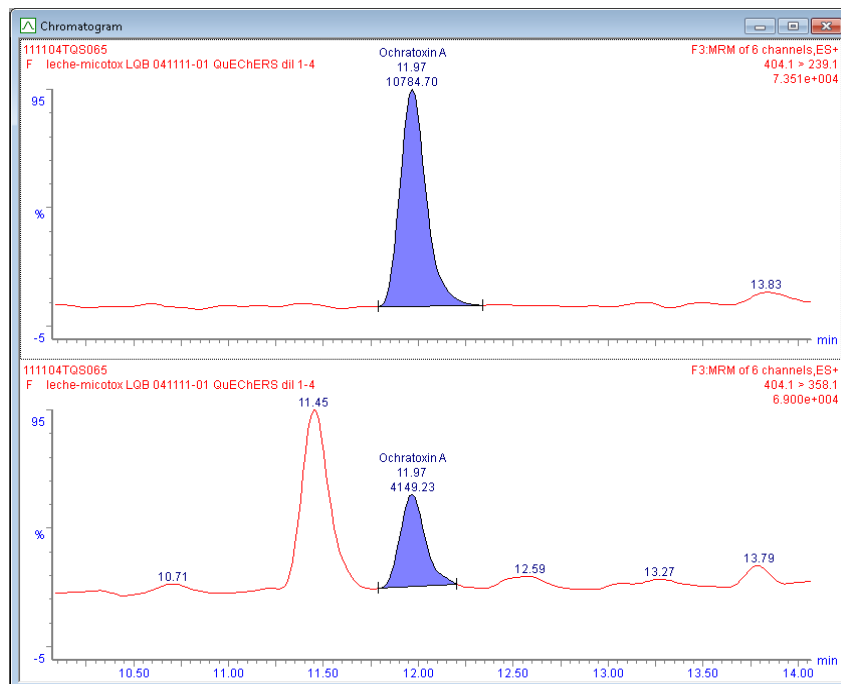
**Figura 23: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con DON (200 µg/Kg).  
Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



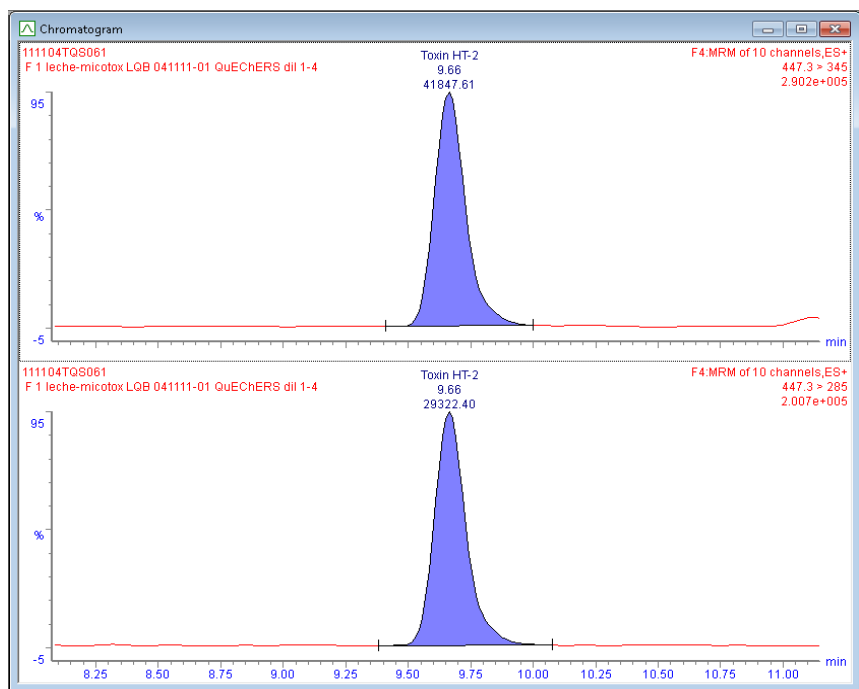
**Figura 24: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada FB1 (100 µg/Kg).  
Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



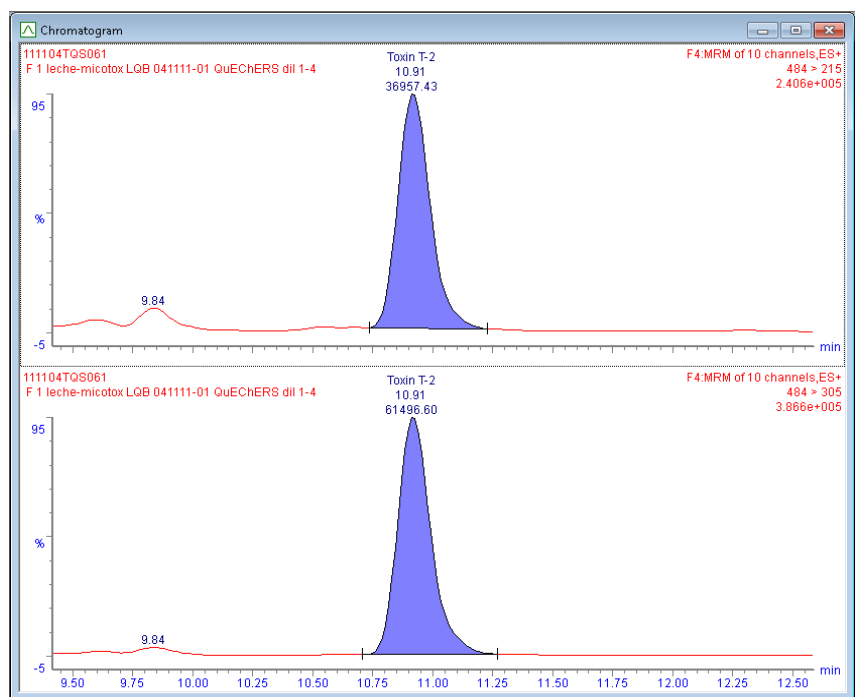
**Figura 25: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con FB2 (100 µg/Kg).  
Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



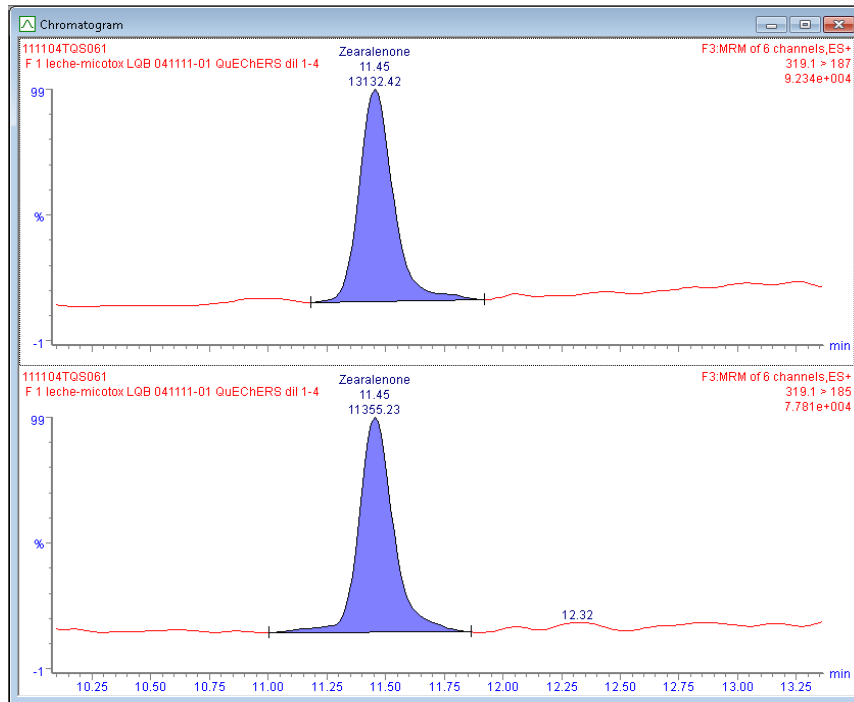
**Figura 26: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con OTA (0.5 µg/Kg).  
Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



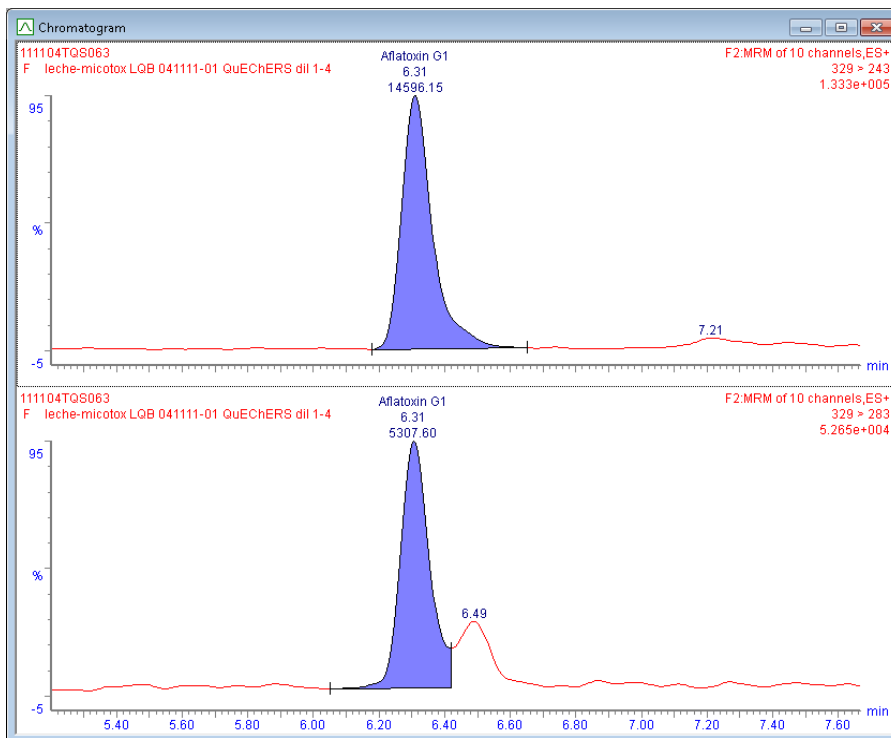
**Figura 27: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con HT-2 (20 µg/Kg).  
Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



**Figura 28: Cromatograma muestra real de leche en polvo contaminada con T-2 (20 µg/Kg).  
Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



**Figura 29: Cromatograma muestra real de leche en polvo con ZEA (20 µg/Kg). Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**



**Figura 30: Cromatograma muestra real de leche en polvo con AFG1 (0.1 µg/Kg). Transiciones de cuantificación y confirmación, respectivamente**

## 5.3 Validación del método

La validación del método se ha llevado a cabo en términos de selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión interdía y límites de cuantificación (LOQs).

### 5.3.1 Efecto matriz

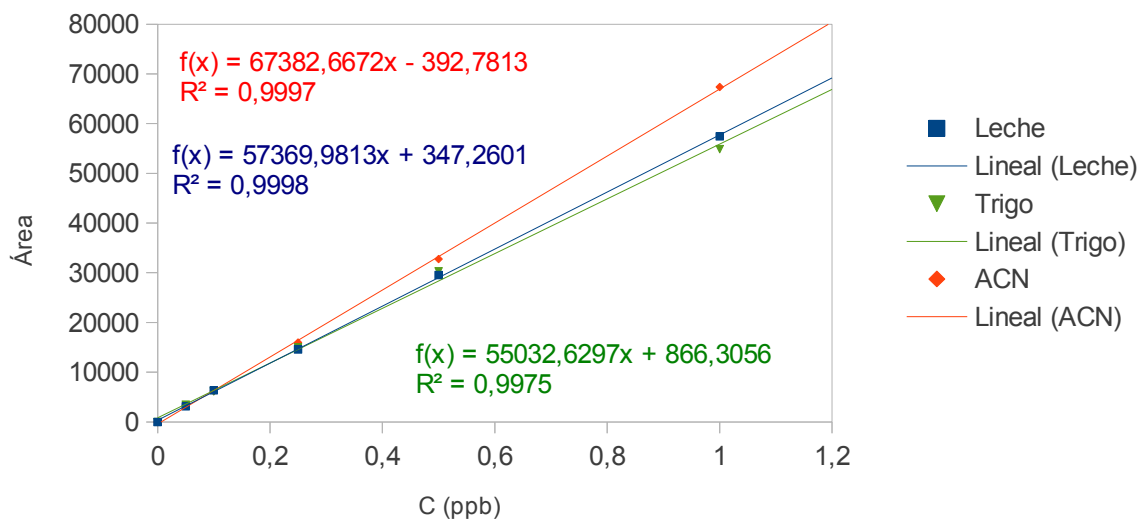
Uno de los principales problemas es la presencia de componentes en la matriz que pueden afectar a la ionización de los compuestos de estudio, de manera que se incrementa o se reduce la respuesta comparada con los disolventes.

En este trabajo se han realizado pruebas para evaluar el efecto matriz de las dos matrices representativas que se van a utilizar en el estudio diario. En el caso de compuestos con base de cereales se han analizado muestras blancas contaminadas con los analitos a varios niveles de concentración en trigo, y en el caso de la leche para lactantes y de continuación se ha utilizado como matriz representativa leche en polvo. En todos los casos se ha comparado la respuesta obtenida de cada uno de los analitos en dichas matrices y la obtenida en disolvente a distintas concentraciones.

Para estudiar este efecto en leche en polvo y trigo, se contaminaron muestras blancas de cada una de las matrices a cinco niveles de concentración diferentes (Tabla 8) para cada tipo de micotoxina en función de sus LMRs legislados por la Comunidad Europea; siendo el punto 1 (P1) el nivel LMR/2 y el punto 2 (P2) el LMR para cada grupo (concentraciones en  $\mu\text{g/Kg}$  o ppb) (ver Tabla 8).

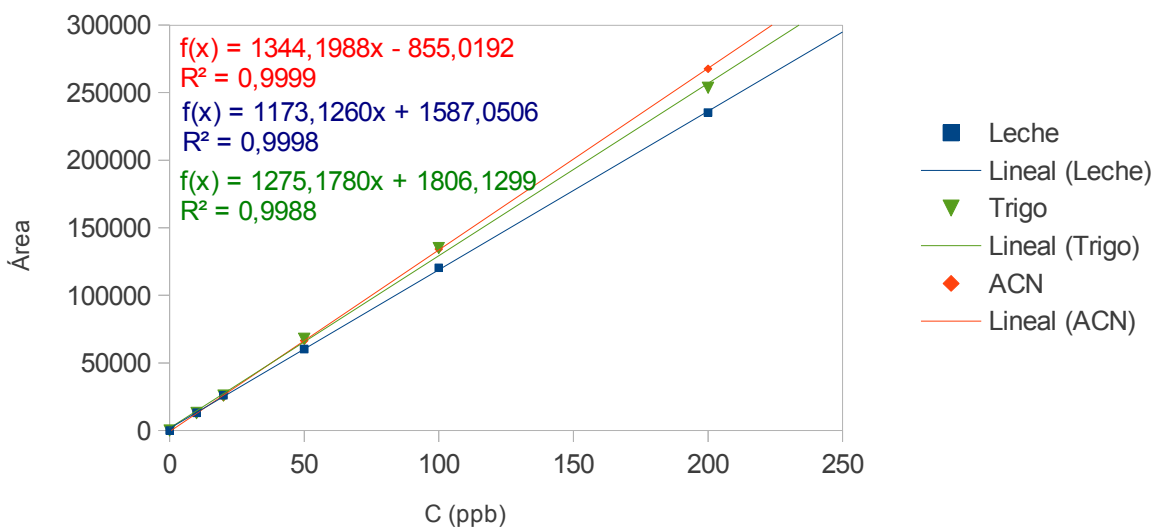
En los resultados de la evaluación del efecto matriz se observó que se obtuvieron mejores recuperaciones en disolvente (acetonitrilo), como era de esperar. Para la mayoría de las micotoxinas, el comportamiento de la respuesta de ambas matrices con respecto a la señal en disolvente es muy similar a todos los niveles de concentración tanto en leche como en trigo (Fig. 31, 32, 37-42); exceptuando los casos de las Aflatoxina G2 y M1, y el de las Fumonisinias B1 y B2, en las cuales el efecto matriz se acusa más (Fig. 33-36). Esto puede ser debido a la existencia de algún interferente en la matriz que al ionizarse causa una disminución o, en algunos casos, el aumento de la señal del analito. Para evitar este efecto matriz indeseable se recurrió a la realización de rectas de calibrado en matriz.

### Aflatoxina G1



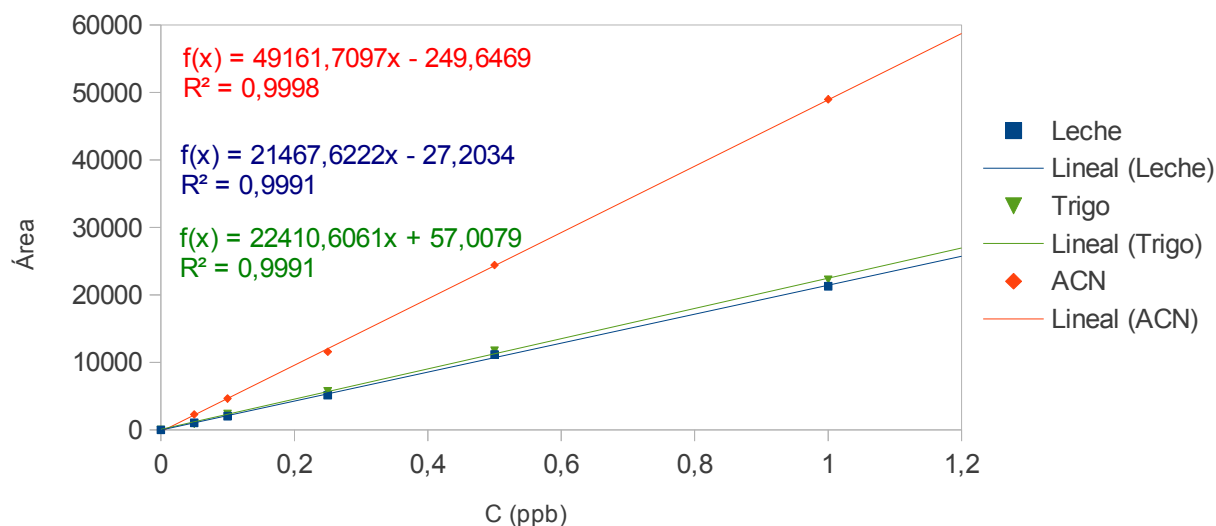
**Figura 31: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de AFG1 a distintos niveles de concentración**

### Zearalenona



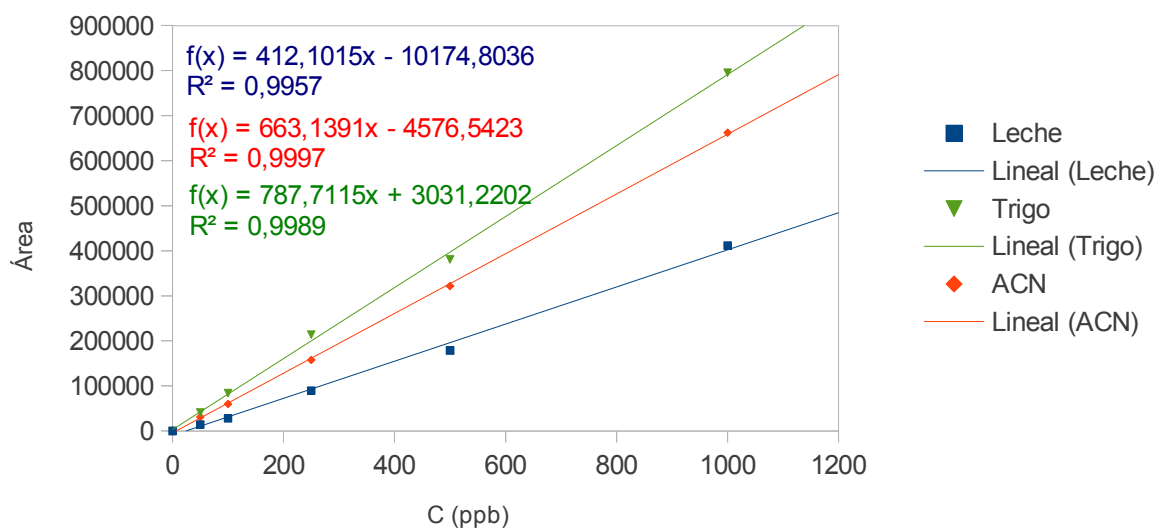
**Figura 32: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de ZEA a distintos niveles de concentración**

### Aflatoxina G2

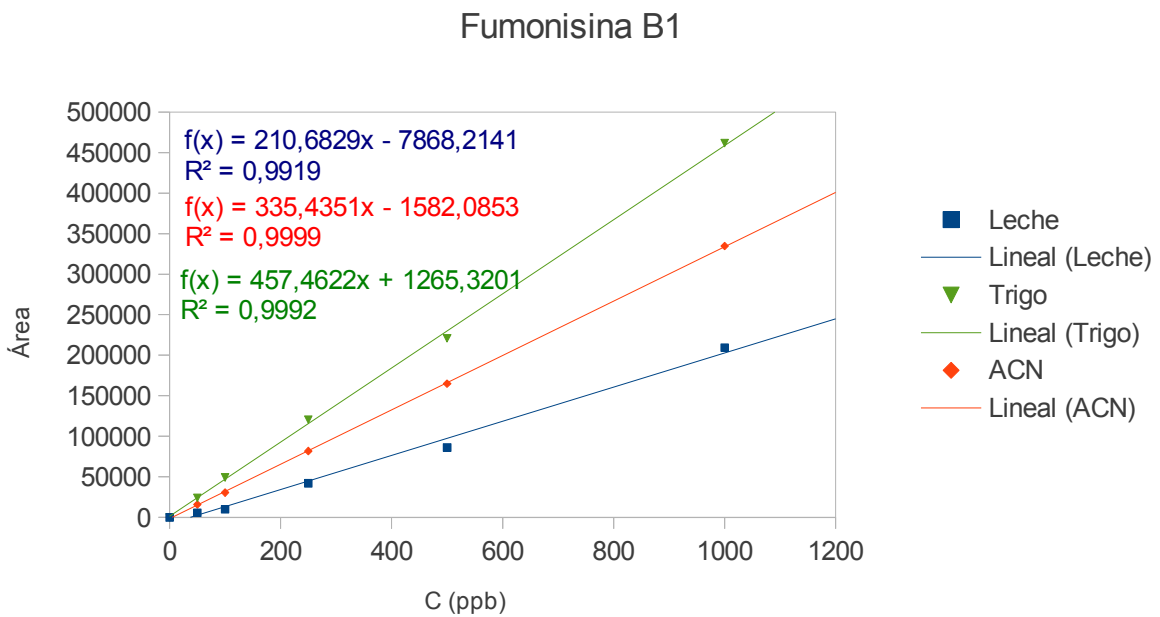


**Figura 33: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de AFG2 a distintos niveles de concentración**

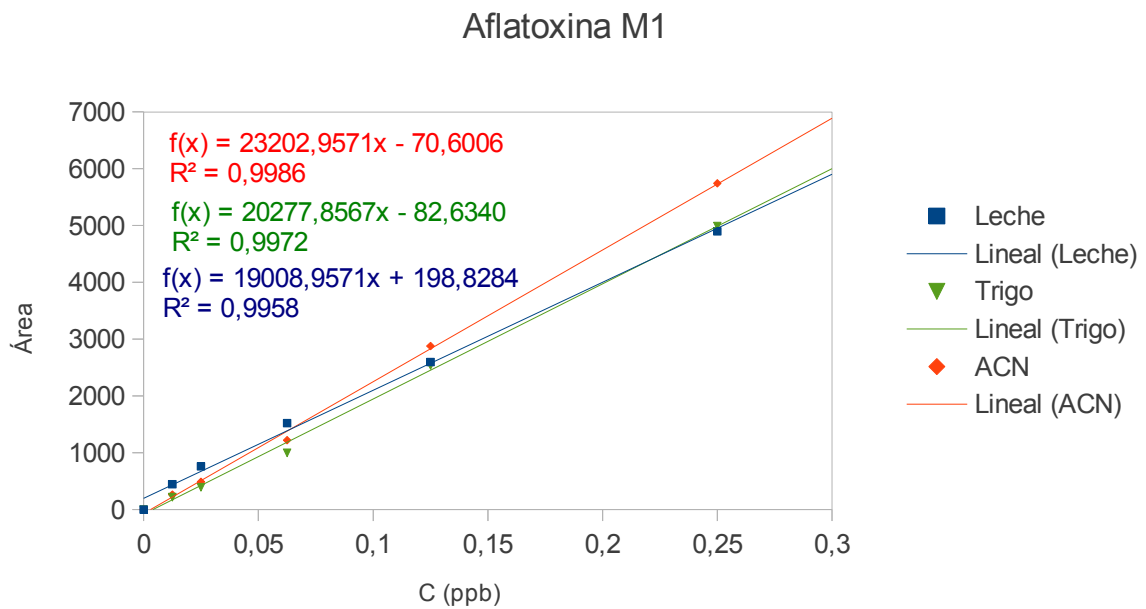
### Fumonisina B2



**Figura 34: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de FB2 a distintos niveles de concentración**

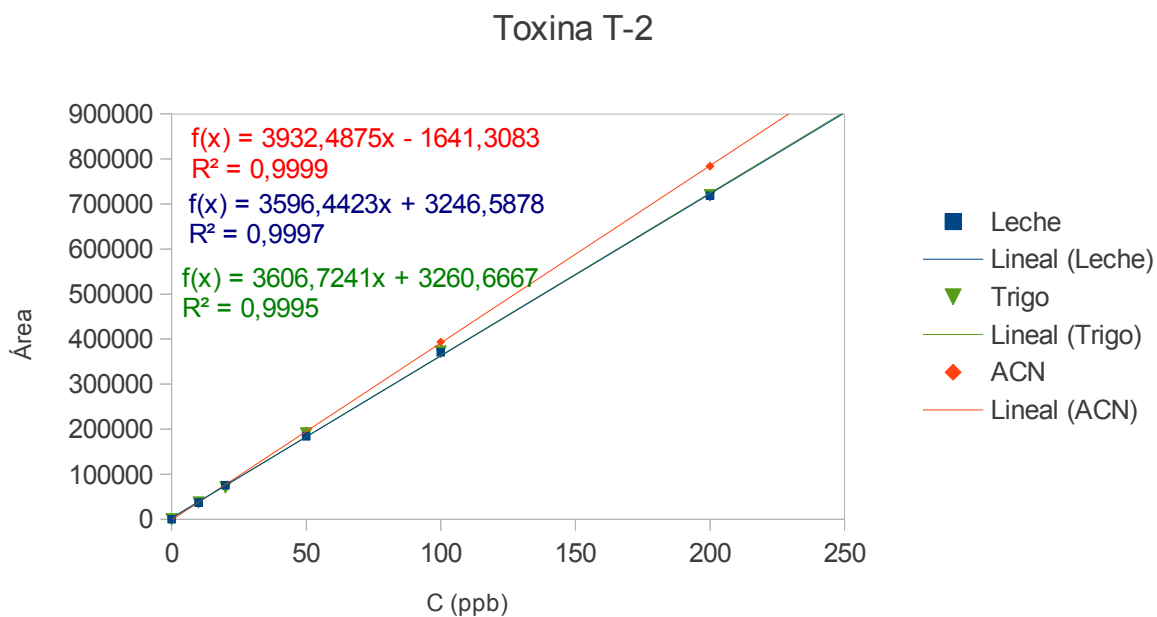


**Figura 35: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de FB1 a distintos niveles de concentración**

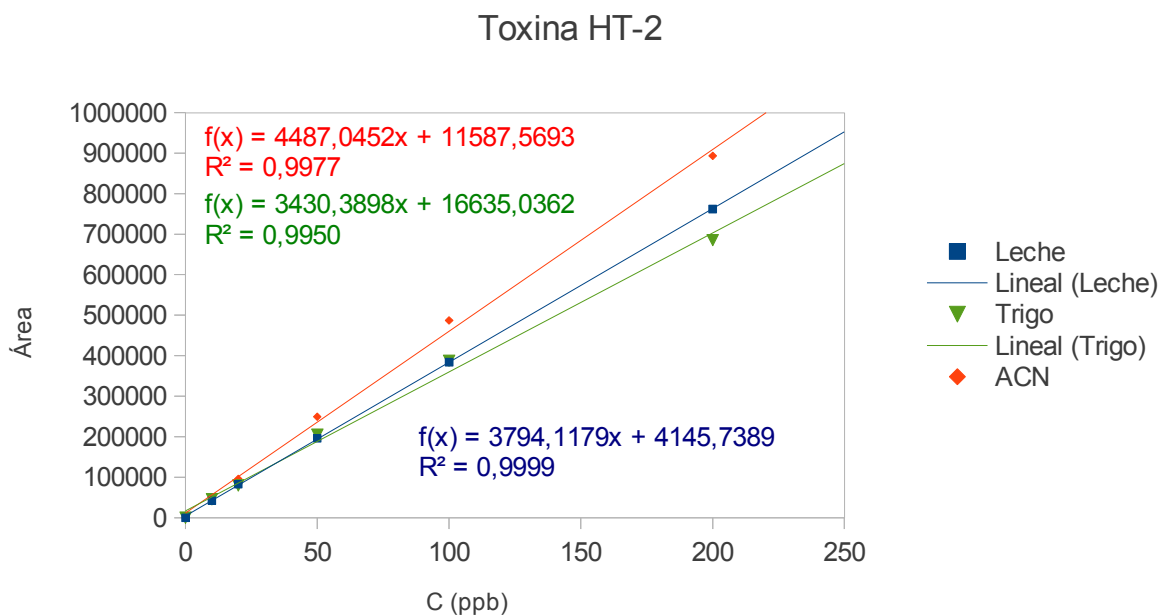


**Figura 36: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de AFM1 a distintos niveles de concentración**



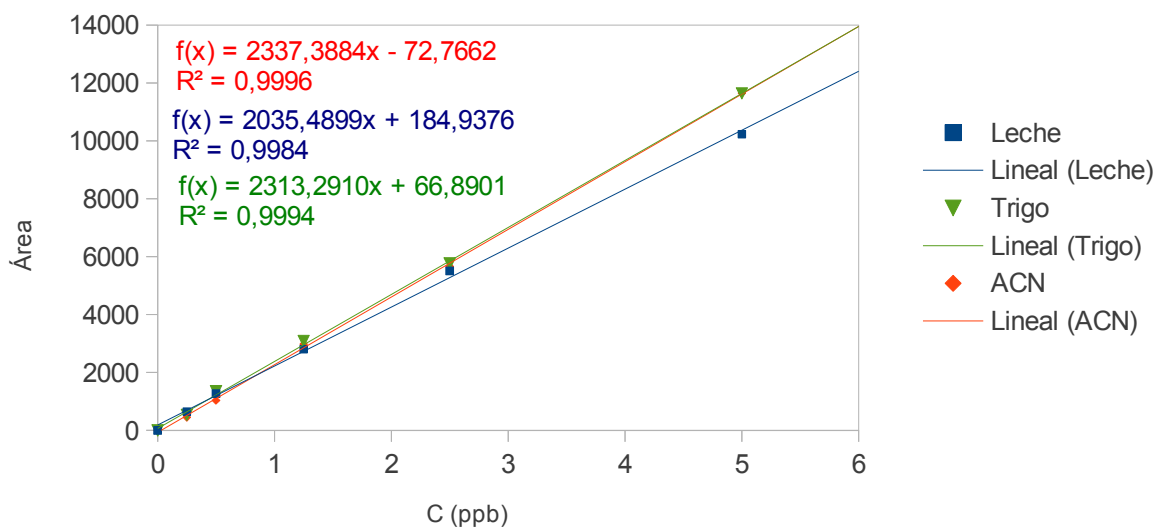


**Figura 37: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de T-2 a distintos niveles de concentración**



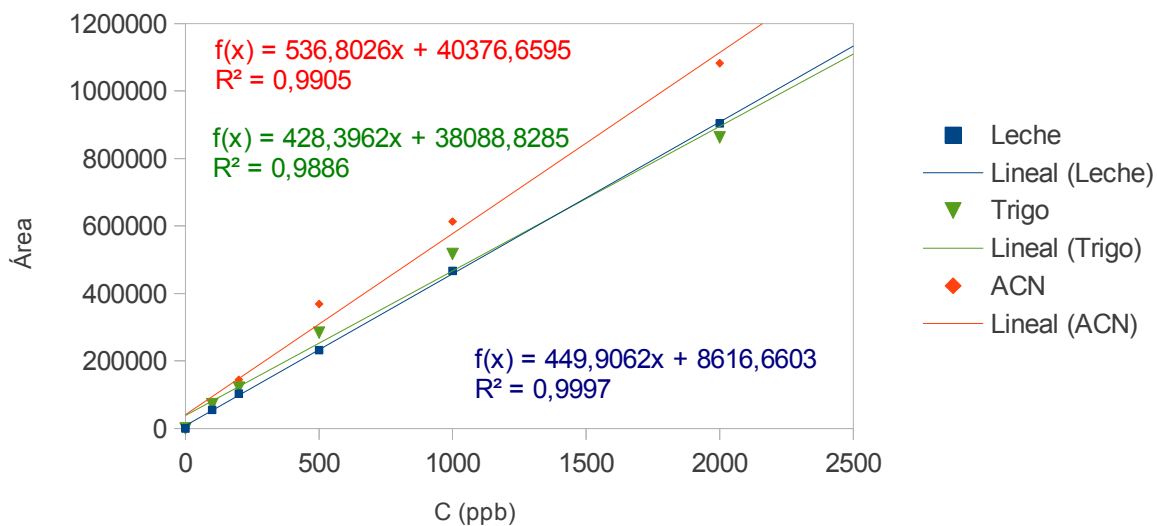
**Figura 38: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de HT-2 a distintos niveles de concentración**

### Ocratoxina A



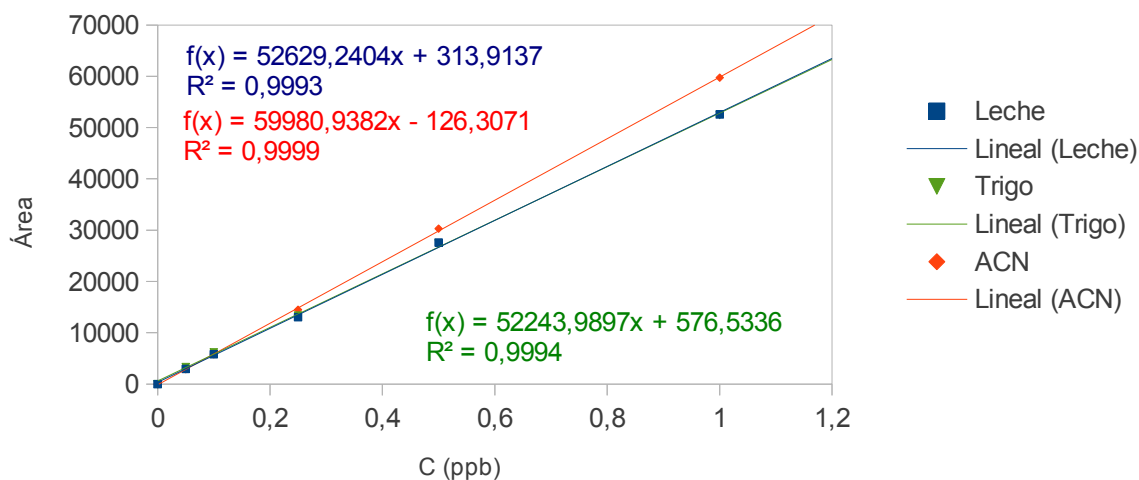
**Figura 39: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de OTA a distintos valores de concentración**

### Deoxinivalenol



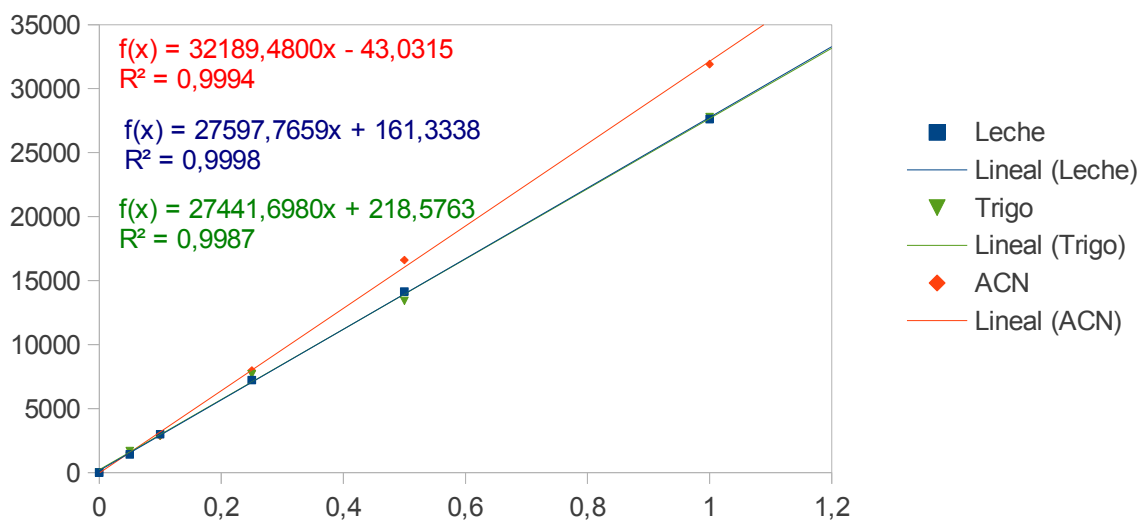
**Figura 40: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de DON a distintos valores de concentración**

### Aflatoxina B1



**Figura 41: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de AFB1 a distintos valores de concentración**

### Aflatoxina B2



**Figura 42: Efecto matriz en leche en polvo y trigo de AFB2 a distintos valores de concentración**

En la siguiente tabla se recogen los resultados del efecto matriz evaluando las pendientes de las rectas de calibrado calculadas para las matrices estudiadas. En varios casos la pendiente obtenida en leche en polvo es muy similar a la que se obtiene en trigo. Una posible causa de este hecho es que de entre los ingredientes de la leche destacan distintos aceites vegetales, como por ejemplo aceite de palma, aceite de nabina y aceite de girasol.

**Tabla 11: Evaluación del efecto matriz mediante la comparación de las pendientes en disolvente y en las matrices estudiadas**

<b>Micotoxina</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Leche en polvo</b>	<b>Trigo</b>
Aflatoxina B1	59980.9	52629.2	52243.9
Aflatoxina B2	32189.5	27597.7	27441.7
Aflatoxina G1	67382.6	57369.9	55032.6
Aflatoxina G2	49161.7	21467.6	22410.6
Aflatoxina M1	23202.9	19008.9	20277.8
Fumonisina B1	335.4	210.7	457.5
Fumonisina B2	663.1	412.1	787.7
Toxina HT-2	4487.0	3794.1	3430.4
Toxina T-2	3932.5	3596.4	3606.7
Zearalenona	1344.2	1173.1	1275.2
Deoxinivalenol	536.8	449.9	428.4
Ocratoxina A	2337.4	2035.5	2313.3

### 5.3.2 Linealidad

La linealidad del método se ha testado contaminando muestras blancas a los cinco niveles de concentración característicos para cada compuesto. Las áreas de pico obtenidas se seleccionaron como la respuesta a las diversas concentraciones. Para todos los analitos se encontró una buena linealidad con coeficientes de correlación superiores a 0.9886 en todos los casos y en ambas matrices (ver figuras de la 31 a la 42).

### 5.3.3 Exactitud

Para determinar la exactitud del método se han estudiado las recuperaciones del procedimiento de extracción para cada micotoxina a dos niveles de concentración (concentraciones en el punto 1 y en el punto 5 de la Tabla 8).

El estudio de recuperaciones se basa en el análisis de 5 réplicas en un mismo día para cada matriz y a los niveles de concentración descritos anteriormente. Estas 5 réplicas se inyectarán para ver la repetibilidad del método y generarán datos suficientes para considerar la validación inicial completa de cada micotoxina.

Además, durante tres días más, para cada matriz y micotoxina se analiza una réplica con el fin de conseguir datos de, al menos, 4 repeticiones para cada nivel de concentración de la matriz. Estas repeticiones se inyectan en condiciones de reproducibilidad (distintos días) y generan los datos suficientes para considerar la validación completa de una matriz y/o micotoxina.

Una vez realizado este procedimiento se calculan las recuperaciones medias de cada experimento. Para la validación del método las recuperaciones de cada micotoxina en cada matriz tienen que tener un valor entre 70-120%. Los valores de las recuperaciones medias se pueden observar en la tabla 12.

**Tabla 12: Valores de recuperaciones medias (%) para cada analito en las dos matrices a dos niveles de concentración distintos (punto 1 y punto 5 de las rectas de calibrado recogidas en la tabla 8)**

Micotoxina	Leche en polvo		Trigo	
	Punto 1	Punto 5	Punto 1	Punto 5
Aflatoxina B1	98	102	92	98
Aflatoxina B2	95	99	90	96
Aflatoxina G1	97	104	93	102
Aflatoxina G2	84	90	80	93
Aflatoxina M1	110	103	100	99
Fumonisina B1	78	85	75	82
Fumonisina B2	81	93	86	90
Toxina HT-2	86	88	92	83
Toxina T-2	98	95	89	89
Zearalenona	100	98	98	101
Ocratoxina A	105	101	101	96
Deoxinivalenol	76	82	73	85

En la tabla se puede observar que las recuperaciones del método de extracción para todos los analitos, independientemente de la matriz en la que se evalúen, se encuentran entre el 73% y el 105%. Estos valores de recuperaciones entran dentro del intervalo de porcentajes recomendados por

la guía Sanco en la versión del año 2011 (70% - 120%). Además, se muestra que las recuperaciones no dependen del tipo de matriz evaluada y por tanto, no se observaron diferencias significativas entre las recuperaciones de ambas.

### 5.3.4 Precisión

La precisión es otro parámetro característico para una validación. El estudio de la precisión se basa en estudios de concentración. Para ello se hace la media y la desviación estándar de las concentraciones que nos indica el sistema cromatográfico. Esas concentraciones son las obtenidas mediante la realización de 5 réplicas en un mismo día (condiciones de repetibilidad) y 3 réplicas en días diferentes (condiciones de reproducibilidad) de fortificados con las concentraciones de los puntos 1 y 5 definidos en la tabla 8.

**Tabla 13: Precisión interdía (n = 8 días) (%) a dos niveles de concentración que corresponden a los puntos P1 y P5 de las rectas de calibrado obtenidos en las dos matrices estudiadas (tabla 8)**

Micotoxinas	Leche en polvo		Trigo	
	RSD (P1)	RSD (P5)	RSD (P1)	RSD (P5)
Aflatoxina B1	10	10	9	11
Aflatoxina B2	14	13	12	10
Aflatoxina G1	7	7	6	8
Aflatoxina G2	13	11	12	9
Aflatoxina M1	10	8	11	10
Deoxynivalenol	15	5	14	6
Fumonisina B1	11	9	10	9
Fumonisina B2	8	5	9	6
Ocratoxina A	12	15	9	12
Toxina HT-2	7	4	6	6
Toxina T-2	4	15	5	12
Zearalenona	13	10	12	13

Los valores de RSD reportados para todos los analitos y matrices estudiados son menores del 20% a los dos niveles de concentración.

### 5.3.5 LODs y LOQs

El LOD o límite de detección se define como la concentración mínima de sustancia que puede ser detectada *con fiabilidad* por un método analítico. En este caso no se han hecho cálculos para obtener los valores de LODs ya que con este método, obtenemos picos bien definidos a concentraciones lo suficientemente bajas para que se encuentren por debajo del límite máximo de residuos de cada analito.

Los límites LOQs se calcularon en muestras blancas fortificadas con cada uno de los analitos, siendo los LOQs reportados la mitad de los LMRs para cada una de las micotoxinas. Los datos de LOQs se muestran en la Tabla 14:

**Tabla 14: LOQs ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) obtenidos en las dos matrices estudiadas**

Micotoxinas	Leche en polvo	Trigo
	LOQ	LOQ
Aflatoxina B1	0.05	0.05
Aflatoxina B2	0.05	0.05
Aflatoxina G1	0.05	0.05
Aflatoxina G2	0.05	0.05
Aflatoxina M1	0.0125	0.0125
Deoxynivalenol	100	100
Fumonisina B1	50	50
Fumonisina B2	50	50
Ocratoxina A	0.25	0.25
Toxina HT-2	10	10
Toxina T-2	10	10
Zearalenona	10	10

Los límites más bajos encontrados corresponden a las Aflatoxinas, siendo el menor de ellos el de la Aflatoxina M1 a  $0.0125 \mu\text{g}/\text{Kg}$ , y el límite de cuantificación más elevado pertenece al Deoxynivalenol a  $100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ . Tanto en leche en polvo como en trigo, los límites de cuantificación son los mismos para cada analito. Estos límites son menores a los límites máximos de residuos establecidos por la Unión Europea, siendo los LOQs reportados la mitad de los LMRs para cada una de las micotoxinas [24], lo que demuestra lo idóneo que es el método propuesto para analizar concentraciones traza de estos analitos.

## **5.4 Análisis de muestras reales**

Para desarrollar el método se ha aplicado a dos tipos de muestras, trigo y leche en polvo, con un control interno para cada conjunto de muestras. Para chequear si el sistema está bajo control, se realizó una recta de calibrado en matriz, un blanco, una matriz blanca y muestras fortificadas al nivel más bajo de concentración para cada grupo de analitos y al más alto para poder comprobar la confianza del método propuesto.

Para el análisis se recopilieron varias muestras de trigo de un supermercado de la localidad de Vívar (Almería, España), un bote de leche en polvo Nutribén Crecimiento 3 comprado en una farmacia de la misma zona y varias muestras de papilla de cereales facilitadas por la empresa Hero España, S.A. En ninguna de las muestras se encontraron los analitos de estudio.



## 6. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método rápido y cuantitativo para la determinación simultánea de micotoxinas en dos tipos de matrices, trigo y leche en polvo; con una breve preparación de la muestra, extracción mediante QuEChERS y un paso de clean-up o SPE dispersiva. El uso de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo muestra una identificación exacta de las 12 micotoxinas a niveles bajos en  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , cumpliendo los requerimientos establecidos por la Unión Europea. Aunque se ha observado efecto matriz en algunos analitos, se ha compensado este efecto mediante el uso de rectas de calibrado en matriz. Este método cuantitativo tiene varias ventajas como un sencillo pretratamiento, evita varios pasos de clean-up, rápidas determinaciones mediante UPLC, alta sensibilidad debida a bajos LOQs obtenidos, por lo que se puede aplicar a la determinación y cuantificación de micotoxinas en análisis de rutina de alimentos infantiles con base de cereales y leche para lactantes y de continuación.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Gracias a Ana Agüera y Piedad Parrilla, tutoras de este trabajo de fin de máster, y a María Galera del Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería; a Antonio Belmonte director de Sica AgriQ, a Francisco Garrido y a todos los compañeros por sus consejos, ayuda, y paciencia.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Emmanuel Njumbe Ediage, José Diana Di Mavungu, Sofie Monbaliu, Carlos Van Peteghem, Sarah De Saeger ; A Validated Multianalyte LC-MS/MS Method for Quantification of 25 Mycotoxins in Cassava Flour, Peanut Cake and Maize Samples. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 5173–5180 .
- [2] F. Soleimany, S.Jinap, F.Abas ; Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* , 2012, 130, 1055–1060 .
- [3] Desmarchelier, A. Oberson, J.M, Tella, P. Gremaud, E. Seefelder, W. Mottier, P. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17 Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry . *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 7510–7519 .
- [4] G.S. Shephard, F. Berthiller, J. Dorner, R. Krska, G.A. Lombaert, B. Malone, C. Maragos, M. Sabino, M. Solfrizzo, M.W. Trucksess, H.P. van Egmond, T.B. Whitaker. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2008-2009 . *World Mycotoxin Journal*, 2010, 3, 3-23.
- [5] Ala' Yahya Sirhan , Guan Huat Tan, Richard C.S. Wong . Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC–FLD).
- [6] R. R. Rasmussen & I. M. L. D. Storm & P. H. Rasmussen & J. Smedsgaard & K. F. Nielsen, Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS , *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 765–776.
- [7] J. Rubert , C. Soler, J. Mañes , Occurrence of fourteen mycotoxins in tiger- nuts , *Food Control* 2012, 25, 374–379 .
- [8] Reglamento FAO [http://www.fao.org/es/ESN/index\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/index_en.stm)

[9] <http://www.wikipedia.es/micotoxinas>

[10] C.M. Maragos, M. Busman , Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review , Food Additives and Contaminants , 2010, 27, 688–700 .

[11] P.G. Jin, Z. Han, Z.X. Cai, Y.J. Wu and Y.P. Ren , Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using <sup>13</sup>C<sup>15</sup>-deoxynivalenol as internal standard , Food Additives and Contaminants , 2010, 27, 12, 1701–1713 .

[12] Beltrán, E, Ibáñez. M, Sancho, J.V, Cortés, M.A, Yusà. V, Hernández, F; UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk , Food Chemistry 126, 2011, 737–744 .

[13] C. Cavaliere, P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi, A. Laganan, Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk . Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources , Journal of Chromatography A, 2006,1101, 69–78 .

[14] M. Ventura, D. Guillen, I. Anaya, F. Broto-Puig, J. Lluís Lliberia, M. Agut, L. Comellas, Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer , Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006; 20, 3199–3204 .

[15] C. Cavaliere, P. Foglia, C. Guarino, M. Nazzari, R. Samperi and A. Lagana , A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry , Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21, 550–556 .

[16] A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, R. Romero-González, M. M. Aguilera-Luiz , Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry , Food Chemistry, 2009, 117, 705–712 .

[17] L.K. Sørensen, T.H. Elbæk , Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry , Journal of Chromatography B, 2005, 820, 183–196 .

[18] V. M. Teresa Lattanzio, M. Solfrizzo, S. Powers, A. Visconti , Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup , Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21, 3253–3261.

[19] Y. Ren, Y. Zhang, S. Shao, Z. Cai, L. Feng, H. Pan, Z. Wang , Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry , Journal of Chromatography A, 2007, 1143, 48–64 .

[20] R. Romero-González, A. Garrido Frenich , J.L. Martínez Vidal, O.D. Prestes, S.L. Grió, Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry , Journal of Chromatography A , 2011, 1218, 11, 1477–1485 .

[21] I. Sospedra, J. Blesa, J.M. Soriano J. Mañes , Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour , Journal of Chromatography A , 2010, 1217, 9, 1437–1440 .

[22] Sforza, S., Dall'Asta, C., & Marchelli, R. (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, 25, 54-76

[23] <http://www.fao.org>

[24][http://www.aesan.msps.es/CNA/docs/docs/laboratorio\\_nacional\\_referencia/control\\_micotoxins/legislacion/reglamento\\_1126\\_2007.pdf](http://www.aesan.msps.es/CNA/docs/docs/laboratorio_nacional_referencia/control_micotoxins/legislacion/reglamento_1126_2007.pdf)

[25] Pitt, J.I., Miscamble, B.F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. Journal of Food Protection, 58, 1, 1995, 86-90.

[26] <http://www.iarc.fr/>

[27] Fuchs, R., Radic, B., Ceovic, S., Sostaric, B., Hult, K. Human exposure to ochratoxin A, IARC scientific publications 115, 1991, 131-134.

[28] Micco, C., Ambrozzi, M.A., Miraglia, M., Brera, C., Onori, R., Benelli, L. Contamination of human milk with ochratoxin A, IARC scientific publications, 115, 1991, 105-108.

[29] Sammon, A.M., A case-control study of diet and social factors in cancer of the sophagus in Transkei, 69, 4, 1992, 860-865.