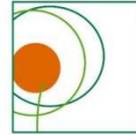




Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza



Fundación **AulaDei**
PARQUE CIENTÍFICO TECNOLÓGICO

Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales

Laura Herrero Querol

Trabajo Fin de Máster
Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Curso 2011-2012

Tutoras: Dra. Susana Lorán Ayala y Dra. Marta Herrera Sánchez

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Gobierno de Aragón (DGA Grupo Consolidado de Investigación A01/2011) y por el MICINN (Proyecto AGL2011-26808)

Índice general

| | |
|--|----|
| 1-Resumen..... | 1 |
| 2-Revisión bibliográfica..... | 2 |
| 2.1 Micotoxinas y aflatoxinas..... | 2 |
| 2.2-Hongos productores de aflatoxinas: factores que influyen en su desarrollo y en la producción de toxinas..... | 3 |
| 2.3-Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas..... | 5 |
| 2.4-Presencia de aflatoxinas en alimentos..... | 6 |
| 2.5-Efectos toxicológicos de las aflatoxinas..... | 8 |
| 2.6-Legislación..... | 9 |
| 2.7- Métodos analíticos de determinación de aflatoxinas..... | 10 |
| 2.7.1-Métodos instrumentales..... | 12 |
| 2.7.1.1-Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)..... | 13 |
| 3-Objetivos..... | 15 |
| 4-Material y métodos..... | 16 |
| 4.1-Material, equipos y reactivos..... | 16 |
| 4.1.1-Material..... | 16 |
| 4.1.2. Equipos..... | 16 |
| 4.1.3-Reactivos..... | 17 |
| 4.1.3.1-Preparación de reactivos..... | 17 |
| 4.1.3.2-Preparación y mantenimiento de patrones de calibración..... | 18 |
| 4.1.4-Precauciones y normas de trabajo..... | 18 |
| 4.2-Muestreo y preparación de las muestras..... | 19 |
| 4.3-Optimización y validación de un método analítico para la determinación de aflatoxinas en frutos secos y maíz..... | 21 |
| 4.3.1-Optimización de las condiciones cromatográficas..... | 21 |
| 4.3.1.1-Tiempos de retención..... | 21 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura (1): <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> | 4 |
| Figura (2): Estructura química de las aflatoxinas..... | 6 |
| Figura (3): Esquema del proceso de purificación con columna de inmunoafinidad..... | 12 |
| Figura (4): Muestras de frutos secos con chocolate | 19 |
| Figura (5): Muestras de frutos secos y muestras con chocolate analizadas..... | 20 |
| Figura (6): Fase móvil con interferencia..... | 23 |
| Figura (7): Columna de inmunoafinidad Aflatest® | 25 |
| Figura (8): Cromatograma a 425nm de patrón de 10 ng/mL para B ₁ y G ₁ , y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ | 33 |
| Figura (9): Cromatograma a 429nm de patrón de 10 ng/mL para B ₁ y G ₁ , y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ | 33 |
| Figura (10): Cromatograma a 435 de patrón de 10 ng/mL para B ₁ y G ₁ , y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ | 34 |
| Figura (11): Cromatograma a 455nm de patrón de 10 ng/mL para B ₁ y G ₁ , y de 3 ng/mL para G ₂ y B ₂ | 34 |
| Figura (12): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125ng/mL para G ₁ y B ₁ , y de 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con un flujo de fase móvil de 0,3 mL/min | 35 |
| Figura (13): Cromatograma a 435nm de un patrón de 0,125ng/mL para G ₁ y B ₁ , y de 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con un flujo de fase móvil de 0,4 mL/min..... | 35 |
| Figura (14): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (20/60/20)..... | 36 |
| Figura (15): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/60/22)..... | 36 |
| Figura (16): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/52/30)..... | 37 |
| Figura (17): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/65/17)..... | 37 |
| Figura (18): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/47/35)..... | 37 |
| Figura (19): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,0375 ng/mL para G ₂ y B ₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (30/55/15)..... | 38 |

| | |
|--|----|
| Figura (20): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 1 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,3 ng/mL para G ₂ y B ₂ con el inyector a temperatura ambiente..... | 38 |
| Figura (21): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 1 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y 0,3 ng/mL para G ₂ y B ₂ con el inyector a 10 °C..... | 39 |
| Figura (22): Cromatogramas superpuestos a 435 nm de avellana enriquecida a 2 ng/g para G ₁ y B ₁ , y 0,6 ng/g para G ₂ y B ₂ . La línea azul correspondiente a la Norma UNE-EN 141123:2008 y la línea negra a la Norma UNE-EN ISO 16050:2011..... | 39 |
| Figura (23): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina G ₂ | 41 |
| Figura (24): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina G ₁ | 41 |
| Figura (25): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina B ₂ | 41 |
| Figura (26): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina B ₁ | 42 |
| Figura (27): Cromatograma del disolvente de inyección..... | 42 |
| Figura (28): Cromatograma del blanco de proceso..... | 43 |
| Figura (29): Cromatograma de la muestra blanco de avellana..... | 43 |
| Figura (30): Recta de calibrado para G ₂ con concentraciones de 0,0375 ng/mL a 3 ng/mL..... | 44 |
| Figura (31): Recta de calibrado para G ₁ con concentraciones de 0,125 ng/mL a 10 ng/mL..... | 44 |
| Figura (32): Recta de calibrado para B ₂ con concentraciones de 0,0375 ng/mL a 3 ng/mL..... | 44 |
| Figura (33): Recta de calibrado para B ₁ con concentraciones de 0,125 ng/mL a 10 ng/mL..... | 44 |
| Figura (34): Ecuación de Horwitz donde C es la fracción de expresada como potencia de 10...48 | 48 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla (1): Datos de concentración de aflatoxinas en el mundo..... | 7 |
| Tabla (2): Notificaciones relacionadas con la presencia de aflatoxinas en piensos y alimentos en los últimos años..... | 8 |
| Tabla (3): Notificaciones de aflatoxinas por categoría de alimento..... | 8 |
| Tabla (4): Límites máximos de aflatoxinas establecido por el Reglamentos (CE) 1881/2006 y sucesivas modificaciones..... | 10 |
| Tabla (5): Porcentajes de fase móvil estudiados..... | 23 |
| Tabla (6): Recuperaciones (%) obtenidas con cada una de las normas | 40 |
| Tabla (7): Recuperaciones (%) obtenidas con las dos columnas | 40 |
| Tabla (8): Límites de detección para cada aflatoxina..... | 45 |
| Tabla (9): Límites de detección obtenidos por otros autores..... | 45 |
| Tabla (10): Límites de cuantificación para cada aflatoxina..... | 46 |
| Tabla (11): Límites de cuantificación obtenidos por otros autores | 46 |
| Tabla (12): Recuperaciones (%) de muestras enriquecidas a 1 y 2 µg/Kg para G ₁ y B ₁ , a 0,3 y 0,6 µg/Kg para G ₂ y B ₂ | 47 |
| Tabla (13): Resultados de recuperación de otros autores..... | 47 |
| Tabla (14): RSD% que cada una de las aflatoxinas en la inyección..... | 47 |
| Tabla (15): RSDr % en condiciones de repetibilidad para una muestra enriquecida con 1 ng/g de aflatoxinas B ₁ y G ₁ y 0,3 ng/g de B ₂ y G ₂ | 48 |
| Tabla (16): RSDr % en condiciones de repetibilidad obtenido por diferentes autores | 49 |
| Tabla (17): RSD _R % de reproducibilidad para una muestra enriquecida con 1 ng/g de aflatoxinas B ₁ y G ₁ y 0,3 ng/g de B ₂ y G ₂ , y 2 ng/g B ₁ y G ₁ y 0,6 ng/g B ₂ y G ₂ | 49 |
| Tabla (18): Datos de RSD _R % en condiciones de reproducibilidad obtenida por otros autores.. | 49 |
| Tabla (19): Concentraciones (µg/Kg) de las muestras analizadas | 50 |
| Tabla (20): Concentraciones medias de aflatoxinas por materia prima..... | 52 |
| Tabla (21): Valores de aflatoxinas en frutos secos y maíz obtenidos por otros autores..... | 52 |

1-Resumen

Las aflatoxinas forman parte de un grupo de metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos filamentosos, conocidos genéricamente como micotoxinas. Mohos como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son capaces de sintetizar aflatoxinas cuando las condiciones ambientales y nutricionales son las adecuadas.

Los hongos del género *Aspergillus* son muy comunes y están muy distribuidos en la naturaleza, sobretudo en zonas de clima cálido y húmedo. Esto incrementa en gran medida el riesgo de contaminación de alimentos por hongos que son capaces de producir las aflatoxinas, generalmente por condiciones de almacenamiento inadecuadas. La importancia de estos compuestos radica en sus efectos nocivos para la salud humana y animal, ya que pueden actuar como agentes tóxicos, carcinogénicos, teratogénicos e inmunosupresores. Según la RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), en la actualidad se emiten más de 500 alertas alimentarias anuales debido a la contaminación por aflatoxinas en distintos alimentos.

Con el propósito de aportar datos fiables sobre la presencia de estos contaminantes en muestras de alimentos, se ha puesto a punto y validado un método para la determinación de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) en distintas matrices alimentarias (frutos secos y cereales) mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) acoplada a un detector de fluorescencia, basándonos en todo momento en normas reconocidas internacionalmente. Se han optimizado y validado parámetros tanto del análisis cromatográfico, como de la extracción y purificación de las muestras, hasta obtener una metodología que proporciona resultados satisfactorios y cumple con los parámetros de especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión establecidos por la normativa europea.

Una vez validado el método se han analizado muestras de frutos secos y cereales (18 muestras de materia prima y 17 muestras comerciales recubiertas con chocolate) aportadas por una empresa de frutos secos. Todas las muestras presentaron unos valores de contaminación muy bajos y en todos los casos inferiores a los límites máximos establecidos por la legislación, a excepción de una de pistacho que dio un valor muy por encima del límite.

2-Revisión bibliográfica

2.1 Micotoxinas y aflatoxinas

Las micotoxinas son contaminantes naturales producidos por mohos filamentosos, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos pueden crecer en una amplia gama de productos agrícolas en el campo, pero también durante la post-cosecha y el almacenamiento, pudiéndose encontrar micotoxinas en consecuencia en diversos alimentos y piensos. El grado de contaminación dependerá de factores como temperatura, la humedad y el sustrato (Imperato *et al.*, 2011).

Las micotoxinas son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas que acarrearán sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional (Organización Internacional de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2003). Así, autores como Set y Erkmén (2010) señalan que del 5 al 10% de los productos agrícolas del mundo están dañados por hongos y sus micotoxinas, y por ello son apartados del consumo tanto para los humanos como para los animales. Según la FAO, esta cifra asciende hasta el 25% del total de los cultivos del mundo.

Hasta el momento se han identificado más de 300 tipos de micotoxinas presentes en materias primas, alimentos y piensos pero las que se encuentran con mayor frecuencia como contaminantes naturales en los alimentos son aflatoxinas, ocratoxina A, toxinas de *Fusarium* (deoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas, toxinas T-2 y HT-2) y patulina.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos por hongos pertenecientes a varias especies de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Estos mohos están ampliamente difundidos en la naturaleza, en climas tanto templados, como tropicales y subtropicales y pueden contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones que favorezcan su desarrollo.

Su descubrimiento se produjo a principios de la década de 1960 en Inglaterra, con la aparición de una enfermedad en los pavos y en otros animales domésticos (denominada inicialmente la enfermedad X del pavo) que produjo la muerte a unos 100.000 animales. El origen de la enfermedad se encontró en el alimento de los animales que contenía torta de cacahuets prensada. En el alimento, se detectó el hongo *Aspergillus flavus*, que se determinó como hongo responsable del problema, y también fueron aislados sus metabolitos tóxicos, las aflatoxinas. Las aflatoxinas son llamadas así como un acrónimo de *Aspergillus flavus* toxin (Juan *et al.*, 2008).

Hasta la fecha se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, pero las únicas que tienen importancia como contaminantes de los alimentos son 6: las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂,

M₁ y M₂ (Soriano del Castillo, 2007). Las aflatoxinas B₁ y B₂ son producidas por los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*, mientras que las aflatoxinas G₁ y G₂ sólo pueden ser producidas por *A. parasiticus* (Ehrlich *et al.*, 2007). Las aflatoxinas M₁ y M₂ son metabolitos oxidativos de las aflatoxinas B₁ y B₂ y son excretados en leche (AESAN, 2011). Dado que el objetivo de este trabajo es la determinación de la contaminación por aflatoxinas en muestras de frutos secos, nos centraremos principalmente en el estudio de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

Las aflatoxinas pueden contaminar muchos productos agrícolas, como frutos secos, cereales y especias (Fu *et al.*, 2008), siendo los pistachos los productos con el mayor riesgo de contaminación por aflatoxinas (Cheraghali *et al.*, 2007; Abdulkatar *et al.*, 2000, 2004).

La exposición humana a las aflatoxinas puede ser directa por la ingestión de materiales vegetales contaminados o sus productos, o indirecta, por el consumo de alimentos de origen animal, contaminados a partir de piensos con los que se alimenta el ganado. Estos contaminantes pueden causar tanto toxicidad aguda como crónica. Daños de tipo agudo en hígado, cirrosis, inducción de tumores y efectos teratogénicos entre otros, se han documentado en la literatura como consecuencia de la exposición a estos compuestos (Soriano del Castillo, 2007).

2.2-Hongos productores de aflatoxinas: factores que influyen en su desarrollo y en la producción de toxinas

Las especies de *Aspergillus* se encuentran en cualquier parte del mundo, pudiendo crecer en una gran variedad de condiciones ambientales tanto en pre como post-cosecha (Copetti *et al.*, 2011) y sobre una gran cantidad de materias primas y alimentos. Por eso, hay una elevada cantidad de productos que pueden ser susceptibles de contaminación. La presencia de *Aspergillus* no necesariamente implica presencia de aflatoxinas pues hay cepas no toxigénicas; sin embargo, lo que es más interesante, la ausencia de *Aspergillus* en el alimento no necesariamente implica que el alimento no tenga aflatoxinas, debido a que la toxina puede persistir aún después de que el moho haya desaparecido.

Aspergillus spp requiere ciertas condiciones especiales para su crecimiento y la producción de aflatoxinas. Estos patrones, son similares para los principales hongos productores de aflatoxinas, *A. flavus* y *A. parasiticus*.

En relación a los factores implicados en el crecimiento de los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* en los alimentos, éstos son tanto propios del medio en el que se desarrollan (pH, composición del alimento, actividad de agua o el daño que pueda presentar el alimento, ya sea causado por insectos o por daños mecánicos), como

factores extrínsecos: humedad ambiental, oxígeno, tiempo que disponen de crecimiento, temperatura de almacenamiento y competencia microbiana.

Así, tanto *A. flavus* como *A. parasiticus* crecen en un intervalo de temperatura de 10-12 a 42-43 °C y, óptimamente, entre 32 y 33 °C. Pueden crecer en un intervalo de pH amplio comprendido entre 2 y 11, con un crecimiento óptimo entre 5 y 8. En cuanto a la actividad de agua (a_w), los valores mínimos de crecimiento están entre 0,80 y 0,83 y el óptimo en 0,98-0,99.

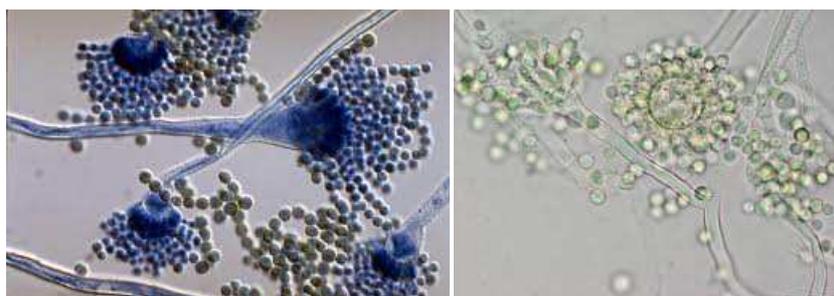


Figura (1): *A. flavus* y *A. parasiticus*

Con respecto a la producción de toxinas, existen algunas diferencias entre las dos especies. En el caso de *A. flavus* puede producir aflatoxinas a una temperatura entre 13 y 31-37 °C, siendo su óptimo en un rango de 16 a 31 °C. En el caso de la actividad de agua (a_w), el rango está entre 0,82 y más del 0,99 y su óptimo es 0,95-0,99.

Para el caso de *A. parasiticus* las temperaturas varían entre 12 y 40 °C, y su temperatura óptima es 25 °C. El pH para la toxinogénesis va desde 2 a más de 8, estableciéndose su óptimo a pH 6. Y por último la actividad de agua (a_w) va desde 0,86-0,87 a más de 0,99 y su óptimo es de 0,95 (AESAN, 2011).

El amplio abanico de factores que influyen en el crecimiento de los mohos y la producción de toxinas, muestra que el control en todos ellos es difícil con lo que es prácticamente imposible evitar al cien por cien una posible contaminación (Codex committee on food additives and contaminants (Codex Alimentarius), 2006).

Así, en relación al clima *A. flavus* y *A. parasiticus* están adaptados a crecer en climas cálidos, y por lo tanto a temperaturas elevadas. Otro de los factores climáticos que influyen mucho en el crecimiento de estos hongos es la humedad alta. Las combinaciones de temperatura alta y gran humedad, por ejemplo después de lluvia cerca del tiempo de la cosecha de los alimentos produce concentraciones inaceptables de aflatoxinas en zonas contaminadas por estos hongos (Russel *et al.*, 2010)

Asimismo, durante el cultivo es necesario evitar situaciones de estrés para la planta, como falta de agua, contaminación ambiental o malas hierbas. Además tienen que vigilar que no sufran la acción de los insectos sobre ellas, ya que se producirían daños mecánicos y así se facilita su contaminación (Codex Alimentarius, 2006).

La recolección de los frutos y semillas deberá comenzar tan pronto como sea posible para minimizar los problemas relacionados con la contaminación por *Aspergillus*, aplicando buenas prácticas de recolección, transporte y manipulación (Codex Alimentarius, 2006). Los alimentos deberán ser revisados y eliminar los que estén rotos o dañados. Además se tendrá que quitar la vaina de los frutos que la posean. (Rodrigues *et al.* 2012).

El transporte hasta una instalación de almacenamiento, debe producirse tan pronto como sea posible. Se requiere el uso de contenedores limpios, secos y protegidos contra la lluvia y los insectos.

Después del secado los frutos deben almacenarse a unos centímetros del suelo protegidos contra la lluvia y las plagas, y controlando las condiciones de temperatura y a una humedad relativa inferior al 80% (Rodrigues *et al.* 2012).

2.3-Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas

Las aflatoxinas se consideran como productos metabólicos secundarios, es decir que no tienen una función directa en el metabolismo vital fisiológico del moho sino parecen ser un factor de defensa para un medio hostil.

Químicamente, se trata de compuestos fluorescentes con una estructura cumarínica condensada con un bifurano y una pentanona (aflatoxinas B) o una lactona (aflatoxinas G) (Figura 2). Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350. La denominación B es resultado de la exhibición de fluorescencia de color azul bajo la luz ultravioleta mientras que la G se refiere a la fluorescencia verde de estas estructuras bajo la luz ultravioleta (AESAN, 2011).

Se trata además de compuestos que presentan una baja solubilidad en el agua, mientras que son solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metanol, acetonitrilo o acetona. En su forma pura son inestables a la luz y al aire y pueden dañarse asimismo con amoníaco o con soluciones de hipoclorito de sodio. Asimismo son termorresistentes con un punto de fusión superior a 250 °C y estables en un rango de pH entre 3 y 10 (Soriano del Castillo, 2007).

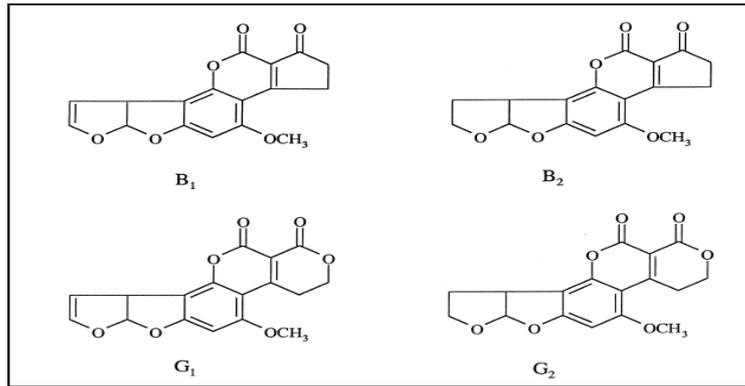


Figura (2): Estructura química de las aflatoxinas (Otta *et al.*, 2000)

2.4-Presencia de aflatoxinas en alimentos

Son numerosos los informes y artículos científicos que evidencian la presencia de aflatoxinas en distintas matrices alimentarias como consecuencia del desarrollo de los hongos tanto pre como post-cosecha. Es más, la toxina puede persistir en el alimento aunque el hongo toxigénico haya desaparecido y al presentar una elevada estabilidad térmica, son resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales, lo cual hace que sea difícil eliminarlas una vez que se producen. Sin embargo, durante el procesado del alimento puede lograrse el objetivo de reducir la exposición alimentaria a las aflatoxinas mediante la selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios. (AESAN, 2011).

En la siguiente tabla, se pueden observar diferentes niveles de concentración que han encontrado en frutos secos y cereales, proveniente de muestras diferentes y de países diferentes.

Tabla (1): Datos de concentración de aflatoxinas en el mundo

| Alimento | País de procedencia | Aflatoxinas | Autor |
|-----------------------|---------------------|--|---------------------------------|
| Cebada | España | 0,13 µg/kg AFB ₁ 1,89 x 10 ⁻³ µg/kg AFB ₂ 0,01 µg/kg AFG ₁ 3,97 x 10 ⁻³ µg/kg AFG ₂ | Ibáñez-Vea <i>et al.</i> , 2012 |
| Cacahuete Almendra | Pakistán | 6,34 µg/kg AFTs 2,13 µg/kg AFTs | Luttfullan <i>et al.</i> , 2011 |
| Cacahuete | China | 1,0 µg/kg AFB ₁ 0,7 µg/kg AFB ₂ 0,2 µg/kg AFG ₁ 0,6 µg/kg AFG ₂ | Huang <i>et al.</i> , 2010 |
| Cacahuete | China | 1,0 µg/kg AFB ₁ 0,7 µg/kg AFB ₂ 0,2 µg/kg AFG ₁ 0,6 µg/kg AFG ₂ | Haung <i>et al.</i> , 2010 |
| Pistacho | Irán | 0,12 µg/kg AFB ₁ 0,06 µg/kg AFB ₂ | Ariño <i>et al.</i> , 2009 |
| Cacahuete | China | 0,13 µg/kg AFB ₁ 0,61 µg/kg AFG ₁ | Blesa <i>et al.</i> , 2003 |
| Pistacho | Irán | 6 µg/kg AFTs | Abdulkadar <i>et al.</i> , 2000 |

AFB₁: Aflatoxina B₁; AFB₂: Aflatoxina B₂; AFG₁: Aflatoxina G₁; AFG₂: Aflatoxina G₂; AFTs: Aflatoxinas totales

A pesar de ser muchos los productos agrícolas que pueden contaminarse por aflatoxinas, estos compuestos afectan principalmente a frutos secos (almendras, avellanas pistachos, anacardos, etc), frutas desecadas, especias, aceites vegetales crudos y maíz (EFSA, 2009). En cereales como el trigo, el arroz, o la cebada la presencia de aflatoxinas es menos frecuente pero pueden aparecer con relativa facilidad.

Un ejemplo de la importancia de estos contaminantes, lo encontramos en el elevado número de notificaciones generadas a través del Sistema de Alerta Rápida para Piensos y Alimentos de la Unión Europea (RASFF, Rapid Alert System for Food and Feed). Este sistema en forma de red, está destinado a notificar de forma semanal los riesgos directos o indirectos para la salud humana y que se deriven de alimentos o piensos como consecuencia de la presencia de todo tipo de peligros: físicos (vidrio, plástico...), químicos (contaminantes ambientales, micotoxinas...) y biológicos (Listeria, Salmonella...). En él participan los Estados miembros, la Comisión y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Además, al concluir el año se elabora un resumen de todas las alertas producidas.

En la siguiente tabla, se recoge la evolución de las notificaciones relacionadas con la presencia de aflatoxinas, registradas en los últimos años a través del RASFF.

Tabla (2): Notificaciones relacionadas con la presencia de aflatoxinas en piensos y alimentos en los últimos años (RASFF, 2011)

| Año | Notificaciones | Año | Notificaciones |
|------|----------------|------|----------------|
| 2002 | 288 | 2007 | 705 |
| 2003 | 762 | 2008 | 902 |
| 2004 | 839 | 2009 | 638 |
| 2005 | 946 | 2010 | 649 |
| 2006 | 801 | 2011 | 585 |

A modo de ejemplo, en la tabla 3 se muestra la relación de alimentos que han dado lugar a estas notificaciones con respecto al año 2011. Estos datos confirman como los frutos secos y las semillas son los alimentos en los que más frecuentemente se detectan estos contaminantes, pues además, estos alimentos presentan una composición química con una elevada concentración de carbohidratos y bajo contenido acuoso que favorece la producción de las aflatoxinas (Essono *et al.*, 2009).

Tabla (3): Notificaciones de aflatoxinas por categoría de alimento (RASFF, 2011).

| Categoría de alimento | Número de notificaciones |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Cereales y productos de panadería | 13 |
| Pienso | 119 |
| Frutas y verduras | 78 |
| Hierbas y especias | 51 |
| Frutos secos y semillas | 320 |
| Otras | 4 |

2.5-Efectos toxicológicos de las aflatoxinas

Las aflatoxinas B y G son micotoxinas genotóxicas y carcinogénicas. Su ingesta se ha asociado con el daño hepático agudo, cirrosis hepática, la inducción de tumores y efectos teratogénicos (Fu *et al.*, 2008). De hecho, las aflatoxinas son consideradas por la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) como evidente cancerígeno en animales de experimentación y en humanos (IARC, 2002, 2012).

Sin embargo, aunque la ruta más conocida de exposición de aflatoxinas para humanos y animales es a través de la dieta, existe evidencia de que las aflatoxinas pueden entrar

por vía respiratoria, siendo inhaladas como partículas de polvo y provocando casos agudos y crónicos de intoxicación por esta toxina.

Una vez ingeridas, las aflatoxinas son absorbidas en el intestino delgado y transportadas por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado. Allí la toxina entrará en las células y serán metabolizadas (Soriano del Castillo, 2007).

Las manifestaciones clínicas de la aflatoxicosis pueden ser de tipo agudo que se producirá cuando se ingieran grandes cantidades de aflatoxinas en periodos de tiempo relativamente cortos, y de tipo crónico que es la forma más frecuente y en cierta forma más difícil de identificar, y es debido al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos durante largos periodos de tiempo (Soriano del Castillo, 2007).

Las características del tipo agudo son vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, así como infiltración grasa y necrosis del hígado. Al llegar las aflatoxinas al hígado se producirá una infiltración de lípidos que originará necrosis y muerte celular hepática, produciéndose así todos los síntomas relacionados. No obstante, la aparición de este cuadro en seres humanos es sumamente escasa (Soriano del Castillo, 2007).

La intoxicación crónica por aflatoxinas, se produce principalmente por la aflatoxina B₁ que es un potente carcinogénico. Sus principales síntomas son cáncer de hígado, hepatitis crónica, hepatomegalia y cirrosis.

2.6-Legislación

Debido a la toxicidad de estos compuestos y con el fin de garantizar una protección eficaz de la salud pública, son varios los países que desde hace tiempo han fijado límites para la presencia de aflatoxinas en piensos y alimentos. Así, en España, ya existía una norma reguladora desde el Real Decreto 475/1988, en la cual se establecían los límites máximos permitidos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos para consumo humano, de 10 µg/kg para la suma de las cuatro aflatoxinas y de 5 µg/kg para la aflatoxina B₁.

Recientemente, en la Unión Europea se han armonizado los contenidos máximos admitidos de estos contaminantes, mediante el Reglamento 1881/2006 (y posteriores modificaciones) por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

En la tabla 4 se muestran los límites máximos vigentes en la actualidad para las aflatoxinas objeto de estudio. Estos límites se corresponden con los publicados en el Reglamento (CE) N° 165/2010, última actualización sobre los contenidos máximos para la aflatoxina B₁ y la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en diversos alimentos, entre los

que se incluyen aquellos en los cuales la contaminación por este tipo de toxinas resulta más frecuente y puede resultar más peligrosa para la salud humana.

Tabla (4): Límites máximos de aflatoxinas establecido por el Reglamentos (CE) 1881/2006 y sucesivas modificaciones

| Producto alimentario | Límite máximo B1 (µg/kg) | Límite máximo suma B1, B2, G1 y G2 (µg/kg) |
|----------------------|--------------------------|--|
| Almendra | 12 | 15 |
| Almendra procesada | 8 | 10 |
| Cacahuete | 8 | 15 |
| Cacahuete procesado | 2 | 4 |
| Maíz tostado | 2 | 4 |
| Avellana | 8 | 15 |
| Avellana procesada | 5 | 10 |
| Pistacho | 12 | 15 |
| Pistacho procesado | 8 | 10 |

La actualización de los límites máximos establecida en el Reglamento (CE) N° 165/2010 supone un incremento con respecto a los previamente establecidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006. Éste aumento se produjo debido a una propuesta del Código Alimentarius y en vista de los resultados obtenidos por el Panel Científico de Contaminantes de la EFSA (CONTAM), quien dictaminó que esta medida tendría poco impacto desde el punto de vista de exposición del consumidor, riesgo de cáncer y márgenes de exposición calculados (EFSA, 2007).

Igualmente, para proteger la salud pública y la sanidad animal, se debe ejercer un control estricto de los productos destinados a la alimentación animal, para lo que se han dictado unos contenidos máximos de aflatoxinas en los productos destinados a la alimentación animal y están recogidos en la Directiva 2003/100/CE.

2.7- Métodos analíticos de determinación de aflatoxinas en alimentos

Los programas de control y protección de la salud pública frente a los contaminantes tóxicos presentes en los alimentos dependen principalmente de los análisis laboratoriales realizados. Sin embargo, el muestreo y análisis de micotoxinas es un proceso complejo debido a la presencia de posibles interferencias y efectos de matriz que complican la determinación de estos analitos, los bajos límites de detección requeridos y a que su distribución en las matrices es muy heterogénea.

Por ello, el proceso de determinación de micotoxinas en alimentos sólidos y líquidos se realiza en varias fases que en términos generales incluyen el muestreo y preparación de la muestra (moler y homogeneizar en el caso de los alimentos sólidos y ultrasonicar en el caso de alimentos líquidos), extracción y posterior purificación para eliminar interferencias y finalmente determinación mediante técnicas instrumentales.

Además, dichos análisis pueden llevarse a cabo mediante el uso de métodos cualitativos o de cribado y/o métodos cuantitativos. Estos primeros servirán para determinar la presencia/ausencia de un determinado analito en una muestra o presencia/ausencia por encima de un determinado nivel, con lo que continuaremos el proceso de análisis cuantitativo sólo con aquellas muestras que sean positivas. En el caso de las técnicas cuantitativas podremos determinar la concentración exacta de cada aflatoxina existente en la muestra.

Así, en la literatura revisada, para la determinación de aflatoxinas en alimentos se ha descrito el uso de la cromatografía de capa fina (TLC, thin-layer chromatography), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high-performance liquid chromatography) o la técnica inmunoenzimática ELISA (Haung *et al.*, 2010).

Sea cual sea la técnica empleada y con el fin de garantizar que los laboratorios de control utilizan métodos de análisis con niveles de eficacia comparables, el Reglamento (CE) nº 401/2006 de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, establece criterios generales a los que deben ajustarse los métodos de análisis de estos contaminantes.

Además, existen varios organismos internacionales que elaboran y publican métodos de análisis de micotoxinas en alimentos. Algunos de estos organismos son la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), CEN (Comité Europeo de Normalización) o la ISO (Organización Internacional de Normalización). En el caso de España, existe AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación), que adopta y convierte las normas ISO y CEN en normas españolas (UNE).

En la actualidad están vigentes dos normas UNE que regulan de determinación de aflatoxinas en alimentos. Éstas son la UNE-EN ISO 16050:2011: “Determinación de aflatoxina B₁, y contenido total de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución”; y la norma UNE-EN 14123:2008: “Determinación de aflatoxina B₁ y de la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en avellanas, cacahuetes, pistachos, higos y pimentón molido. Método por cromatografía líquida de alta resolución con transformación química postcolumna y purificación en columna de inmunoafinidad”.

En relación a las columnas de inmunoafinidad, éstas son muy utilizadas y constituyen el estándar actual para la purificación de micotoxinas en análisis de alimentos. La columna está constituida por un gel con anticuerpos monoclonales anti-aflatoxinas inmovilizados. En el momento de adicionar la muestra se produce una reacción antígeno-anticuerpo lo que le confiere una alta selectividad. Así, la proporción de impurezas que quedan fijadas a la columna es pequeña, y éstas se eliminan en una etapa de lavado con agua milliQ o PBS, para evitar cambios de pH que podrían afectar a la unión antígeno-anticuerpo.

Para conseguir la elución de las aflatoxinas se utiliza metanol que rompe la unión de éstas con los anticuerpos.

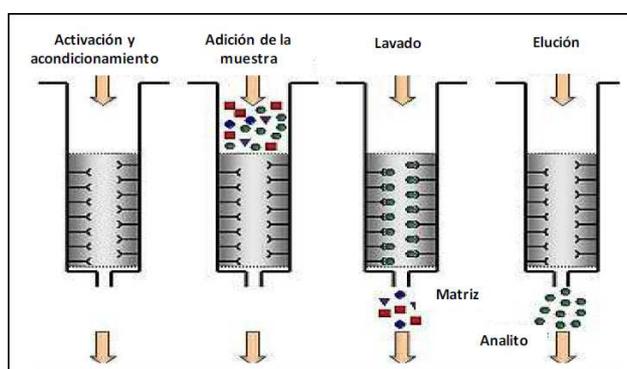


Figura (3): Esquema del proceso de purificación con columna de inmunoafinidad

2.7.1-Métodos instrumentales

Una vez se haya realizado el proceso de purificación, se requiere de un método analítico para cuantificar la concentración de aflatoxinas que contienen las muestras. Como se ha comentado anteriormente, existen varias posibilidades cromatográficas como la cromatografía en capa fina (TLC) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además existen técnicas inmunoquímicas como el ELISA que es un método de cribado, que puede ser cualitativo o cuantitativo.

Se ha rechazado el uso de la TLC ya que es una técnica con baja separación, precisión y sensibilidad. También se ha descartado el uso de la técnica de ELISA debido a que es un método de cribado y aunque es rápido y sensible puede dar bastantes falsos positivos (Huang *et al.*, 2010).

El método más utilizado para detectar aflatoxinas se basa en técnicas cromatográficas como el HPLC combinados con un detector de fluorescencia o con nuevos equipos como el UPLC (Ultra Pressure Liquid Chromatography) que mejoran sus características.

La cromatografía es un procedimiento analítico que se basa en la separación, identificación y cuantificación de los constituyentes de una mezcla. El principio se

fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles. Una de ellas, llamada fase estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada fase móvil, se desplaza en el seno de la primera. La velocidad de elución de los analitos de interés presentes en la fase móvil dependerá de la solubilidad de éstos en la fase móvil y de la fuerza de interacción de dicho compuesto con la fase estacionaria.

Las técnicas cromatográficas requieren conocer las características fisicoquímicas y la estructura molecular para una adecuada separación y determinación de las aflatoxinas dependiendo de su polaridad.

En estas técnicas tanto la fase móvil como la fase estacionaria juegan un papel importante en la separación, lo que hace que la retención cromatográfica sea el resultado del trinomio fase móvil/fase estacionaria/analito. Utilizamos para el análisis de micotoxinas cromatografía en fase reversa que se basa en la utilización de solventes polares como el metanol o el acetonitrilo que constituyen la fase móvil.

La línea base en el método de cromatografía corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto eluído. La separación se completa cuando en el cromatograma aparecen tantos picos como analitos existan en la mezcla objeto de análisis. El tiempo de retención de cada uno de estos analitos es el tiempo que transcurre desde que se inyecta la muestra en el cromatógrafo hasta que el pico correspondiente a cada compuesto eluído alcanza su máximo de altura.

2.7.1.1-Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)

El ULPC es un sistema de cromatografía líquida como el HPLC, pero incorpora nuevas características que lo hacen mucho más óptimo para el análisis de las aflatoxinas. Las siglas UPLC son una marca registrada de Waters Corporation, aunque se suele utilizar para designar a otros equipos con sus mismas características.

La principal diferencia a destacar del UPLC (Ultra pressure liquid chromatography) si se compara con el HPLC es que funciona a más alta presión con lo que la optimización en reactivos y tiempo es considerable.

Se trata de un sistema que consta de un reservorio de fase móvil, cuatro bombas, inyector, columna de separación (de longitud más corta y menor tamaño de partícula que las convencionales) y detector. En nuestro caso al ser toxinas fluorescentes necesitaremos un detector de fluorescencia (FLD).

La muestra después de toda la preparación se hace pasar a través de una fase estacionaria (apolar) que se mantiene fija en una columna y los analitos de interés se

distribuyen entre la fase móvil y la estacionaria dependiendo de la afinidad por cada una de ellas. Se eluyen en primer lugar los compuestos más solubles en la fase móvil, mientras que los que permanecen más tiempo retenidos son aquellos que son apolares.

En el caso del HPLC para poder detectar las micotoxinas se requiere de una derivatización de las mismas para aumentar su señal. Se puede utilizar la derivatización precolumna, que es un proceso químico con compuestos como el ácido trifluoroacético (TFA) (Shakir *et al.*, 2010). También existe la derivatización postcolumna, la cual puede ser con compuestos como el bromo, o con células de derivatización como kobra-cell o phRED.

En el caso del sistema ACQUITY UPLC[®] posee una celda de fluorescencia con un volumen de capacidad mucho mayor (13 µL en comparación de los 2 µL del HPLC), lo que le permite analizar las aflatoxinas sin ningún tipo de derivatización. El mayor volumen de su célula es suficiente para aumentar la señal fluorescente de las toxinas y que puedan ser captadas por el equipo (Fu *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010).

Además este equipo puede trabajar a presiones de hasta 100 Mpa, lo que le permite ser mucho más rápido y ahorrar muchos reactivos. Esto produce que el UPLC con respecto al HPLC sea mucho más preciso y sensible (Novakova *et al.*, 2006).

3- Justificación y objetivos

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos pertenecientes a varias especies de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estas toxinas se pueden encontrar como tóxicos naturales en muchos productos agrícolas, fundamentalmente en frutos secos, cereales y especias.

Debido a las grandes pérdidas económicas que acarrea su presencia en los alimentos junto a su demostrada actividad genotóxica y carcinogénica, en la actualidad las aflatoxinas son objeto de interés internacional, especialmente para las distintas autoridades sanitarias.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se hace indispensable disponer de métodos de análisis rápidos y fiables que permitan a los distintos laboratorios aportar datos de contaminación por aflatoxinas en los alimentos con el fin de asegurar la calidad de los mismos y controlar el riesgo para la salud pública.

Es por ello que en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Desarrollar y poner a punto un método de análisis de aflatoxinas en muestras de frutos secos y cereales, basado en la purificación por columna de inmunoafinidad y determinación por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC).
- Validar el método analítico desarrollado teniendo en cuenta las recomendaciones internacionales sobre el muestreo y análisis de micotoxinas en los productos alimenticios, así como las directrices generales relativas al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- Investigar las tasas de contaminación por aflatoxinas en distintas muestras de frutos secos y maíz comercializados en España.

4-Material y métodos

4.1-Material, equipos y reactivos

4.1.1-Material

-Material de laboratorio estándar:

-Material de vidrio: Viales de color ámbar de 2 y 4 mL, embudos, pipetas Pasteur.

-Material de plástico: Tubos Falcon de 50 mL, puntas de micropipeta.

-Papel de filtro Whatman nº1.

-Columnas de inmunoafinidad: Aflatest (Vicam) y Aflaprep (R-Biopharm).

-Micropipetas de volumen variable (2-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL) (RAININ)

4.1.2. Equipos

- Cromatógrafo de líquidos UPLC Acquity Ultra Performance H-Class (Waters):

- Sistema de bombeo cuaternario.
- Inyector automático.
- Detector de Fluorescencia (FLD).
- Columna cromatográfica de fase reversa octadecil BEH (tecnología de Waters con silica) C18 de 100 mm de longitud x 2,1 mm de diámetro y 1,7 µm de tamaño de partícula.
- Unidad de control del equipo y tratamiento de datos con el programa software Empower de Waters.

-Balanza analítica monoplato 204/01ML (Mettler Toledo).

-pHmetro con precisión de 0,01 unidades de pH FE20 (Mettler Toledo).

-Homogeneizador Ultraturrax SilentCrusher M con vástago de dispersión de acero inoxidable (Heidolph).

-Rotatubos SA8 (Stuart).

-Molino Kniftec 1095 Tecator AB con refrigeración con agua de red (Foss).

- Bloque calentador de tubos Tembloc P (Selecta).

-Centrífuga Allegra X-22 (Beckman Coulter).

- Equipo MilliQ plus (Millipore).

4.1.3-Reactivos

- **Patrón mix de aflatoxinas (solución madre)** con concentraciones de 1 µg/mL de B₁ y G₁, y de 0,3 µg/mL de B₂ y G₂ en metanol y 99% de pureza (Supelco Inc.) Según recomendaciones del laboratorio que los suministra, este patrón se mantiene en condiciones de refrigeración a 8 °C.
- Metanol (CH₃OH) grado HPLC (Merck).
- Acetonitrilo (CH₃CN) grado HPLC (Merck).
- Hexano (C₆H₁₄) grado HPLC (Panreac Química).
- Cloruro de sodio (NaCl) (Panreac Química).
- Fosfato de hidrógeno disódico dihidratado (NaH₂PO₄·2H₂O) (Panreac Química).
- Fosfato disodico dodecahidratado (Na₂HPO₄·12H₂O) (Panreac Química).
- Ácido ortofosfórico (H₃PO₄) al 85% de pureza (Panreac Química).
- Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac Química).
- Agua desionizada calidad milliQ.

4.1.3.1-Preparación de reactivos

- Disolución para el acondicionamiento y lavado de las columnas de inmunoafinidad.** Preparación de un tampón fosfato salino, a pH (7,4) (PBS): Para la preparación se añaden en un matraz aforado de 1 L, 0,563 g de fosfato de hidrógeno disódico dihidratado (NaH₂PO₄·2H₂O), 4,724 g de fosfato disodico dodecahidratado (Na₂HPO₄·12H₂O) y 9,04 g de cloruro sódico (NaCl) en 900 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4 con ácido ortofosfórico al 85% y/o hidróxido sódico, y después se enrasa a 1 L con agua destilada. Esta solución se conserva en refrigeración a 8 °C.
- Fase móvil para el UPLC:** Se mezclan 30 partes por volumen de metanol, con 55 partes por volumen de agua desionizada calidad milliQ y 15 partes por volumen de acetonitrilo.
- Disolución para la extracción de aflatoxinas en muestras de frutos secos y cereales (Norma UNE-EN ISO 16050:2011):** metanol al 70%. El metanol al 70% se obtuvo al mezclar 70 mL de metanol con 30 mL de agua milliQ en un frasco de 100mL.

-Disolución para la extracción de aflatoxinas en muestras de frutos secos y cereales (Norma UNE-EN ISO 14123:2008): metanol al 80%. El metanol al 80% se obtuvo al mezclar 80 mL de metanol con 20 mL de agua milliQ en un frasco de 100 mL.

4.1.3.2-Preparación y mantenimiento de patrones de calibración

Basándonos en la Norma UNE-EN ISO 16050:2011, cada día de trabajo se realizó una curva de calibrado de los compuestos a determinar. Debido a la baja concentración de aflatoxinas esperada en las muestras, para su elaboración se dispuso de soluciones patrón con valores más bajos de concentración de analito que los sugeridos inicialmente por la norma.

Partiendo del patrón puro, se dispuso de una solución madre de 1 µg/mL de B₁ y G₁ y 0,3 µg/mL de B₂ y G₂. A partir de la solución madre se elaboró una solución intermedia de 100 ng/mL de B₁ y G₁ y 30 de B₂ y G₂ en la fase móvil de elección (Agua/Metanol/Acetonitrilo) (55/30/15).

A partir de esta solución intermedia, se prepararon el resto de las soluciones patrón de calibración en la fase móvil de elección a las concentraciones que se indican: 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 10 ng/mL para B₁ y G₁, y de 0,035; 0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 y 3 ng/mL para B₂ y G₂.

Tanto la solución madre como las soluciones patrón de aflatoxinas en fase móvil preparadas, se mantuvieron en un vial ámbar en refrigeración a 8 °C. Es necesario que los viales sean de color ámbar ya que las aflatoxinas son muy sensibles a la luz y podrían degradarse.

Antes del empleo de las soluciones patrón, éstas se dejaron atemperar a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.

Tras su inyección en el sistema cromatográfico se representaron las rectas de calibración, obteniendo la ecuación de la recta con la que calcular las concentraciones para cada tipo de aflatoxina estudiada en cada una de las muestras analizadas.

4.1.4-Precauciones y normas de trabajo

La manipulación de estos compuestos debe realizarse siempre con guantes para evitar entrar en contacto con las toxinas. Además las soluciones de aflatoxinas tienen que estar protegidas de la luz directa, ya que si no se degradarían. También hay que prestar atención al material de vidrio, que tendrá que ser lavado tres veces antes de su uso con metanol (Bacaloni *et al.*, 2008). Para la descontaminación de éste así como del

material de plástico que ha estado en contacto con las micotoxinas se sumergen en una solución diluida con lejía comercial al 10%.

4.2-Muestreo y preparación de las muestras

El estudio se ha llevado a cabo con muestras de frutos secos y de frutos secos con chocolate procedentes de una empresa de la Comunidad Autónoma de Aragón. Los frutos secos son considerados como materia prima en la empresa, mientras que las muestras con chocolate son destinadas a la venta directa al consumidor. En estas últimas, se añadieron azúcares y algunas presentaban además en su composición cereal. Asimismo, se han analizado muestras de maíz, ya que aunque sea un cereal, es habitual su consumo como snack y que como se ha visto anteriormente, se trata de un producto en el que la contaminación por aflatoxinas es frecuente (Fu *et al.*, 2008). El envío de los alimentos por parte de la industria se realizó durante los meses de junio, julio y agosto de 2012.

El número y tipo de muestras analizadas se detalla en la figura 5.

Las muestras de materia prima y las muestras con chocolate se recibieron en formato de 1000 g. Todas las muestras se mantuvieron en su envase original hasta el momento del análisis. Ninguno de los frutos secos sufrió un tratamiento antes de la recepción, a excepción del maíz que fue tostado.

Las muestras de materia prima se conservaron en refrigeración a 8 °C, mientras que las muestras de chocolate se congelaron para evitar que se derritieran en el proceso de molienda. De cada muestra se tomaron 100 g y se trituraron con un molino con refrigeración por agua, para comenzar la extracción de las mismas.



Figura (4): Muestras de frutos secos con chocolate

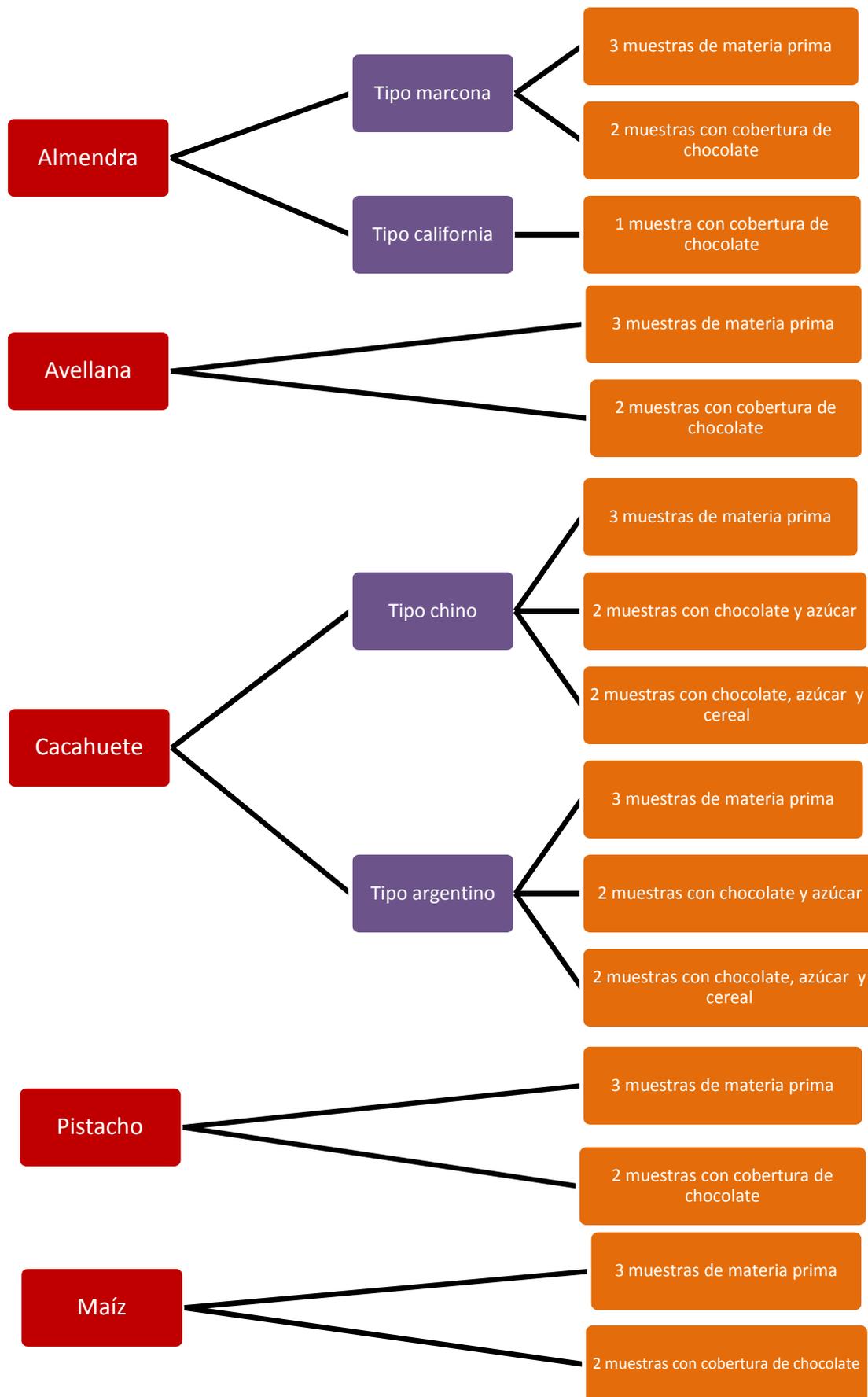


Figura (5): Muestras de frutos secos y muestras con chocolate analizadas

4.3-Optimización y validación de un método analítico para la determinación de aflatoxinas en frutos secos y maíz

La metodología que se va a optimizar en este trabajo consiste en una extracción de las aflatoxinas presentes en las muestras por agitación en ultraturrax con una disolución metanólica, seguido de una filtración, dilución y purificación del extracto orgánico obtenido mediante columnas de inmunoafinidad y determinación final de las toxinas mediante cromatografía líquida UPLC.

El método desarrollado se basa principalmente en la norma UNE-EN ISO 16050:2011: "Determinación de aflatoxina B₁, y contenido total de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución", en la norma UNE-EN 14123:2008 para la "Determinación de aflatoxina B₁ y de la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en avellanas, cacahuetes, pistachos, higos y pimentón molido. Método por cromatografía líquida de alta resolución con transformación química postcolumna y purificación en columna de inmunoafinidad" y en la aplicación proporcionada por Waters (Rapid analysis of aflatoxins without derivation using ultra performance liquid chromatography and fluorescence detection).

4.3.1-Optimización de las condiciones cromatográficas

4.3.1.1-Tiempos de retención

Para comprobar los tiempos de retención correspondientes a cada uno de los picos de las diferentes aflatoxinas se inyectaron al comienzo de la optimización del método seis replicados de un patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁, y 3 ng/mL para G₂ y B₂, calculando la media de los tiempos de retención obtenidos para cada analito.

Una vez determinados el flujo y las proporciones de los disolventes que constituyen la fase móvil así como la temperatura del inyector se procedió a comprobar los nuevos tiempos de retención de los picos, ya que variaciones en estos parámetros tienen gran influencia en los tiempos de elución. Para ello, una vez finalizada su optimización se volvió a inyectar seis veces un patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁, y 3 ng/mL para G₂ y B₂ y se obtuvieron los nuevos tiempos de retención.

Además para comprobar que no varíen con el tiempo los tiempos de retención determinados y comprobar la estabilidad de los patrones en refrigeración se realizó una prueba de estabilidad de un patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁, y 3 ng/mL para G₂ y B₂, el cual se inyectó durante veinte días seguidos para ver si los tiempos de retención se mantenían constantes.

4.3.1.2-Longitudes de onda de excitación y emisión

El siguiente paso en el desarrollo del método para determinar la concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ por UPLC fue la elección de las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para la determinación de dichos analitos, teniendo en cuenta la bibliografía consultada así como las recomendaciones de la casa comercial.

Para la longitud de onda de excitación todos los autores coincidían en que fuera 365 nm. Pero para el caso de la longitud de emisión había varias opciones.

Para seleccionar la longitud de onda de emisión se realizaron los análisis a 425, 429, 435 y 455 nm, y observamos sus correspondientes cromatogramas seleccionando para cada micotoxina la longitud de onda con la que se obtenía un área de pico mayor.

4.3.1.3-Volumen de inyección

El volumen de inyección es la cantidad de muestra que es tomada por el inyector para realizar cada análisis. Con esta prueba se quiso comprobar si este volumen influía en alguna medida en la mejora de la señal.

En el uso de UPLC se utilizan volúmenes de inyección menores al HPLC, siendo 10 µL un volumen que es usado frecuentemente en el primer caso (Fu *et al.*, 2008). En nuestro caso, se ensayaron dos volúmenes de inyección: 10 µL al ser un volumen muy utilizado en la bibliografía y 1 µL por recomendaciones de la casa comercial.

4.3.1.4-Flujo de la fase móvil

El flujo de la fase móvil es la velocidad a la cual ésta pasa por la columna arrastrando la muestra con ella. En los equipos de HPLC se necesita un flujo de 1 mL/min (Copetti *et al.*, 2011), mientras que para los de UPLC la bibliografía muestra flujos algo más lentos, del orden de 0,3 mL/min (Huang *et al.*, 2010). Esta diferencia es debida al tamaño de las columnas que utiliza cada uno de los equipos, ya que en el caso del UPLC son columnas de menor longitud y menor tamaño de partícula y por esto requieren un menor flujo de la fase móvil ya que son capaces de resistir presiones más elevadas que la cromatografía convencional.

Se realizó un ensayo para determinar la velocidad de flujo más apropiada para nuestro proceso. Para ello se inyectó por duplicado un patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y de 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con dos flujos diferentes: 0,3 mL/min, que es el dado por la bibliografía y otro de 0,4 mL/min que es el que se recomienda en la aplicación de la casa comercial.

4.3.1.5- Composición de la fase móvil

Basándonos en la norma UNE-EN ISO 16050: 2011 y en el trabajo publicado por Ariño *et al.* (2009), se decidió utilizar como fase móvil una mezcla de metanol, agua y acetonitrilo.

En un principio se probó con la fase móvil proporcionada por el fabricante del equipo (Abdulkadar *et al.*, 2004) consistente en metanol/agua/acetonitrilo en proporción 18:64:18. Sin embargo, con esta fase móvil se observó una interferencia en el mismo tiempo de retención que la aflatoxina G₁ (Figura 6).

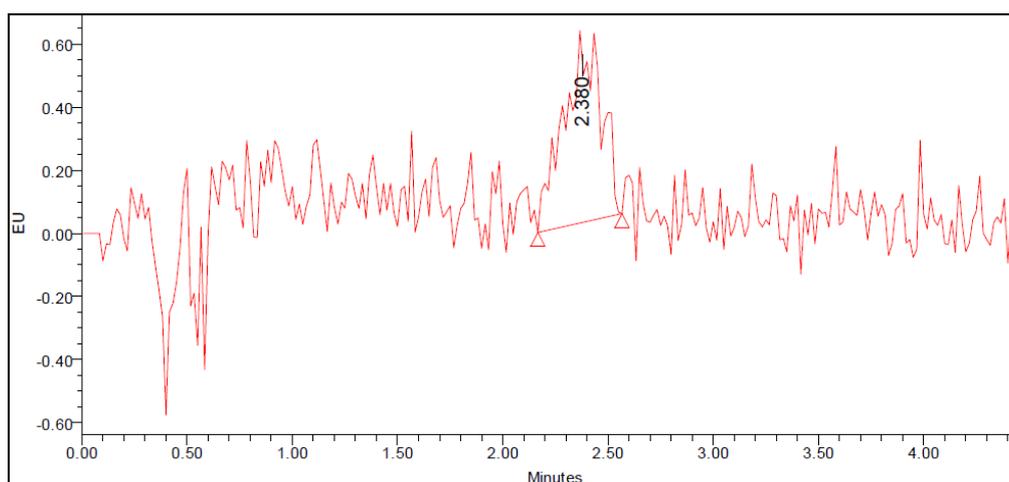


Figura (6): Fase móvil con interferencia

Para corregir este problema se probaron diferentes porcentajes experimentales de los reactivos que forman parte de la fase móvil agua, metanol y acetonitrilo (Tabla 5).

Tabla (5): Porcentajes de fase móvil estudiados

| Metanol (%) | Agua (%) | Acetonitrilo (%) |
|-------------|----------|------------------|
| 20 | 60 | 20 |
| 18 | 60 | 22 |
| 18 | 52 | 30 |
| 18 | 65 | 17 |
| 18 | 47 | 35 |
| 30 | 55 | 15 |

4.3.1.6-Temperatura del inyector

Durante los análisis realizados se vio que según cuál fuera la temperatura ambiental del laboratorio en el que se encontraba el equipo de UPLC, variaban los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes a las aflatoxinas estudiadas. Esto podía ser debido a que el inyector necesitara tener una temperatura fija.

Para comprobar cómo influía la temperatura en la detección de las toxinas se realizó una prueba con dos temperaturas diferentes del inyector: 10 °C (recomendación de la casa comercial) y temperatura ambiente (22-25°C).

4.3.2-Optimización de las etapas de extracción y purificación

Para los estudios de optimización y validación del método analítico se seleccionó como blanco de matriz una muestra de avellana en la que tras un análisis cromatográfico en el laboratorio no detectó la presencia de concentraciones de aflatoxinas superiores al límite de detección (LD)).

La puesta a punto de las etapas de extracción y purificación de la muestra, se llevó a cabo tomando como referencia las dos norma citadas en el punto 4.3, la norma UNE-EN 14123:2008 y la norma UNE-EN ISO 16050. Así englobamos todo el abanico de frutos secos y cereales.

Así, al basarnos en estas dos normas, consideramos los parámetros de validación en avellana como referencia para aplicar al resto de los frutos secos debido a la similitud en su composición. Además en la norma UNE-EN ISO 16050:2011, se incluyen los cereales, por lo que los resultados los consideraremos validos también para el caso del maíz.

4.3.2.1-Extracción

Como se ha comentado anteriormente, para la extracción de las aflatoxinas de las muestras analíticas tomamos como referencia las dos normas de AENOR ya citadas (UNE-EN 14123:2008 y UNE-EN ISO 16050:2011).

En ambos casos la extracción se realiza mediante agitación de la matriz en ultraturrax con un disolvente o mezcla de disolventes, que en el caso de la Norma UNE-EN 141123:2008 está constituida por una mezcla de metanol al 80% y hexano (66 partes de metanol al 80% y 33 partes de hexano) y en el caso de la Norma UNE-EN ISO 16050:2011 la disolución de extracción es metanol al 70%.

Además, en el primer caso a la extracción le sigue una fase de centrifugación (15 minutos a 3500 rpm) y recogida de la fase metanólica mientras que en el segundo, la muestra homogeneizada con el disolvente, y se somete a una filtración con papel de filtro Whatman nº1. En ambos casos se le añaden 0,5 g de NaCl para mejorar la extracción (Ariño *et al.*, 2009).

Para cada una de las técnicas, se realizó un ensayo por duplicado con una muestra de avellana enriquecida con 2 ng/g de G_1 y B_1 , y 0,6 ng/g para G_2 y B_2 . A continuación se inyectaron en el UPLC y se calcularon las recuperaciones obtenidas en cada caso.

4.3.2.2-Purificación: elección de la columna de inmunoafinidad

Se realizó un ensayo con dos tipos de columnas de inmunoafinidad de dos fabricantes diferentes para comprobar con cuál de las dos se conseguiría una mayor recuperación de las aflatoxinas presentes en las muestras.

El primer tipo analizado es la columna Aflatest® (VICAM) (Figura 7), con la cual se utiliza como reactivo de lavado el agua. La otra columna es Aflaprep® (R-biopharm) que requiere PBS para el mismo proceso.

Para llevar a cabo el estudio se realizó un ensayo por duplicado con muestras de avellana enriquecida con 20 ng/g de la solución madre (20 ng/g de G_1 y B_1 , y 6 ng/g de G_2 y B_2 , respectivamente) para cada tipo de columna, realizando todo el proceso según instrucciones de los fabricantes. Se utilizó una concentración elevada de aflatoxinas ya que se desconocían las recuperaciones de las mismas. Se calcularon las concentraciones de cada aflatoxina utilizando la ecuación de la recta y se compararon los resultados de las recuperaciones.



Figura (7): Columna de inmunoafinidad Aflatest®

4.3.2.3-Purificación: elección del volumen de purificación

Esta prueba se llevó a cabo para comprobar la influencia del volumen de muestra extraída y filtrada en la eficacia de la purificación. El objetivo fundamental era evitar saturaciones de la columna de inmunoafinidad sin comprometer al mismo tiempo la sensibilidad y precisión la técnica.

Para ello, después de obtener el filtrado una muestra, se tomaron 3 volúmenes diferentes de la misma (distinta cantidad de gramos de muestra) para posteriormente purificarlos a través de las columnas de inmunoafinidad.

Se enriquecieron seis muestras de avellana (dos para cada volumen de purificación) con 20 ng/g de aflatoxinas y dos muestras de avellana sin enriquecer. Se tomaron 4, 8

y 10 mL del filtrado de las enriquecidas y 4 mL de la no enriquecida, y se añadieron 16, 32 y 40 mL de agua respectivamente y 16 mL para la no enriquecida, para después purificarlo. Estos volúmenes correspondían finalmente a 1, 2 y 2,5 g de la muestra inicial que se habían analizado.

4.4-Método analítico para determinar aflatoxinas en frutos secos y cereales

Basándonos en los métodos previamente citados y con las modificaciones ensayadas y optimizadas, el protocolo final de análisis de aflatoxinas para distintas muestras de frutos secos y maíz es el siguiente:

Extracción

- Se pesan 5 gramos de las muestras previamente trituradas en un tubo Falcon y se añaden 20 mL de metanol al 70% y 0,5 g de NaCl.
- Esta mezcla se agita en un homogeneizador Ultraturax durante 1 minuto.
- El extracto obtenido se filtra con papel de filtro.
- Se recogen 4 mL del filtrado en otro tubo Falcon y se le añaden 16 mL de agua milliQ.

Purificación

- Se añaden los 20 mL de la muestra diluida a la columna de inmunoafinidad.
- Para eliminar sustancias interferentes, la columna se lava haciendo pasar 10 mL de agua milliQ.
- Las aflatoxinas se eluyen con 1 mL de metanol en un vial ámbar. El mililitro del vial se vuelve a pasar por la columna de inmunoafinidad tal y como recomienda el fabricante de las columnas de inmunoafinidad Aflatest® (VICAM).
- El eluato obtenido se evapora a sequedad en un bloque calefactor a 40°C bajo corriente de nitrógeno.

Determinación cromatográfica

Una vez llevado el eluato a sequedad, se redisuelve en 1 mL de fase móvil (metanol/agua/acetonitrilo) (30/55/15).

Finalmente se inyecta en el UPLC con las condiciones cromatográficas optimizadas:

- Columna BEH C18 100 x 2,1 mm y 1,7 µm de tamaño de partícula.
- Célula de derivatización de 13 µL.
- Flujo: 0,4 mL/min.
- Temperatura de la columna: 37°C.
- Temperatura del inyector: 10 °C.
- Volumen de inyección 1 µL.

- Longitudes de onda fijadas en el detector:
 - λ excitación: 365 nm y λ emisión: 435 nm para B₁ y B₂ (FLD)
 - λ excitación: 365 nm y λ emisión: 455 nm para G₁ y G₂ (FLD)

4.5-Validación del método analítico

Tras optimizar el método de análisis con los ensayos previos anteriormente descritos, se procedió a la validación del método completo de análisis.

La validación es el proceso mediante el cual se puede demostrar que los resultados producidos por un procedimiento analítico son fiables y reproducibles, y que se ajusta al propósito para el que fue desarrollado.

La validación de este método se ha realizado tomando como referencia el Reglamento (CE) Nº 401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, y en la Decisión de la Comisión (2002/657/CE) de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica de Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

4.5.1-Especificidad

Este parámetro estudia la capacidad del método de distinguir el analito de cualquier otra interferencia presente en las muestras que se analizan. Para verificar que ninguna interferencia coincide en la región de elución del analito de interés, se identificaron por UPLC las aflatoxinas G₂, G₁, B₂ y B₁, y aquellas interferencias procedentes de la matriz y/o de los materiales y reactivos utilizados en el procedimiento analítico.

Para ello se analizaron:

- Solución patrón de 10 ng/mL de aflatoxinas G₂, B₂ y de 3 ng/mL para la G₁ y B₁.
- Disolvente de inyección.
- Un blanco de proceso.
- Muestra blanco de avellana.
- Extractos de muestras de frutos secos enriquecidas con 2 µg/Kg para G₂, B₂ y de 0,6 µg/Kg para la G₁ y B₁.

Estos ensayos se realizan con el objeto de comprobar que no existen solapamientos de picos, que estos estén formados por un único componente y que la cuantificación sea correcta.

El blanco de proceso se realiza todo el procedimiento analítico: preparación de material, extracción, purificación, y determinación cromatográfica pero omitiendo la muestra, para verificar que durante el proceso analítico no se genera ninguna interferencia.

4.5.2-Linealidad

Es la capacidad de un método para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en un rango definido.

Este parámetro es inherente a las técnicas instrumentales donde el analito genera una señal electrónica medida por el detector que se registra en el cromatograma.

La linealidad viene representada a través de una recta de regresión, que se va a usar en la práctica como recta de calibrado para calcular, por interpolación, la concentración de aflatoxinas en las muestras problema.

Al no existir efecto matriz mensurable en el análisis de los frutos secos y el maíz, la calibración se realizó por el método del patrón externo. Para la construcción de la recta de calibrado se utilizaron patrones analíticos a distintas concentraciones en un intervalo de 0,125 ng/mL a 10 ng/mL para B₁ y G₁ y 0,0375 ng/mL a 3 ng/mL para B₂ y G₂ (Ver punto 4.1.3.2). Los resultados se evaluaron utilizando las condiciones cromatográficas anteriormente optimizadas.

Para verificar la linealidad se calculó el coeficiente de correlación (R^2) de la recta de calibración obtenida para cada compuesto estudiado.

4.5.3-Sensibilidad

Es la capacidad del instrumento o de un método para discriminar pequeñas diferencias en la concentración del analito.

Existen dos parámetros relacionados con la sensibilidad: el límite de detección y límite de cuantificación.

4.5.3.1-Limite de detección (LD)

En el análisis instrumental, un factor que afecta directamente a la exactitud y la precisión de un análisis es el ruido. Este factor está presente en la representación de las señales analíticas instrumentales. Un parámetro que se utiliza para certificar la calidad de un método analítico es la relación señal/ruido (S/N). Siendo S la señal correspondiente al compuesto objeto de estudio a un determinado nivel (medida en altura) y N la señal del ruido de fondo (midiendo la señal eléctrica que da en altura el ruido).

Para determinar el límite de detección se enriqueció una muestra blanco de avellana a distintas concentraciones en sentido decreciente hasta que la señal pudiera distinguirse del ruido de fondo.

Se partió de una muestra blanco matriz y se enriqueció esta muestra a una concentración de 0,015 ng/g para G₂ y B₂ en la que podía distinguirse del ruido de fondo y se calculó la media de las seis muestras blancas enriquecidas a ese nivel mas tres veces la desviación estándar de las replicas para hallar el límite de detección. Posteriormente se analizaron otras seis muestras enriquecidas a 0,05 ng/g para G₁ y B₁ y se calculó el límite de detección de la misma manera que para las otras.

Ya que no existían interferencias procedentes del chocolate, se consideró que el límite de detección obtenido a partir de la avellana se podía aplicar al resto de materias primas y a los productos con chocolate.

4.5.3.2-Limite de cuantificación (LC)

Es la menor cantidad de analito de la muestra que puede ser medida cuantitativamente con una certeza estadística razonable.

El límite de cuantificación se establece a un nivel que corresponde a la señal que se corresponde al nivel de muestra contaminada que se puede distinguir del ruido más diez veces la desviación estándar de éste.

4.5.4-Exactitud (Recuperación)

Según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, la exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. La exactitud se calcula determinando la veracidad y la precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

Al no disponer de material de referencia certificado, el estudio de la exactitud se llevó a cabo enriqueciendo una muestra blanco de avellana a dos niveles distintos de concentración: 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxinas B_1 y G_1 , y 0,3 y 0,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de B_2 y G_2 . Con estos dos niveles, se pretendía comprobar la validez del método para determinar niveles de aflatoxinas en valores próximos al menor límite máximo de residuo establecido por la legislación y en valores inferiores a él.

El enriquecimiento de las muestras se realizó previamente a la etapa de extracción para obtener el porcentaje de recuperación global de las aflatoxinas con el método utilizado.

En todos los niveles de enriquecimiento y para hallar el porcentaje de recuperación, se calcularon los resultados obtenidos en las muestras enriquecidas con las ecuaciones de la recta procedentes de las rectas de calibración.

4.5.5-Precisión

Es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas. Estas condiciones dependen de los factores variables entre ensayos. Algunos factores que se pueden considerar son los siguientes: laboratorio, analista, equipo UPLC y día en el que se hizo el ensayo.

Para determinar este parámetro se han analizado seis muestras de avellana independientes enriquecidas a 2 ng/g de aflatoxinas B_1 y G_1 y a 0,6 ng/g de B_2 y G_2 cada una.

La precisión se estudia en dos parámetros que son repetibilidad y reproducibilidad.

4.5.5.1-Precisión en la inyección

Este parámetro permite conocer las posibles fluctuaciones de las bombas y detectores en un corto periodo de tiempo, midiendo como afectan a los tiempos de retención y las áreas del patrón inyectado.

Para evaluar la precisión de la inyección se calculó la repetibilidad de los resultados obtenidos al inyectar seis repeticiones de un patrón de 10 ng/mL para G_1 y B_1 , y de 3 ng/mL para G_2 y B_2 mediante la determinación de la desviación estándar relativa de las áreas de pico cromatográficas correspondientes a las aflatoxinas estudiadas.

4.5.5.2-Repetibilidad del método

Esta se define como la desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (RSDr %) obtenida al analizar una misma muestra varias veces, en un intervalo de tiempo corto, sin cambiar de equipo de medida, reactivos y analista.

La repetibilidad de método, se determinó calculando la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos al analizar seis muestras de avellana enriquecidas con 1 y 2 ng/g de aflatoxinas B₁ y G₁ y 0,3 y 0,6 ng/g de B₂ y G₂ que fueron extraídas el mismo día, en el mismo laboratorio, equipo UPLC y analista.

4.5.5.3-Reproducibilidad del método

La reproducibilidad se define como la desviación estándar relativa en condiciones de reproducibilidad (RSDR %) obtenida al analizar varias veces una misma muestra en días distintos, pudiendo variar condiciones tales como el equipo UPLC, reactivos o analista y días de análisis.

Se habla de reproducibilidad interlaboratorio cuando las medidas se realizan en laboratorios distintos (ensayos de intercomparación).

En nuestro caso, el estudio de reproducibilidad intralaboratorio que se realizó se llevó a cabo por el mismo analista, en el mismo laboratorio y equipo UPLC pero en tres días diferentes. Las muestras que se analizaron para realizar este estudio fueron las mismas que se han indicado en el apartado anterior: seis muestras de avellana enriquecidas con 1 ng/g para G₂, B₂ y de 0,3 ng/g para la G₁ y B₁, y con 2 ng/g para G₂, B₂ y de 0,6 ng/g para la G₁ y B₁ cada día de análisis.

4.6-Determinación de aflatoxinas en muestras de frutos secos y maíz

Una vez puesta a punto y validada la metodología de extracción y determinación de aflatoxinas en frutos secos y maíz, se procedió al análisis de las muestras de frutos secos y maíz que se describen en el punto (4.2).

5-Resultados y discusión

Los métodos estandarizados de análisis son un elemento importante para garantizar la seguridad alimentaria y están internacionalmente reconocidos. Al no disponer en el Parque Científico Tecnológico Aula Dei de un método estandarizado de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales, hemos partido de las normas: UNE-EN ISO 16050:2011: “Determinación de aflatoxina B₁, y contenido total de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución”, UNE-EN 14123:2008 para la “Determinación de aflatoxina B₁ y de la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en avellanas, cacahuetes, pistachos, higos y pimentón molido. Método por cromatografía líquida de alta resolución con transformación química postcolumna y purificación en columna de inmunoafinidad”.

Igualmente, se han tenido en cuenta los conocimientos adquiridos en los estudios previos relativos a la presencia de micotoxinas en alimentos realizados por el grupo de investigación consolidado: “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria” y la bibliografía consultada, especialmente los protocolos comerciales de R-Biopharm, VICAM y Waters aceptados internacionalmente.

Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

5.1- Optimización y validación de un método analítico para la determinación de aflatoxinas en frutos secos y maíz

5.1.1-Optimización de las condiciones cromatográficas

5.1.1.1-Tiempos de retención

En los cromatogramas obtenidos pudimos ver los picos de las cuatro aflatoxinas con sus tiempos de retención fijados. El orden de elución de los picos fue G₂, G₁, B₂ y B₁, y los tiempos de retención 1,22; 1,40; 1,55 1,81 min respectivamente.

Así mismo se realizó un estudio de estabilidad con un patrón de 10 ng/mL para G₁ y B₁, y 3 ng/mL para G₂ y B₂. Se calcularon los coeficientes de variación (CV) para los tiempos de retención de cada una de las aflatoxinas: 1,95% para G₂, 4,96% para G₁, 3,18% para B₂ y 1,48% para B₁, observándose su estabilidad en el tiempo al obtenerse coeficientes de variación bajos.

5.1.1.2- Longitudes de onda

Inicialmente optimizamos las condiciones de análisis cromatográfico que nos permitieron llevar a cabo la correcta identificación y cuantificación de las aflatoxinas objeto de estudio.

Para seleccionar las longitudes de onda de emisión, se compararon las áreas de pico obtenidas a las distintas longitudes de onda ensayadas, seleccionando aquellas que proporcionaban un área de pico mayor para cada una de las aflatoxinas analizadas. Así, para las aflatoxinas B₁ y B₂ y coincidiendo con autores como Ariño *et al.*, (2009) se eligió una longitud de onda de emisión λ de 435 nm mientras que para las aflatoxinas G₁ y G₂ se fijó en 455 nm, valor que además coincide con las recomendaciones de la casa comercial. En todos los casos se fijó una longitud de onda de excitación de 365 nm (λ_{ex}) ya que todos los autores coincidieron en este valor.

A continuación se representan las longitudes de onda de emisión ensayadas (Figuras 8-11):

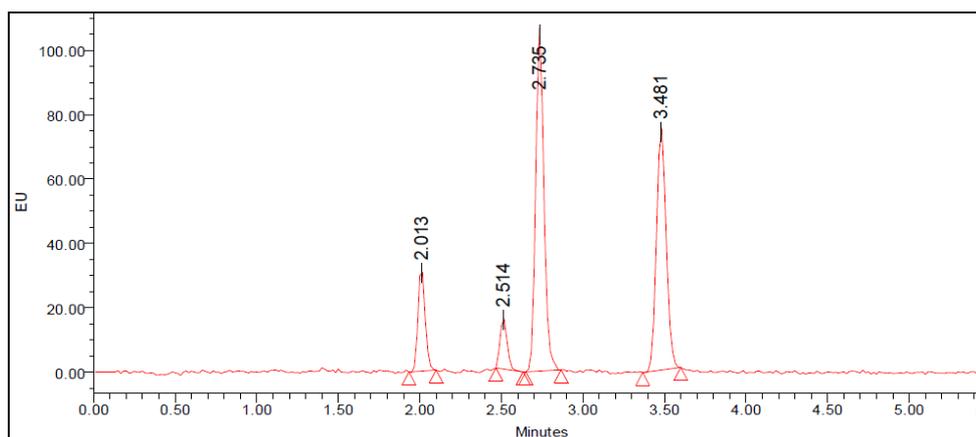


Figura (8): Cromatograma a 425nm de patrón de 10 ng/mL para B₁ y G₁, y de 3 ng/mL para G₂ y B₂

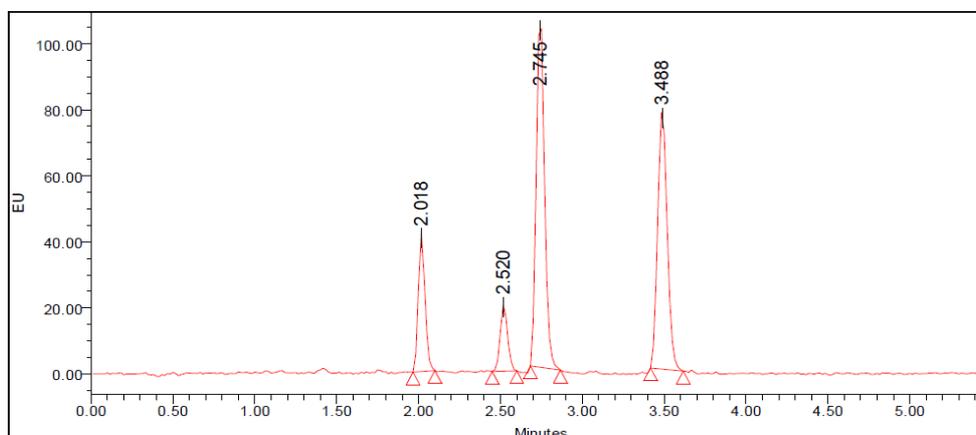


Figura (9): Cromatograma a 429nm de patrón de 10 ng/mL para B₁ y G₁, y de 3 ng/mL para G₂ y B₂

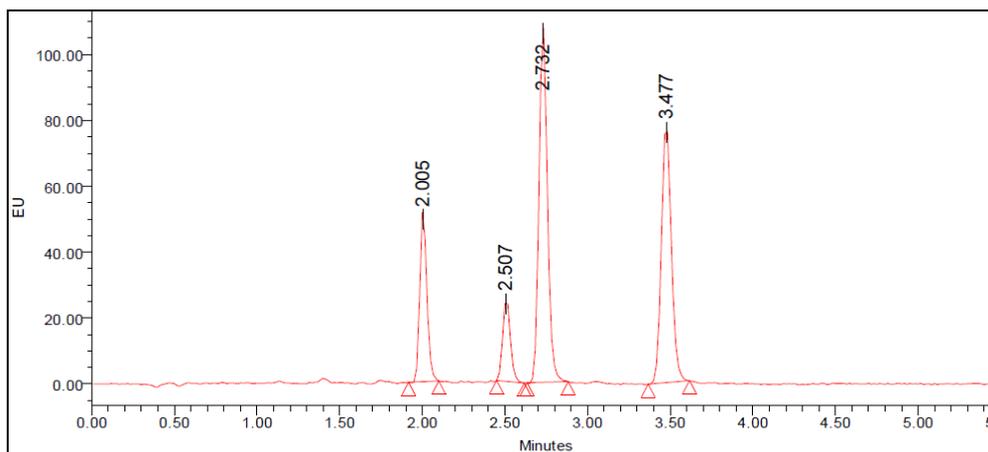


Figura (10): Cromatograma a 435 de patrón de 10 ng/mL para B₁ y G₁, y de 3 ng/mL para G₂ y B₂

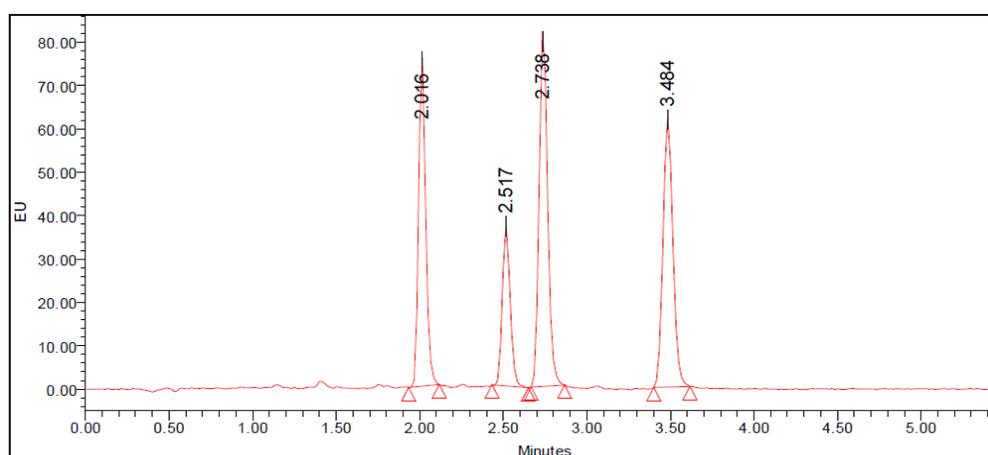


Figura (11): Cromatograma a 455nm de patrón de 10 ng/mL para B₁ y G₁, y de 3 ng/mL para G₂ y B₂

5.1.1.3-Volumen de inyección

Tras la inyección de los volúmenes de 1 y 10 μ L de patrones de diferentes concentraciones, se calcularon las áreas de pico obtenidas en los distintos cromatogramas.

Las áreas obtenidas con los 10 μ L tendrían que ser diez veces mayores que las obtenidas con 1 μ L. Los datos mostraron como las áreas de los picos analizados coincidían aproximadamente en la proporción 1/10, por lo que se podría decir que el volumen de inyección no tendría diferencia.

Por lo tanto se concluyó que se iba a utilizar el volumen de 1 μ L, ya que se obtenía una buena sensibilidad y unos cromatogramas con menor ruido e interferencias.

5.1.1.4-Flujo de la fase móvil

Una vez inyectado el patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y de 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con los dos flujos de fase móvil, se procedió a comparar los cromatogramas obtenidos (Figuras 12 y 13).

Como era de esperar, con un flujo de 0,3 mL/min se obtuvieron unos tiempos de retención mayores con respecto al flujo de 0,4 mL/min ya que al discurrir la fase móvil por la columna con más lentitud las aflatoxinas eluyen más tarde.

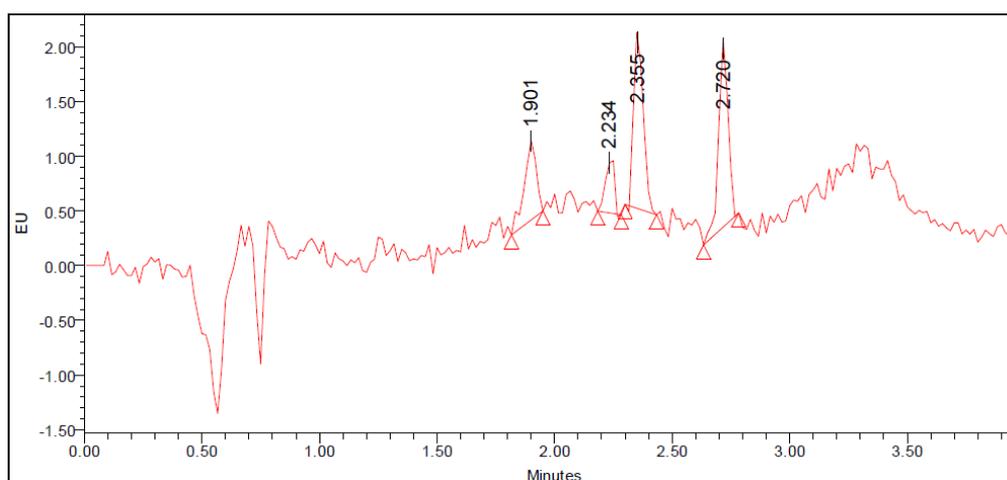


Figura (12): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125ng/mL para G₁ y B₁, y de 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con un flujo de fase móvil de 0,3 mL/min

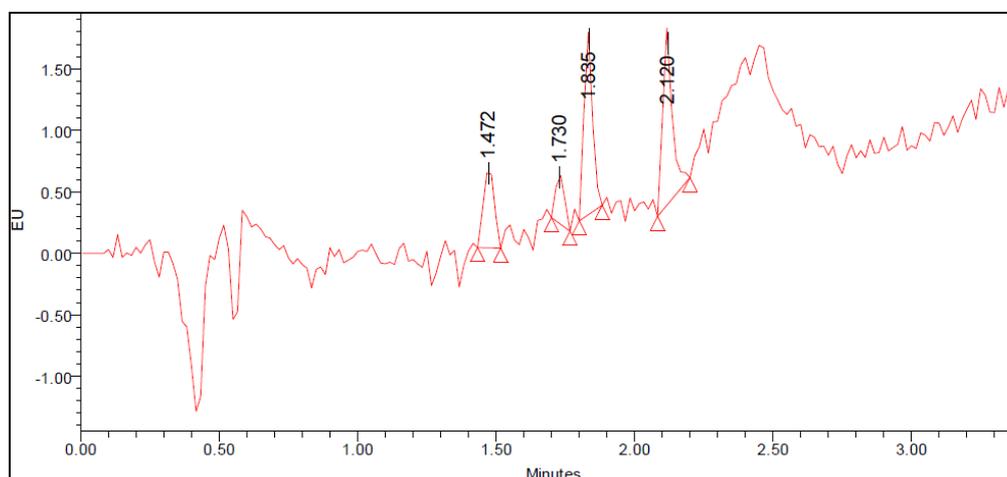


Figura (13): Cromatograma a 435nm de un patrón de 0,125ng/mL para G₁ y B₁, y de 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con un flujo de fase móvil de 0,4 mL/min

Sin embargo, las áreas de los picos fueron muy similares en ambos casos sin observarse apenas diferencias entre los dos cromatogramas a excepción de los tiempos de retención. Por ello, se determinó como flujo de la fase móvil para nuestro método el recomendado por Waters, de 0,4 mL/min, con el que se conseguían unos menores tiempos de retención sin comprometer la resolución cromatográfica.

5.1.1.5-Composición de la fase móvil

Los resultados obtenidos con las distintas fases móviles ensayadas, mostraron que cuanto mayor era la proporción de acetonitrilo en la mezcla más tarde eluía la interferencia en el cromatograma, separándose así de los compuestos de interés. Sin embargo, dicha separación se consideró insuficiente tal y como muestran las figuras (Figuras 14, 15, 16 y 18).

En el ensayo en el que incrementamos el porcentaje de agua y disminuimos el de acetonitrilo la interferencia se adelantaba con lo que nos decantamos por modificar la proporción de metanol (Figura 17).

Finalmente, con la mezcla de metanol, agua y acetonitrilo en la que al igual que hacen algunos autores (Hussain 2011; Copetti *et al.*, 2011) se aumentó considerablemente la proporción de metanol (30/55/15), se consiguió eliminar dicha interferencia del cromatograma. Por lo tanto esta fue la composición de la fase móvil de elección tal y como muestra la figura (19).

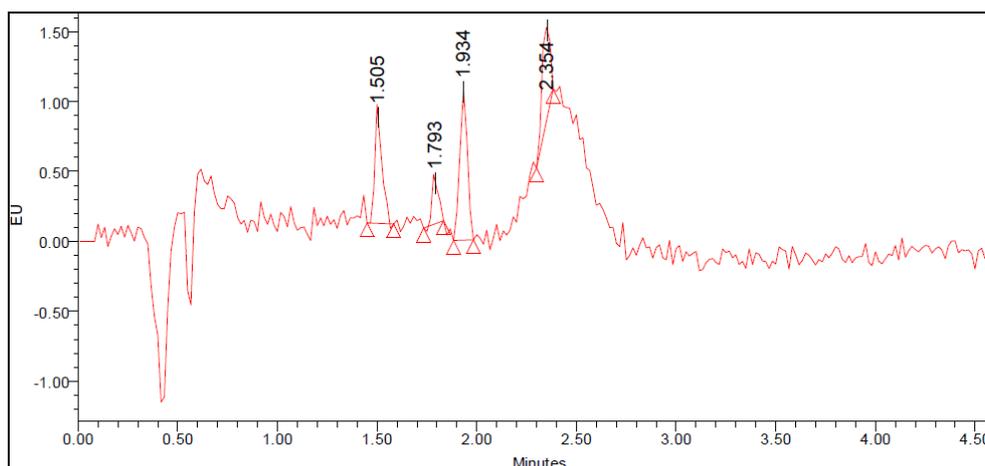


Figura (14): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (20/60/20)

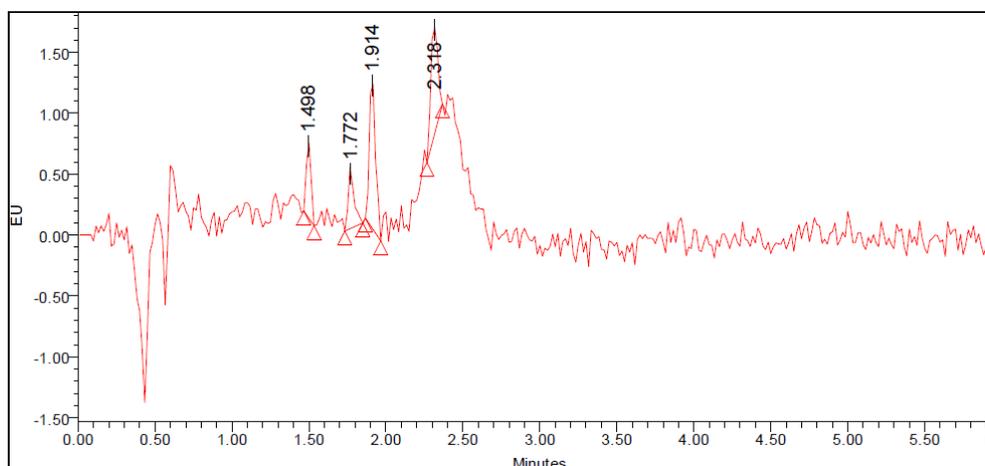


Figura (15): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/60/22)

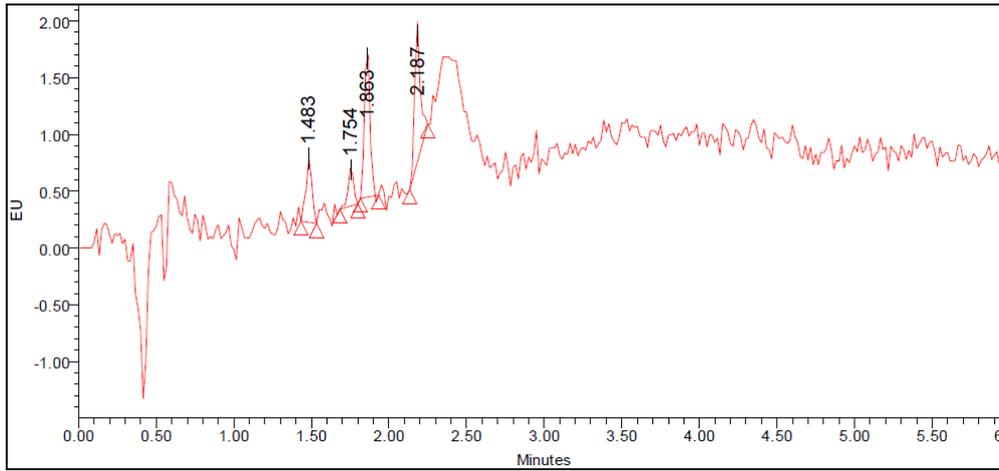


Figura (16): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/52/30)

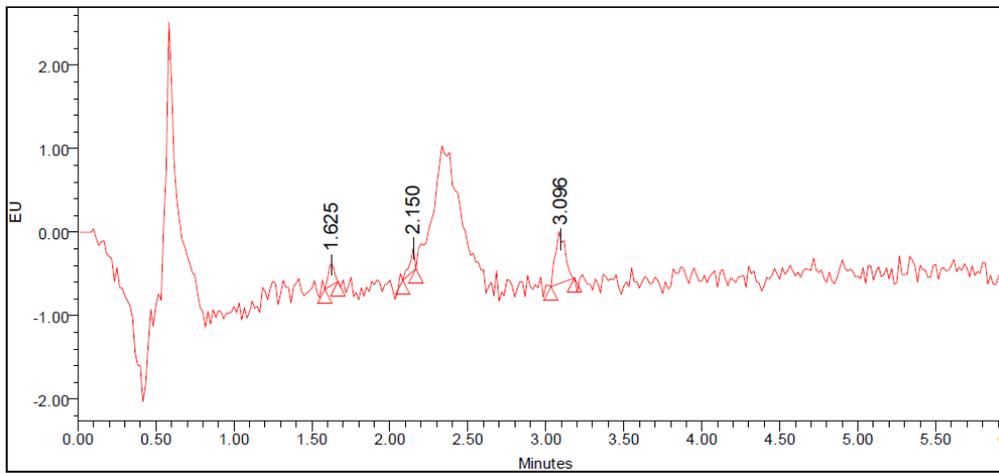


Figura (17): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/65/17)

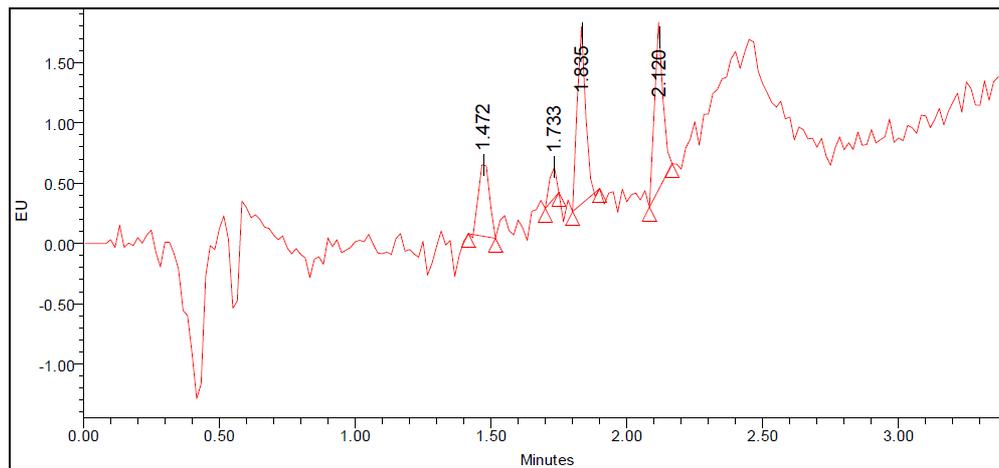


Figura (18): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (18/47/35)

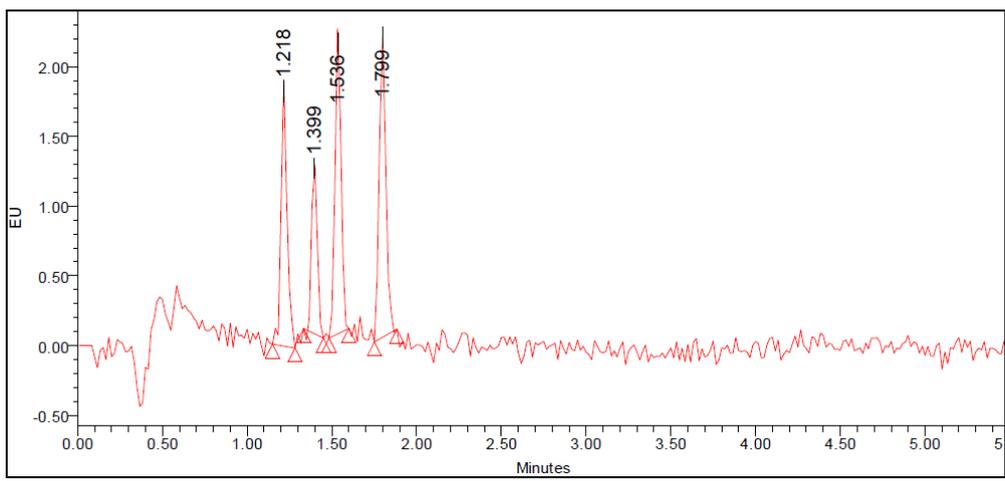


Figura (19): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 0,125 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,0375 ng/mL para G₂ y B₂ con fase móvil metanol/agua/ACN (30/55/15)

5.1.1.6-Temperatura del inyector

Una vez realizados los análisis con las temperaturas de 10 °C y a temperatura ambiente, se observaron los cromatogramas obtenidos (figuras 20 y 21).

A temperatura ambiente, los tiempos de retención de los picos cromatográficos de las cuatro aflatoxinas fluctuaban más entre las diferentes inyecciones y aparecían a un tiempo de retención mucho mayor que a la temperatura fija de 10°C. Tanto la cuantificación de las áreas como la resolución de los picos y la estabilidad de los tiempos de retención a 10 °C mejoraba considerablemente tal y como se representa en las figuras que se muestran a continuación (20 y 21).

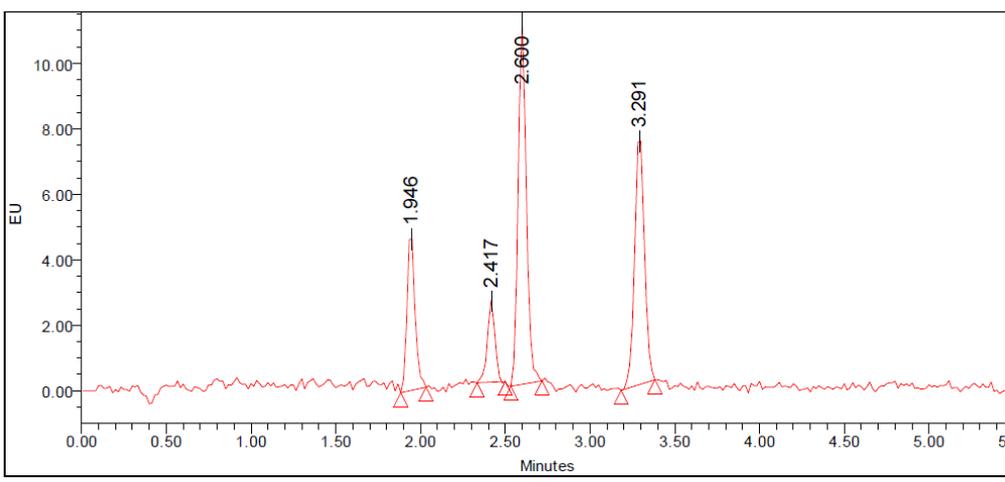


Figura (20): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 1 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,3 ng/mL para G₂ y B₂ con el inyector a temperatura ambiente

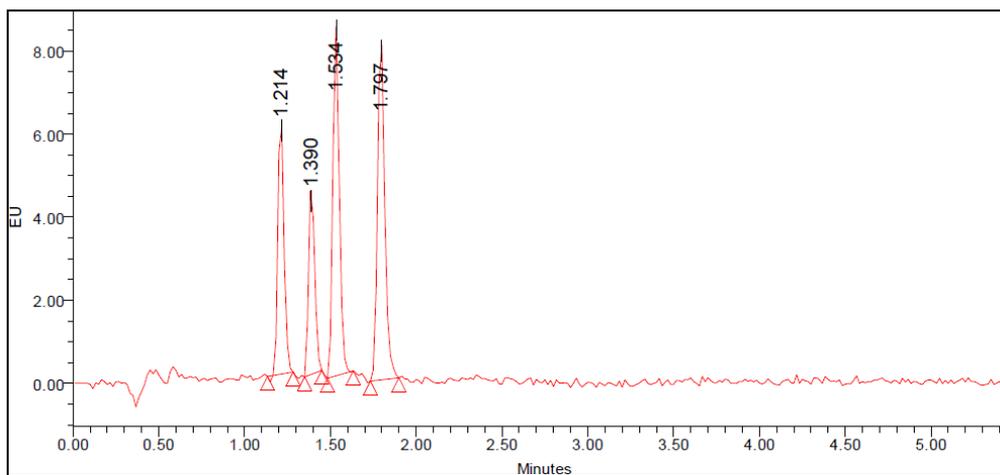


Figura (21): Cromatograma a 435 nm de un patrón de 1 ng/mL para G₁ y B₁, y 0,3 ng/mL para G₂ y B₂ con el inyector a 10 °C

5.1.2- Optimización de las etapas de extracción y purificación

5.1.2.1- Extracción

Al llevar a cabo la extracción según la Norma UNE-EN 141123:2008 con metanol al 80 % y hexano, se obtuvieron unas áreas de pico menores (línea negra del cromatograma de la figura 22) que en el caso del método basado en la Norma UNE-EN ISO 16050:2011 que su extracción es solamente con metanol al 70 % (línea azul del cromatograma de la figura 22).

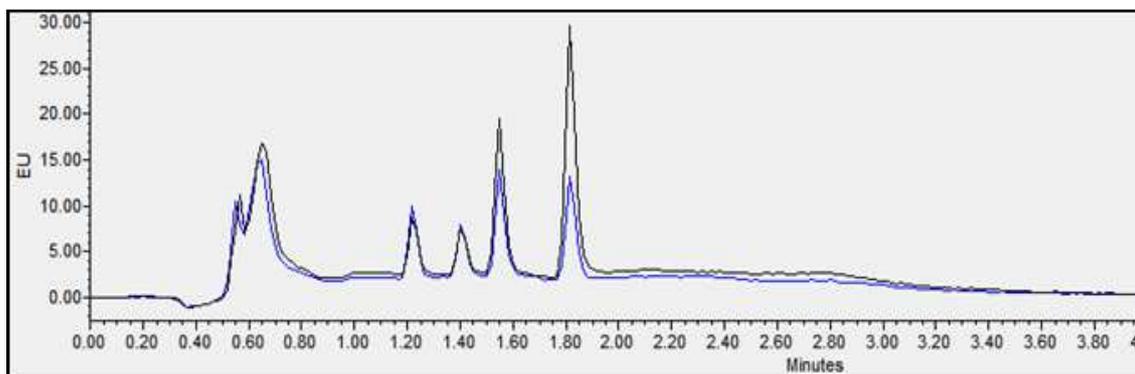


Figura (22): Cromatogramas superpuestos a 435 nm de avellana enriquecida a 2 ng/g para G₁ y B₁, y 0,6 ng/g para G₂ y B₂. La línea azul correspondiente a la Norma UNE-EN 141123:2008 y la línea negra a la Norma UNE-EN ISO 16050:2011

Se registraron las áreas obtenidas para cada aflatoxina y se interpolaron en la ecuación de la recta, y así se obtuvieron las concentraciones de cada aflatoxina. A continuación se calcularon las recuperaciones obtenidas por cada uno de los métodos de extracción.

Tabla (6): Recuperaciones (%) obtenidas con cada una de las normas

| Disolvente de extracción | Recuperación (%) | | | |
|--|------------------|-------|--------|--------|
| | AF G2 | AF G1 | AF B2 | AF B1 |
| Metanol al 80%/hexano (66:33)(UNE-EN 141123:2008) | 59,86 | 60,89 | 73,35 | 68,349 |
| Metanol al 70% (UNE-EN 16050:2011) | 74,09 | 76,64 | 105,27 | 108,07 |

Como puede verse en la tabla (6) se obtuvieron mayores recuperaciones con el método basado en la norma UNE-EN 16050:2011, y por lo tanto fue el que se eligió.

5.1.2.2- Purificación: elección de la columna de inmunoafinidad

Una vez obtenidos los cromatogramas de los dos tipos de columnas de afinidad estudiadas para la purificación de las muestras de avellana enriquecidas a 20 ng/g de G₁ y B₁ y con 6 ng/g de G₂ y B₂ se calcularon las recuperaciones obtenidas de cada aflatoxina con cada una de ellas:

Tabla (7): Recuperaciones (%) obtenidas con las dos columnas

| Columna de inmunoafinidad | Recuperación (%) | | | |
|---------------------------|------------------|-------|-------|--------|
| | AF G2 | AF G1 | AF B2 | AF B1 |
| Aflatest® (VICAM) | 108,38 | 75,22 | 82,82 | 103,52 |
| Aflaprep® (R-biopharm) | 38,36 | 37,07 | 79,56 | 101,92 |

Tal y como se muestra en la tabla 7, las mejores recuperaciones para las cuatro micotoxinas estudiadas, se obtuvieron para la columna de inmunoafinidad Aflatest® que fue por tanto la elegida para llevar a cabo los análisis de las muestras.

5.1.2.3-Purificación: Ensayo de volumen de purificación

Para la elección del volumen de muestra filtrada que se iba a hacer pasar por las columnas de inmunoafinidad, se representaron en una gráfica las áreas obtenidas para cada volumen filtrado para cada una de las aflatoxinas estudiadas. Con esto se puede comprobar si todos los volúmenes son lineales, es decir, al aumentar la cantidad de muestra aumenta proporcionalmente las áreas.

Se observó que para las aflatoxinas G₁, B₂ y B₁ al aumentar la concentración aumentaba proporcionalmente la señal eléctrica, pero en el caso de la G₂ se vio que el punto de 10 mL no era lineal con los otros dos (Figura 23).

Este fenómeno puede ser explicado por la saturación de la columna de inmunoafinidad al pasar la muestra de 10 mL del filtrado que correspondería con 2,5 g de la muestra.

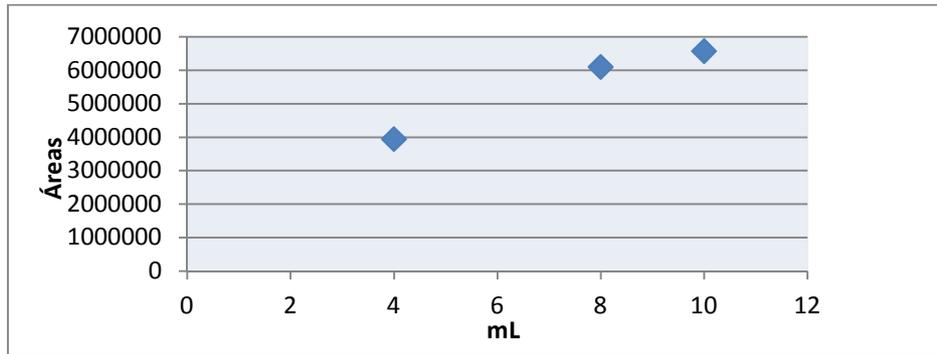


Figura (23): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina G₂

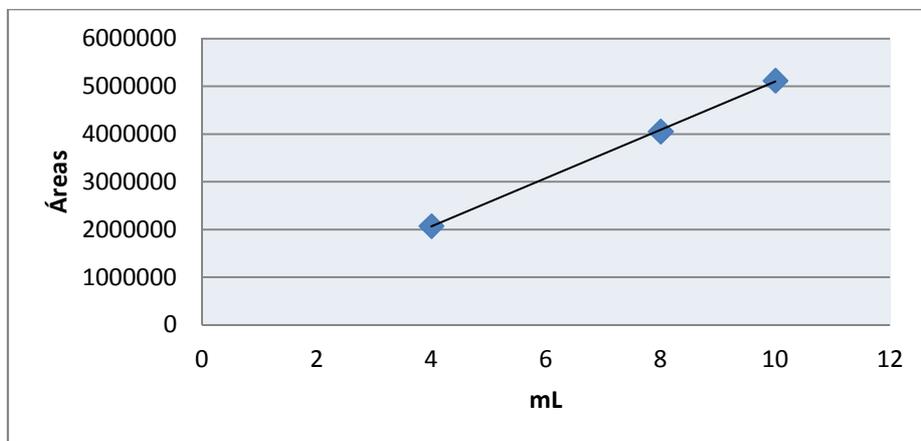


Figura (24): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina G₁

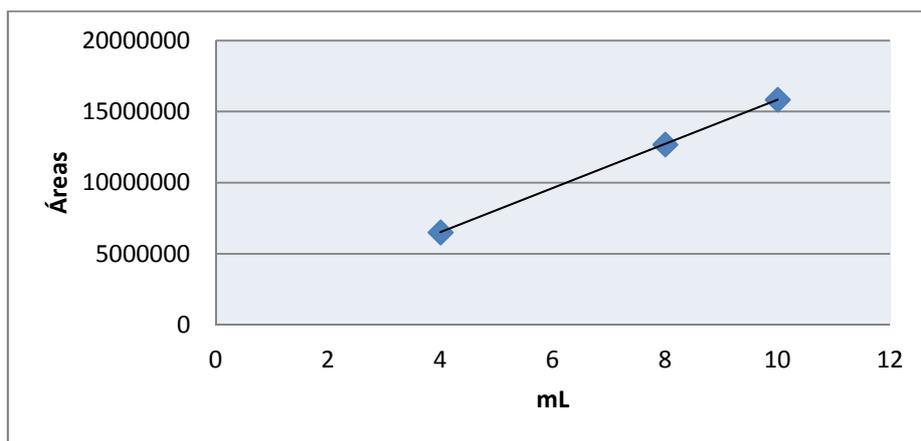


Figura (25): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina B₂

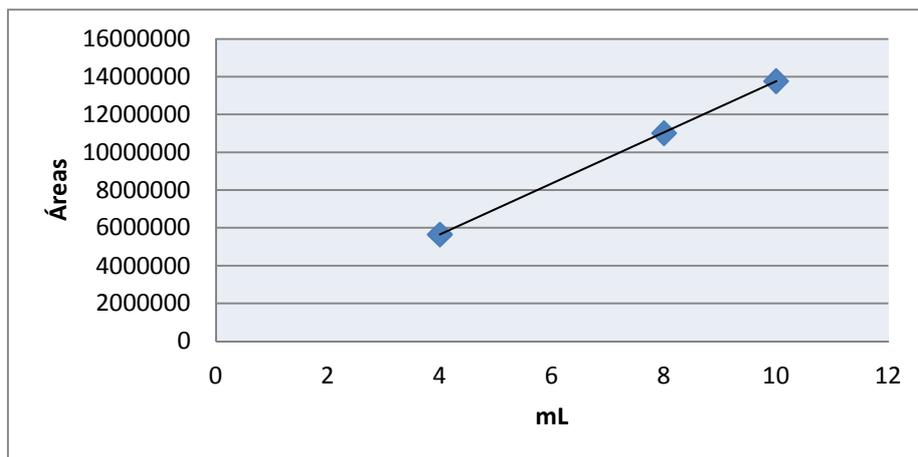


Figura (26): Representación de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes de purificación para la aflatoxina B₁

Por esto se determinó que para los análisis de las muestras se tomaría un volumen de 4 mL del filtrado. Con este volumen, que se corresponde con 1 g de muestra, el factor de dilución del proceso será de 1, además de que al ser el menor volumen filtrado se optimiza y agiliza el protocolo de purificación al mismo tiempo que se consigue una buena sensibilidad de la técnica.

5.2-Validación del método analítico

5.2.1-Especificidad

Tal y como se muestra en los cromatogramas correspondientes a una inyección de la fase móvil (Figura 27) y del blanco de proceso (Figura 28) se observó que tanto los disolventes de extracción y purificación como la fase móvil no aportaban ninguna interferencia al cromatograma en los tiempos de retención de las aflatoxinas estudiadas.

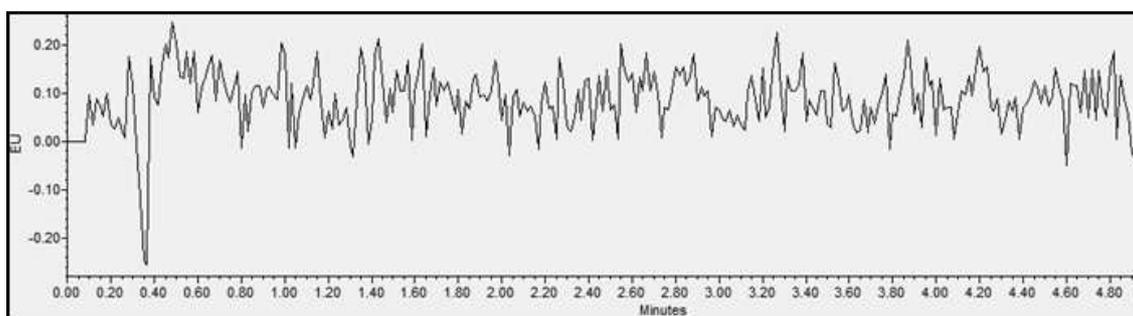


Figura (27): Cromatograma del disolvente de inyección

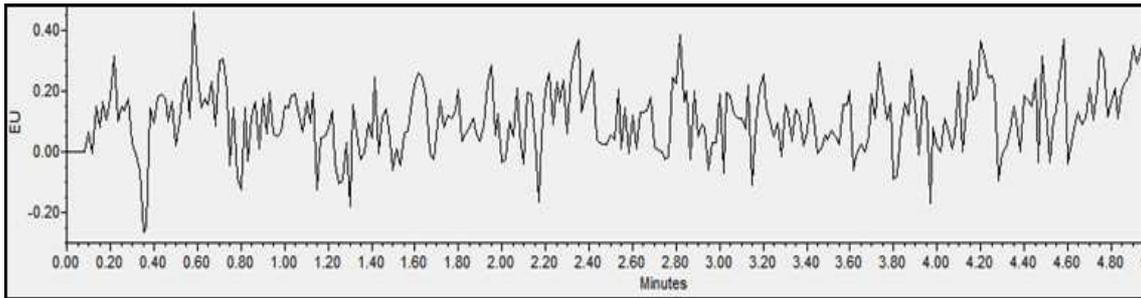


Figura (28): Cromatograma del blanco de proceso

A continuación, observamos el cromatograma de la muestra de avellana blanco que se tenía en el laboratorio, y que se utilizó para los enriquecimientos. Se puede comprobar cómo no presentan ningún pico de aflatoxinas (Figura 29).

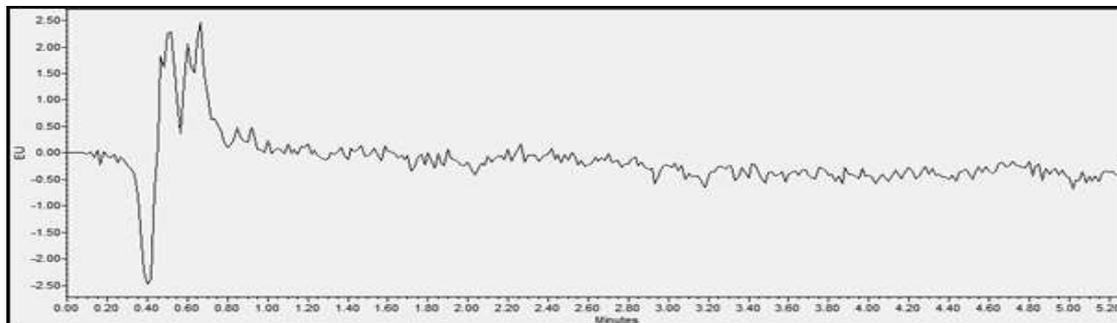


Figura (29): Cromatograma de la muestra blanco de avellana

Posteriormente, se analizó una muestra de avellana enriquecida con 2 ng/g para G_1 y B_1 , y a 0,6 ng/g para G_2 y B_2 . Al calcular la recuperación de esta muestra no se observaron porcentajes de recuperación por encima de los valores establecidos que pudieran indicar la presencia de interferencias coincidentes con los picos cromatográficos de las aflatoxinas analizadas.

5.2.2-Linealidad

Los resultados del análisis de seis rectas de calibrado para cada una de las aflatoxinas estudiadas mostraron unos valores medios de R^2 de 0,9999 para G_2 , 0,9998 para G_1 , 0,9998 para B_2 y 0,9999 para B_1 demostrando de este modo la linealidad de la calibración (Figuras 30-33).

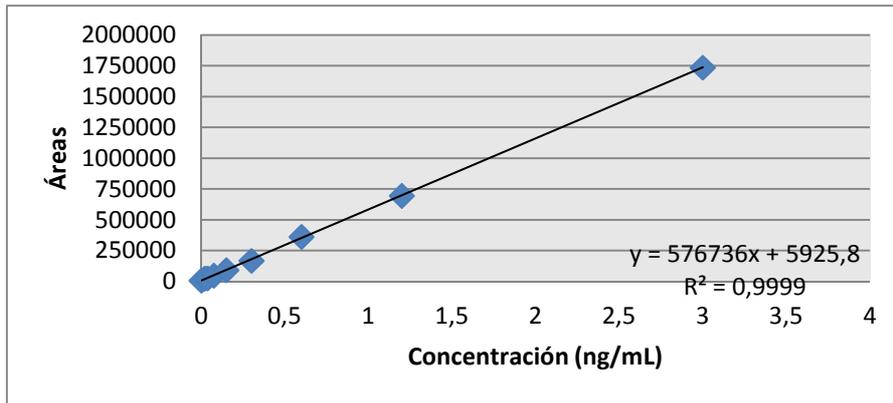


Figura (30): Recta de calibrado para G₂ con concentraciones de 0,0375 ng/mL a 3 ng/mL

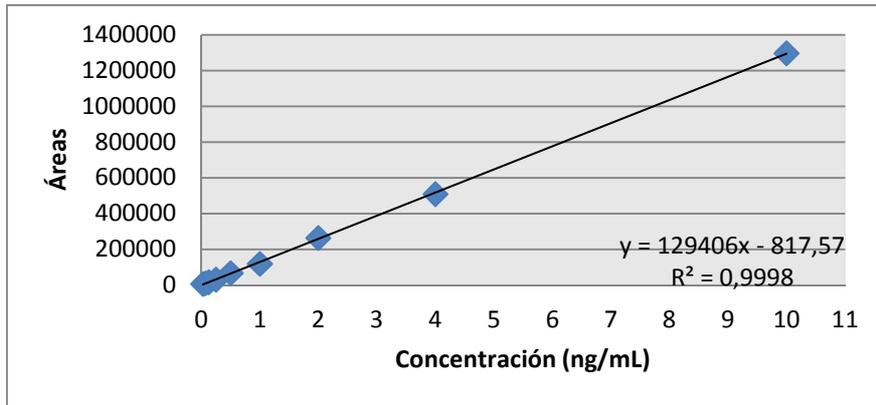


Figura (31): Recta de calibrado para G₁ con concentraciones de 0,125 ng/mL a 10 ng/mL

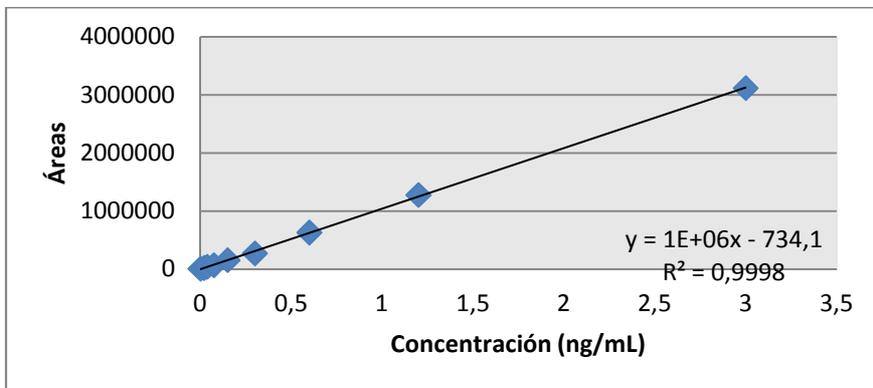


Figura (32): Recta de calibrado para B₂ con concentraciones de 0,0375 ng/mL a 3 ng/mL

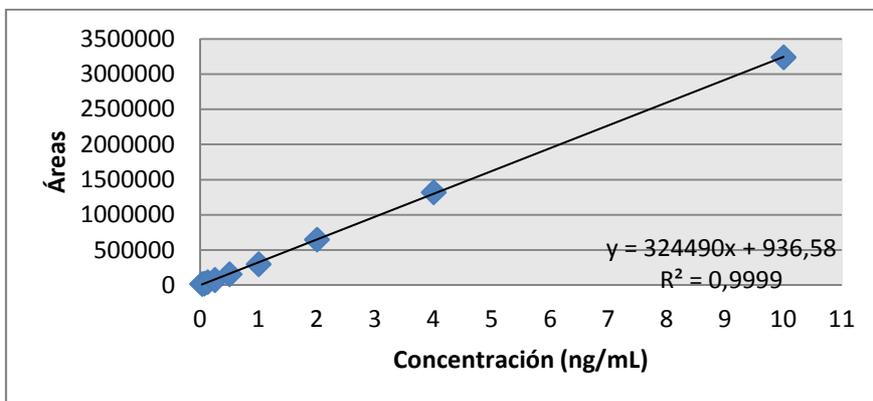


Figura (33): Recta de calibrado para B₁ con concentraciones de 0,125 ng/mL a 10 ng/mL

Revisando la bibliografía se observó como autores como Huang *et al.* (2010) también obtuvieron valores de R^2 mayores de 0,999 para todas las aflatoxinas.

5.2.3-Sensibilidad

5.2.3.1-Límite de detección

Tras la inyección de las seis muestras enriquecidas, se calculó el límite de detección para cada una de las micotoxinas obteniéndose los siguientes valores:

Tabla (8): Límites de detección para cada aflatoxina

| Aflatoxina | LD (ng/g) |
|----------------|-----------|
| G ₂ | 0,016 |
| G ₁ | 0,057 |
| B ₂ | 0,015 |
| B ₁ | 0,050 |

Tal y como se muestra en la tabla 8, los bajos límites de detección obtenidos muestran cómo el método desarrollado es muy sensible, siendo esta sensibilidad mayor para las aflatoxinas G₂ y B₂.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores (Tabla 9), podemos concluir que nuestro equipo tiene una gran sensibilidad para detectar las aflatoxinas, ya que los límites de detección son mucho más bajos que los revisados en la tabla para las aflatoxinas G₂, G₁ y B₂. En el caso de la B₁ se ha llegado a detectar por otros autores hasta 0,008 µg/Kg.

Tabla (9): Límites de detección obtenidos por otros autores

| Autor | AF G2 (LD µg/Kg) | AF G1 (LD µg/Kg) | AF B2 (LD µg/Kg) | AF B1 (LD µg/Kg) | Equipo analítico |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Huang <i>et al.</i> , 2010 | 0,212 | 0,085 | 0,056 | 0,009 | UPLC |
| Fu <i>et al.</i> , 2008 | 0,19 | 0,32 | 0,19 | 0,32 | UPLC |
| Sook <i>et al.</i> , 2007 | 1,25 | 0,40 | 0,13 | 0,008 | HPLC |

5.2.3.2-Lmite de cuantificación

Posteriormente calculamos los límites de cuantificación tal como se ha descrito en el apartado de material y métodos (Tabla 10).

Tabla (10): Límites de cuantificación para cada aflatoxina

| Aflatoxina | LC (ng/g) |
|----------------|-----------|
| G ₂ | 0,053 |
| G ₁ | 0,189 |
| B ₂ | 0,049 |
| B ₁ | 0,166 |

Como en el caso del límite de detección, la cifra para las aflatoxinas G₁ y B₁ es mucho más baja que para las otras dos. Esto refuerza la idea de que éstas son mucho más sensibles que la G₂ y B₂.

Según otros autores (tabla 11), los valores del límite de cuantificación varían mucho con respecto al método y equipo utilizados. Para el caso de las aflatoxinas G₂ y B₂, se ha obtenido unos límites muy por debajo de los que se pueden observar en la revisión de la tabla (11). Mientras que para el caso de la G₁ coincidimos con el valor aportado por Huang *et al.* (2010), y para B₁ obtenemos un resultado similar a Sook *et al.* (2007).

Tabla (11): Límites de cuantificación obtenidos por otros autores

| Autor | AF G2 (LC µg/Kg) | AF G1 (LC µg/Kg) | AF B2 (LC µg/Kg) | AF B1 (LC µg/Kg) | Equipo analítico |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Huang <i>et al.</i> , 2010 | 0,273 | 0,182 | 0,084 | 0,012 | UPLC |
| Fu <i>et al.</i> , 2008 | 0,63 | 1,07 | 0,63 | 1,07 | UPLC |
| Sook <i>et al.</i> , 2007 | 2,50 | 1,30 | 0,40 | 0,15 | HPLC |

5.2.3.3-Exactitud (Recuperación)

Este parámetro se estudió mediante ensayos de recuperación analizando seis muestras de avellana enriquecidas a distintos niveles de concentración: 1 µg/Kg y 2 µg/Kg para G₁ y B₁, y de 0,3 y 0,6 µg/Kg para G₂ y B₂.

Según el Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial del contenido de mico toxinas en productos alimenticios, las recuperaciones para concentraciones de 1 y 2 µg/Kg deben arrojar valores de entre el 70 y el 110%.

En nuestro caso se han obtenido las siguientes recuperaciones:

Tabla (12): Recuperaciones (%) de muestras enriquecidas a 1 y 2 µg/Kg para G₁ y B₁, a 0,3 y 0,6 µg/Kg para G₂ y B₂

| | Recuperación % | | | |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | AF G ₂ | AF G ₁ | AF B ₂ | AF B ₁ |
| Enriquecimiento a 1 µg/Kg | 72,28 | 74,74 | 77,80 | 74,36 |
| Enriquecimiento a 2 µg/Kg | 74,09 | 76,64 | 105,27 | 108,07 |

Podemos concluir que las recuperaciones que hemos conseguido se encuentran dentro de los límites establecidos por la legislación según el Reglamento (CE) 401/2006 a los niveles de enriquecimiento de 1 y 2 ng/g. Además también observamos que los porcentajes de recuperación son semejantes a los obtenidos por otros autores tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla (13): Resultados de recuperación de otros autores

| Autor | G2 (% recuperación) | G1 (% recuperación) | B2 (% recuperación) | B1 (% recuperación) |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Luttfullah y Hussain, 2011 | 91,5 | 89,5 | 88,2 | 85,7 |
| Huang <i>et al.</i> 2010 | 74,7 | 80,8 | 85,5 | 82,5 |
| Fu <i>et al.</i> , 2008 | 91,8 | 90,6 | 88,1 | 91,8 |
| Cheraghali <i>et al.</i> , 2007 | 61,8 | 97,8 | 95,1 | 97,3 |
| Sook <i>et al.</i> , 2007 | 83,4 | 102,1 | 84,8 | 102 |
| Chan <i>et al.</i> , 2004 | 80 | 84 | 87 | 83 |
| Otta <i>et al.</i> , 2000 | 76,8 | 74,4 | 103,9 | 98,6 |

5.2.3.4-Precisión

5.2.3.4.1- Precisión en la inyección

En la siguiente tabla (14), se muestran los valores calculados de desviación estándar relativa obtenidos tras la inyección de seis repeticiones de un patrón de calibración a las concentraciones de 10 ng/mL para G₁ y B₁, y de 3 ng/mL para G₂ y B₂.

Tabla (14): RSD% que cada una de las aflatoxinas en la inyección

| Aflatoxina | G2 | G1 | B2 | B1 |
|-------------------------------------|------|------|------|------|
| Desviación estándar relativa (RSD%) | 4,79 | 1,81 | 3,37 | 1,60 |

Según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, la RSD % de una fracción de muestra de 10 ng/mL no puede superar el 20 %. Así que los datos obtenidos están muy por debajo de este porcentaje, y por lo tanto podemos concluir que la inyección de las muestras en el UPLC es precisa.

5.2.3.4.2- Repetibilidad del método

La repetibilidad la calculamos con la desviación estándar relativa o coeficiente de variación de cada una de las aflatoxinas analizadas en los distintos niveles de enriquecimiento de las muestras ensayados.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 15.

Tabla (15): RSDr % en condiciones de repetibilidad para una muestra enriquecida con 1 ng/g de aflatoxinas B₁ y G₁ y 0,3 ng/g de B₂ y G₂

| | AF G2 | AF G1 | AF B2 | AF B1 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| RSDr % de muestras enriquecidas a 1 ng/g (B1, G1) y 0,3 ng/g (B2, G2) | 7,46 | 2,40 | 2,97 | 3,27 |
| RSDr % de muestras enriquecidas a 2 ng/g (B1, G1) y 0,6 ng/g (B2, G2) | 7,01 | 3,20 | 1,82 | 4,50 |

Al igual que en el apartado anterior, según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE la RSDr % tiene que ser menor al 30,16 y al 26,26 % a los niveles de enriquecimiento 1 y 2 ng/g B₁ y G₁, y 0,3 y 0,6 para B₂ y G₂, respectivamente. Este valor se ha obtenido teniendo en cuenta la ecuación de Horwitz, en la que se obtiene el RSD_R% en condiciones de reproducibilidad, tal y como muestra la figura (34). El valor RSDr % en condiciones de repetibilidad de las muestras que hemos enriquecido tiene que ser inferior a dos tercios del RSD_R% en condiciones de reproducibilidad obtenido por Horwitz tal y como recomienda la Decisión. Todos los valores que hemos obtenido están por debajo de ese porcentaje. 32,58 y 36,17 (0,6 y 0,3

$$RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Figura (34): Ecuación de Horwitz donde C es la fracción de expresada como potencia de 10

Realizando una revisión bibliográfica (Tabla 16), se comprobó que las RSDr% en condiciones de repetibilidad están cercanas a las obtenidas por otros autores. Así mismo se pudo determinar que los equipos de UPLC proporcionan unas menores RSDr % en condiciones repetibilidad, con respecto al HPLC.

Tabla (16): RSDr % en condiciones de repetibilidad obtenido por diferentes autores

| Autor | AF G ₂ (RSD%) | AF G ₁ (RSD%) | AF B ₂ (RSD%) | AF B ₁ (RSD%) | Equipo análisis |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Fu <i>et al.</i> , 2008 | 3,6 | 3,2 | 3,1 | 2,1 | UPLC |
| Chan <i>et al.</i> , 2004 | 9,67 | 10,13 | 9,06 | 9,42 | HPLC |

5.2.3.4.3-Reproducibilidad del método

Para calcular la reproducibilidad se obtiene la desviación estándar relativa en condiciones de reproducibilidad previamente mencionadas (Punto 5.2.3.4.3).

Tabla (17): RSD_R% de reproducibilidad para una muestra enriquecida con 1 ng/g de aflatoxinas B₁ y G₁ y 0,3 ng/g de B₂ y G₂, y 2 ng/g B₁ y G₁ y 0,6 ng/g B₂ y G₂

| | AF G ₂ | AF G ₁ | AF B ₂ | AF B ₁ |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| RSD_R % (1 ng/g (B₁, G₁) y 0,3 ng/g (B₂, G₂)) | 12,01 | 6,80 | 13,76 | 11,18 |
| RSD_R % (2 ng/g (B₁, G₁) y 0,6 ng/g (B₂, G₂)) | 13,34 | 5,21 | 12,80 | 12,23 |

Según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE la RSD_R% tiene que ser menor al 45,25 y al 39,39 % a los niveles de enriquecimiento 1 y 2 ng/g B₁ y G₁, y 0,3 y 0,6 para B₂ y G₂, respectivamente. Este valor se calcula a partir de la ecuación de Horwitz (figura 34) a 1 y 2 ng/g para B₁ y G₁, y 0,3 y 0,6 ng/g para B₂ y G₂. Todos los coeficientes de variación calculados de las distintas aflatoxinas son inferiores a estos valores. 54,25 y 48,87 0,3 y 0,6

En la Tabla (18), podemos observar resultados de reproducibilidad obtenidos por otros autores. Podemos decir que nuestros datos son muy cercanos a los consultados en la revisión bibliográfica.

Tabla (18): Datos de RSD_R % en condiciones de reproducibilidad obtenida por otros autores

| Autor | AF G ₂ (RSD%) | AF G ₁ (RSD%) | AF B ₂ (RSD%) | AF B ₁ (RSD%) | Equipo análisis |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Fu <i>et al.</i> , 2008 | 11,4 | 9,3 | 12,4 | 7,8 | UPLC |
| Chan <i>et al.</i> , 2004 | 13,79 | 12,50 | 10,22 | 10,31 | HPLC |

5.3-Determinación de aflatoxinas en muestras de frutos secos y maíz

Una vez optimizada y validada la metodología para determinar aflatoxinas en muestras de frutos secos y maíz, se procedió al análisis de las muestras recibidas. Para ello, tanto las muestras de materia prima como las muestras de frutos secos con cobertura de chocolate, se sometieron al proceso completo de extracción, purificación y determinación desarrollado. Así, se obtuvieron los cromatogramas de todas las muestras analizadas, identificándose los picos de las aflatoxinas presentes en las muestras por comparación de sus tiempos de retención con los de la solución patrón de calibración inyectada en el mismo día.

En la siguiente tabla (19) se pueden observar los resultados de las concentraciones en cada muestra de cada aflatoxina y la suma de las cuatro.

Tabla (19): Concentraciones ($\mu\text{g/Kg}$) de las muestras analizadas

| | Concentración ($\mu\text{g/Kg}$) | | | | |
|---|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|--|
| | G ₂ | G ₁ | B ₂ | B ₁ | G ₂ +G ₁ +B ₂ +B ₁ |
| Almendra tipo marcona 1 | <LD | <LD | <LD | <LD | |
| Almendra tipo marcona 2 | <LD | <LD | <LD | <LD | |
| Almendra tipo marcona 3 | <LD | <LD | <LD | 0,19 | 0,19 |
| Almendra tipo marcona con chocolate 1 | <LD | <LD | 0,05 | 0,09 | 0,14 |
| Almendra tipo marcona con chocolate 2 | 0,04 | 0,15 | 0,06 | 0,22 | 0,47 |
| Almendra tipo california con chocolate 1 | 0,04 | 0,14 | 0,26 | 0,23 | 0,67 |
| Avellana 1 | <LD | 1,01 | 0,37 | 2,39 | 3,77 |
| Avellana 2 | <LD | 0,53 | <LD | <LD | 0,53 |
| Avellana 3 | <LD | 0,48 | <LD | <LD | 0,48 |
| Avellana con chocolate 1 | 0,04 | 0,14 | 0,04 | 0,34 | 0,56 |
| Avellana con chocolate 2 | 0,04 | 0,15 | 0,06 | 0,28 | 0,53 |
| Cacahuete tipo chino 1 | <LD | <LD | 0,19 | 0,57 | 0,76 |
| Cacahuete tipo chino 2 | <LD | <LD | <LD | 0,06 | 0,06 |
| Cacahuete tipo chino 3 | <LD | <LD | <LD | 0,06 | 0,06 |
| Cacahuete tipo chino con chocolate y azúcar 1 | <LD | 0,14 | 0,06 | 0,18 | 0,38 |
| Cacahuete tipo chino con chocolate y azúcar 2 | <LD | 0,14 | 0,05 | 0,16 | 0,35 |
| Cacahuete tipo chino con chocolate, azúcar y cereal 1 | <LD | 0,14 | 0,05 | 0,18 | 0,37 |
| Cacahuete tipo chino con chocolate, azúcar y cereal 2 | <LD | <LD | 0,06 | 0,17 | 0,23 |
| Cacahuete tipo argentino 1 | <LD | <LD | <LD | <LD | |

Tabla (19): (Continuación)

| | Concentración (µg/Kg) | | | | |
|---|-----------------------|------|------|--------|--------|
| | | | | | |
| Cacahuete tipo argentino 2 | <LD | <LD | <LD | 0,15 | 0,15 |
| Cacahuete tipo argentino 3 | <LD | <LD | 0,05 | 0,22 | 0,27 |
| Cacahuete tipo argentino con chocolate y azúcar 1 | <LD | <LD | 0,04 | 0,15 | 0,19 |
| Cacahuete tipo argentino con chocolate y azúcar 2 | <LD | <LD | 0,04 | 0,16 | 0,20 |
| Cacahuete tipo argentino con chocolate, azúcar y cereal 1 | 0,04 | 0,13 | 0,04 | 0,18 | 0,39 |
| Cacahuete tipo argentino con chocolate, azúcar y cereal 2 | 0,04 | 0,13 | 0,04 | 0,16 | 0,37 |
| Pistacho 1 | <LD | <LD | 4,12 | 389,53 | 393,67 |
| Pistacho 2 | <LD | <LD | <LD | 0,19 | 0,19 |
| Pistacho 3 | <LD | <LD | <LD | 0,16 | 0,16 |
| Pistacho con chocolate 1 | 0,04 | 0,13 | 0,04 | 0,15 | 0,36 |
| Pistacho con chocolate 2 | 0,04 | 0,13 | 0,04 | 0,1 | 0,37 |
| Maíz 1 | <LD | <LD | 0,04 | 0,19 | 0,23 |
| Maíz 2 | <LD | <LD | <LD | <LD | |
| Maíz 3 | <LD | <LD | <LD | 0,12 | 0,12 |
| Maíz con chocolate 1 | 0,04 | 0,14 | 0,04 | 0,19 | 0,41 |
| Maíz con chocolate 2 | 0,04 | 0,15 | 0,05 | 0,19 | 0,43 |

<LD: Menor al límite de detección

Si tenemos en cuenta la suma de las cuatro aflatoxinas estudiadas podemos determinar un porcentaje de positividad en las muestras de materia prima (número de muestras en las que se detecta una o varias de las aflatoxinas estudiadas con concentraciones por encima del límite de detección) de un 76,5 %.

Todas las muestras positivas de materia prima presentaban concentraciones de B₁ y B₂ por encima del límite de detección; en el caso de las avellanas, además de presentar B₁ y B₂ también presentaban valores de G₁ superiores al límite de detección de la técnica. Además en todos los casos, la concentración de B₁ fue superior a la de B₂ tal y como ha sido observado por otros autores como Georgiadou *et al.* (2012).

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras (Tabla 19), podemos decir que en general, los niveles de contaminación de las muestras analizadas fueron muy bajos, próximos a los límites de cuantificación establecidos y en todos los casos, a excepción de una muestra de pistacho materia prima, por debajo de los límites máximos establecidos en la legislación para estos contaminantes.

Además, se calcularon las concentraciones medias de aflatoxinas para cada materia prima. Para ello, en las muestras que presentaban alguna aflatoxina por debajo del límite de detección se tomó como valor numérico una concentración igual a la mitad

del límite de cuantificación (Ariño *et al.*, 2009). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla (20): Concentraciones medias de aflatoxinas por materia prima

| Muestra | G ₂ µg/Kg | G ₁ µg/Kg | B ₂ µg/Kg | B ₁ µg/Kg | (G ₂ +G ₁ +B ₂ +B ₁) µg/Kg |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
| Almendra tipo marcona | 0,027 | 0,09 | 0,025 | 0,12 | 0,26 |
| Avellana | 0,67 | 0,09 | 0,14 | 0,85 | 1,75 |
| Cacahuete tipo chino | 0,027 | 0,09 | 0,10 | 0,25 | 0,47 |
| Cacahuete tipo argentino | 0,027 | 0,09 | 0,03 | 0,15 | 0,30 |
| Pistacho* | 0,027 | 0,09 | 0,04 | 0,18 | 0,34 |
| Maíz | 0,027 | 0,09 | 0,03 | 0,13 | 0,28 |

*Medias realizadas con sólo dos valores.

Los mayores niveles de contaminación se presentaron en las muestras de avellana (1,75 µg/Kg), seguidas del cacahuete tipo chino (0,47 µg/Kg) y el pistacho (0,34 µg/Kg). Por el contrario, la almendra tipo marcona presentó las concentraciones más bajas de aflatoxinas (0,26 µg/Kg). En cualquier caso y como se ha comentado anteriormente, se trata de bajos niveles de contaminación y similares a los hallados por otros autores en el análisis de muestras de frutos secos procedentes de diferente origen (Tabla 21).

Sin embargo, fijándonos en los datos relativos al pistacho que se muestran en la tabla 21, se puede observar que hay gran variabilidad entre los datos de los diferentes autores. En nuestro caso, hay un valor muy por encima de los datos aportados, de 397,67 µg/Kg para la suma de B₁ y B₂, valor que está muy por encima del límite máximo de 15 µg/Kg establecido por la legislación para este alimento, y dos más bajos que coincidirían con los analizados por Ariño *et al.*, (2009). Finalmente para el maíz obtuvimos valores bajos, que se asemejarían con los observados en la EFSA (2007).

Tabla (21): Valores de aflatoxinas en frutos secos y maíz obtenidos por otros autores

| Autor | Alimento | Origen | Aflatoxinas |
|-------------------------------|-----------|-----------|--|
| Juan <i>et al.</i> , 2008 | Cacahuete | Marruecos | 0,30 µg/Kg de AFTs |
| Imperato <i>et al.</i> , 2011 | Pistacho | Turquía | 1,29 µg/Kg de B ₁ 0,19 µg/Kg de B ₂ |
| Luttfullah y Hussain., 2011 | Almendra | Paquistán | 2,13 µg/Kg de AFTs |
| Huang <i>et al.</i> , 2010 | Cacahuete | China | 1,0 µg/Kg de B ₁ 0,7 µg/Kg de B ₂ 0,2 µg/Kg de G ₁ 0,6 µg/Kg de G ₂ |

Tabla (21): (Continuación)

| Autor | Alimento | Origen | Aflatoxinas |
|-------------------------------|---|---------------|---|
| Ariño <i>et al.</i> , 2009 | Pistacho | Irán | 0,12 µg/Kg de B ₁ 0,06 µg/Kg de B ₂ |
| Castells <i>et al.</i> , 2008 | Maíz | Argentina | 2,6 µg/Kg de AFTs |
| Sook <i>et al.</i> , 2007 | Cacahuete Pistacho | Corea | 0,20 µg/Kg de AFTs 3,41 µg/Kg de AFTs |
| EFSA, 2007 | Pistacho Almendra Avellana Cacahuete Maíz | Unión europea | 19,3 µg/Kg de AFTs 1,72 µg/Kg de aFTs 1,6 µg/Kg de AFTs 2,57 µg/Kg de AFTs 0,29 µg/Kg de AFTs |

AFTs: Aflatoxinas totales (B₁+B₂+G₁+G₂)

Son varios los artículos que describen la existencia de altos niveles de contaminación en las muestras de pistachos. Según Cheraghali *et al.* (2007), el 7,5 % de las muestras de pistacho analizadas (10068 muestras procedentes de Irán) mostraron una contaminación por aflatoxinas superior a 15 µg/Kg. Juan *et al.*, (2008), hallaron en su estudio que el 5 % de las muestras de pistacho (de un total de 20 muestras procedente de Marruecos) que analizó superaban los límites máximos. En nuestro caso, al tratarse de una sola muestra es lógico pensar en llevar a cabo una repetición del análisis realizado para descartar posibles errores de muestreo.

Teniendo en cuenta que son muy pocas muestras y que el valor del pistacho muy contaminado no tiene que tomarse en cuenta debido a que está fuera de rango, se realizó un análisis de varianza ANOVA con el objetivo de comprobar si las diferencias encontradas entre las distintas muestras de materia prima eran significativas desde el punto de vista estadístico. El análisis realizado mostró que las diferencias encontradas entre los niveles de contaminación de las distintas materias primas no eran estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Si nos fijamos ahora en las muestras que contenían chocolate, vemos que al contrario que en las muestras de materia prima que en algunas de ellas no se detectó ningún tipo de contaminación, en el 100% de éstas se identificaron una o varias de las aflatoxinas estudiadas en concentraciones por encima del límite de detección. Además se puede observar un patrón de contaminación diferente que en las muestras de materia prima, al detectarse un mayor número de aflatoxinas en las muestras estudiadas, siendo la B₁ la aflatoxina que mayor concentración presentó en todos los casos, seguida de la G₁, a continuación la B₂ y por último la G₂.

Sin embargo, las muestras con chocolate presentan mayor incidencia de contaminación y por más tipos de aflatoxinas que las de materia prima, y esto puede ser explicado por la posible contaminación por micotoxinas en el chocolate de

cobertura. Así, Copetti *et al.* (2011) analizaron muestras de cacao en las que apareció contaminación por aflatoxinas, aunque a una concentración inferior a 0,5 µg/Kg. Es más, el chocolate, además del cacao, tiene otros componentes que le podrían aportar contaminación de aflatoxinas (la lecitina de soja o girasol, el almidón de maíz, la vainilla, etc). De la misma manera, hay muestras que tienen añadido cereal en su composición y también puede aportar contaminación al producto total.

Además, en esta contaminación de las muestras con chocolate, también puede influir la forma de adición del mismo. Mientras que la materia prima está formada por unidades de frutos secos y la presencia de aflatoxinas es bastante heterogénea, en las muestras con chocolate, el recubrimiento se realiza en forma líquida y por lo tanto puede tener la contaminación por aflatoxinas repartida homogéneamente por todo el volumen.

La concentración media de cada aflatoxina en el total de las muestras con cobertura de chocolate, se calculó igualmente considerando un valor igual a la mitad del límite de cuantificación para las muestras con aflatoxinas en concentraciones que estaban por debajo del límite de detección (Ariño *et al.*, 2009). Así obtuvimos unos valores de 0,036 µg/Kg para G₂, 0,12 µg/Kg para G₁, 0,05 µg/Kg para B₂ y 0,18 µg/Kg para B₁. Además, se pudo observar que mientras para G₂ las concentraciones son siempre de 0,04 µg/Kg, para G₁ varían entre 0,13 y 0,15 µg/Kg y para B₂ están entre 0,04 y 0,06, en el caso de los valores de las concentraciones de B₁ éstos mostraban mayor variabilidad con concentraciones que oscilaban entre 0,09 y 0,34 µg/Kg. Se realizó un análisis de varianza ANOVA entre las diferentes materias primas con cobertura de chocolate y se determinó que no había diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$).

En cualquier caso y al igual que en las muestras de materia prima, las tasas de contaminación de estas muestras eran muy bajas e inferiores a los límites máximos establecidos en la legislación para estos productos.

Finalmente, otro análisis de varianza ANOVA comparando todas las muestras de materia prima (con excepción del pistacho fuera de rango) con todas las muestras de chocolate reveló que tampoco había diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas.

6-Conclusiones

- 1.-La metodología analítica optimizada y validada en este estudio garantiza la extracción de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ de forma selectiva de muestras de frutos secos y cereales con una disolución de metanol al 70% y cloruro sódico, la adecuada separación del analito del resto de sustancias interferentes que puedan aparecer durante el proceso mediante el uso de columnas de inmunoafinidad y la resolución óptima y detección sensible y selectiva de las diferentes aflatoxinas mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) con detector de fluorescencia.
- 2.- Esta metodología analítica ha demostrado capacidad para proporcionar resultados satisfactorios en el análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales, cumpliendo los criterios de especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión establecidos a nivel internacional.
- 3.-El perfil de contaminación de las muestras de materia prima refleja la presencia mayoritaria de las aflatoxinas B₁ y B₂, salvo en el caso de la avellana en la que se detectaron también concentraciones de aflatoxina G₁. El perfil de contaminación de las muestras con chocolate, sigue un patrón diferente, al estar la mayor parte de ellas contaminadas con las cuatro aflatoxinas.
- 4.- Las tasas de contaminación de aflatoxinas en las muestras con chocolate fueron superiores a las halladas en las muestras de materia prima, lo que añadido a la diferencia en el perfil de contaminación, hace pensar en un aporte adicional de micotoxinas por el chocolate añadido, aunque en ningún caso estas diferencias fueron estadísticamente significativas.
- 5.-Las tasas de contaminación de aflatoxinas en muestras de frutos secos y cereal, son bajas, del mismo orden que las detectadas actualmente en otros países y se encuentran por debajo de los límites máximos establecidos por la legislación para estos alimentos, salvo el caso de una muestra de pistacho con concentraciones de estos compuestos muy por encima de estos límites (393,6 ng/g para la suma de las cuatro aflatoxinas).

7-Bibliografía

- Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A., Al-Jedah, J. (2000) Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*, 11, 157-160.
- Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A., Al-Kildi, A. M., Al-Jedah, J. (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, 15, 543–548.
- Ariño, A., Herrera, M., Estopañan, G., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Juan, T., Herrera, A. (2009). Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. *Food Control*, 20, 811–814.
- Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Samperi, R., Lagàn, A. (2008). Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179, 182-189.
- Blesa, J., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Marín, R., Mañes, J. (2003). Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1011, 49–54.
- Castells, M., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2008) Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 81–87.
- Chan, D., MacDonald, S. J., Boughtflower, V., Brereton, P. (2004). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1059, 13–16.
- Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E., Zamanian, F. (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 812–816.
- Codex committee on food additives and contaminants (2006). Proposed draft Appendix to the Code of practice for the prevention and reduction of Aflatoxin Contamination in Tree Nuts.
- Copetti, M. V., Lamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H., Taniwaki, M. H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 141–144.

- Costa, A., Zorzete, P., Reis, T., Assunção, E., Vergueiro, S., Correa, B. (2012). Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control*. (En prensa).
- Decisión de la Comisión Europea del 12 de agosto del 2002 (2002/657/CE), por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y a la interpretación de resultados. DOUE L: 221 (8-36).
- Directiva 2003/100/CE de la Comisión de 31 de octubre de 2003 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del parlamento europeo y del consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal.
- European Food Safety Authority (EFSA), (2009). Scientific opinion “Effects on public health of an increase of the levels for aflatoxin total from 4 µg/kg to 10 µg/kg for tree nuts other than almonds, hazelnuts and pistachios”. *The EFSA Journal*, 1168, 1-11.
- European Food Safety Authority (EFSA), (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible Increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 446, 1-127.
- Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montalbano, B. G., Cotty, P. J. (2007) Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 153–159.
- Esson, G., Ayodele, M., Akoa, A., Foko, J., Filtenborg, O., Olembo, S. (2009). Aflatoxin-producing *Aspergillus* spp. and aflatoxin levels in stored cassava chips as affected by processing practices. *Food Control*, 20, 648–654.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2003). Manual sobre el sistema de aplicación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos en la prevención y el control de las micotoxinas. *Estudio FAO de Alimentación y Nutrición*, 73.
- Fu, Z., Huang, X., Min, S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography A*, 1209, 271–274.
- Georgiadou, M., Dimou, A., Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, 26, 580-586.
- Han, Z., Zheng, Y., Luan, L., Cai, Z., Ren, Y., Wu, Y. (2010). An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in traditional Chinese medicines. *Analytica Chimica Acta*, 664, 165-171.

- Huang, B., Han, Z., Cai, Z., Wu, Y., Ren, Y., (2010). Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 662, 62-68.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 82, 169-300.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100F, 225-248.
- Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. *Food Chemistry*, 132, 35–42.
- Imperato, R., Campone, L., Piccinelli, A.L., Veneziano, A., Rast, L. (2011). Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. *Food Control*, 22, 1905-1910.
- Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J. C., Idrissi, L., Mañes, J. (2008). Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Sale´ area, Morocco. *Food Control*, 19, 849–853.
- Lutfullah, G., Hussain, A. (2011). Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*, 22, 426-429.
- Norma UNE-EN 14123:2008 para la “Determinación de aflatoxina B₁ y de la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en avellanas, cacahuetes, pistachos, higos y pimentón molido. Método por cromatografía líquida de alta resolución con transformación química postcolumna y purificación en columna de inmovilización”.
- Norma UNE-EN ISO 16050 para la “Determinación de aflatoxina B₁, y contenido total de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución”.
- Nováková, L., Matysová L., Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68, 908–918.
- Otta, K. H., Papp, E., Bagócsi, B. (2000). Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 882, 11–16.

- Real Decreto 475/1988 del 13 de mayo de 1988 por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 and M2 en alimentos para consumo humano.
- Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los, métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. DOUE L 70: 12-34.
- Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 de la Comisión de 19 de Diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DOUE L 364: 5-24.
- Reglamento (EU) 165/2010 de la Comisión de 26 de febrero de 2010 por el que se modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) nº 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. (2012). Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, 48, 76–90.
- Rubert, J., Sebastià, N., Soriano, J. M., Soler, C., Mañes, J. (2011). One-year monitoring of aflatoxins and ochratoxin A in tiger-nuts and their beverages. *Food Chemistry*, 127, 822–826.
- Russell, R., Paterson, M., Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International*, 43, 1902–1914.
- Set, E., Erkmen, O. (2010). The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2532–2537.
- Shakir, W., Saad, B., Yan, C. B., Hashim, N. H., Ali, A., Salleh, M. I., Salleh, B. (2010). Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food Chemistry*, 118, 882–886.
- Sook, H., Kim, H. J., Ok, H. E., Hwang, J. B., Chung, D. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102, 385–391.
- Soriano del Castillo, J. M., Moltó J.C., Mañés J. (2007). Micotoxinas en alimentos. España. Díez de Santos. Madrid.
- Waters Corporation. “Rapid analysis of aflatoxins without derivatization using ultra performance liquid chromatography and fluorescence detection”.

