



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Evaluación de la incidencia de micotoxinas en muestras de
maíz y trigo mediante cromatografía líquida de alta
resolución

Autor

Cristina Yebra Cañardo

Directores

Marta Herrera Sánchez

Susana Lorán Ayala

Facultad de Veterinaria

2015

Agradecimientos:

En primer lugar, quiero dar las gracias, de corazón, a mis tutoras, la Dr. Marta Herrera Sánchez y la Dr. Susana Lorán Ayala. Gracias por vuestra gran paciencia y vuestra máxima dedicación. Sin vosotras esto habría sido imposible.

Gracias a todos los miembros del departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos por hacer aún más agradable el día a día. En especial a mis compañeras, Isabel Giménez, Noemí Bervis y Victoria Lamenca, por prestarme su ayuda incondicional.

Gracias a mis padres, Santiago y Yolanda, y a mi hermano Iván, por apoyarme siempre en todo lo que me he propuesto y por estar ahí cuando lo he necesitado.

Gracias a ti, Jose, por ser quien me ha sufrido más de cerca durante todo este año y por conseguir sacarme una sonrisa en los peores momentos.

Índice general:

<u>Resumen</u>	1
Abstract	2
1. <u>Introducción</u>	3
2. <u>Objetivos</u>	5
3. <u>Revisión bibliográfica</u>	6
3.1. <u>Mohos productores de aflatoxinas y deoxinivalenol: factores que influyen en su desarrollo y en la producción de toxinas</u>	6
3.2. <u>Micotoxinas. Aflatoxinas y deoxinivalenol</u>	9
3.3. <u>Efectos toxicológicos de las aflatoxinas y el deoxinivalenol</u>	11
3.4. <u>Incidencia de micotoxinas en cereales: Maíz y trigo</u>	13
3.5. <u>Legislación</u>	15
3.6. <u>Métodos de análisis de aflatoxinas y deoxinivalenol</u>	17
3.6.1. Muestreo	18
3.6.2. Técnicas de extracción y purificación	19
3.6.3. Técnicas de determinación y confirmación	21
3.6.3.1. <i>Técnicas de cribado o screening</i>	21
3.6.3.2. <i>Técnicas instrumentales</i>	21
3.6.3.3. <i>Técnicas de confirmación</i>	22
4. <u>Material y métodos</u>	23
4.1. <u>Material, equipos y reactivos</u>	23
4.1.1. Material	23
4.1.2. Equipos	23
4.1.3. Reactivos	24
4.1.3.1. <i>Preparación y mantenimiento de patrones de calibración</i>	25
4.1.4. Precauciones y normas de trabajo	26
4.2. <u>Recepción y acondicionamiento de las muestras de maíz y trigo para el análisis de micotoxinas</u>	27
4.3. <u>Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en cereales</u>	28
4.3.1. Determinación de aflatoxinas en maíz	28
4.3.2. Determinación de deoxinivalenol en trigo	29
4.4. <u>Control de calidad de los resultados analíticos</u>	31
5. <u>Resultados y discusión</u>	30

6. <u>Conclusiones</u>	43
7. <u>Bibliografía</u>	44

Índice de figuras:

Figura 1. Cabezas conidiales del género <i>Aspergillus</i> : a) uniseriada; b) biseriada	6
Figura 2. Conidios típicos del género <i>Fusarium</i> : macroconidios.....	7
Figura 3. Síntoma característico de espigas de trigo afectadas por Fusariosis	7
Figura 4. Figuras de algunas aflatoxinas.....	10
Figura 5. Estructura del DON.....	10
Figura 6. Incidencia de deoxinivalenol en cereales en Europa entre los años 2001 y 2009.....	14
Figura 7. Columna de inmunoafinidad con la micotoxina unida a los anticuerpos inmovilizados en el gel.....	20
Figura 8. Proceso de purificación con columnas de inmunoafinidad	20
Figura 9. Método de análisis de aflatoxinas en maíz mediante extracción y purificación con columnas de inmunoafinidad AFLAtest® WB SR	29
Figura 10. Método de análisis de deoxinivalenol en trigo mediante extracción y purificación con columnas de inmunoafinidad DONtest™ WB	30
Figura 11. Cromatograma de un patrón mix de aflatoxinas de 2,5 ng/mL para G ₁ y B ₁ , y de 0,75 ng/mL para G ₂ y B ₂	32
Figura 12. Cromatograma de una muestra de maíz almacenado contaminada con 0,58 µg/Kg de aflatoxina B ₂ y 7,76 µg/Kg de aflatoxina B ₁	32
Figura 13. Cromatograma de un patrón de deoxinivalenol de 2 µg/mL.....	33
Figura 14. Cromatograma de una muestra de trigo blando contaminada con 2020 µg/Kg de deoxinivalenol.....	33
Figura 15. Cromatograma de una muestra de maíz no contaminada.....	33
Figura 16. Recta de calibrado para G ₂ (0,15 ng/mL – 1,5 ng/mL)	34
Figura 17. Recta de calibrado para G ₁ (0,5 ng/mL – 5 ng/mL)	34
Figura 18. Recta de calibrado para B ₂ (0,15 ng/mL – 1,5 ng/mL)	34
Figura 19. Recta de calibrado para B ₁ (0,5 ng/mL – 5 ng/mL)	34
Figura 20. Recta de calibrado para DON (0,1 µg/mL – 5 µg/mL)	35
Figura 21. Positividad (%) de la contaminación por aflatoxinas totales en muestras de maíz.....	37
Figura 22. Tasas de contaminación de DON en trigo por encima del límite de cuantificación de la técnica	40

Índice de tablas:

Tabla 1. Contenidos máximos de aflatoxinas en productos alimenticios. Reglamento (CE) nº 1881/2006	16
Tabla 2. Contenidos máximos de deoxinivalenol en productos alimenticios. Reglamento (CE) nº 1881/2006.....	16
Tabla 3. Métodos de análisis de aflatoxinas en maíz	18
Tabla 4. Métodos de análisis de deoxinivalenol en trigo	18
Tabla 5. Número y tipo de muestras analizadas de maíz y trigo	27
Tabla 6. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) para aflatoxinas y deoxinivalenol de las metodologías de análisis utilizadas	35
Tabla 7. Análisis descriptivo de los datos obtenidos de las muestras positivas de maíz	36
Tabla 8. Análisis descriptivo de los datos obtenidos de las muestras positivas de trigo.	39

Resumen

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por mohos filamentosos. Estos mohos 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. La mayoría de las micotoxinas de importancia agrícola son producidas principalmente por cuatro géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*.

Su presencia en los piensos y alimentos en cantidades superiores a las permitidas, supone un riesgo para la salud humana y animal, ya que las micotoxinas han demostrado tener efectos tóxicos tanto de tipo agudo como crónico, siendo estos últimos los más preocupantes, ya que incluyen, entre otros, efectos teratogénicos, carcinogénicos o mutagénicos.

El objetivo general de este estudio es llevar a cabo una evaluación de la incidencia de las micotoxinas, aflatoxinas y deoxinivalenol, en distintas muestras de maíz (49 muestras) y trigo (98 muestras) respectivamente, aportadas por cooperativas pertenecientes a las Comunidades Autónomas de Aragón y de Navarra.

Para llevarlo a cabo se utilizó una metodología basada en una extracción mediante disolventes orgánicos, seguida de purificación en columnas de inmunoafinidad (IAC) y posterior determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia y derivatización fotoquímica en el caso de las aflatoxinas, y con un detector de diodos en el caso del deoxinivalenol.

De todas las muestras analizadas, sólo una muestra de maíz y tres muestras de trigo presentaron niveles de contaminación superiores a los límites máximos establecidos por la legislación para alimentación humana, aunque no los límites establecidos para la alimentación animal. El resto de muestras analizadas presentaron unos valores de contaminación muy bajos, en su mayoría inferiores al límite de detección de la técnica.

Abstract:

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous moulds. These moulds can grow on a wide range of agricultural products in field, but also during the post-harvest and storage, can be thus find mycotoxins in certain categories of food and feed. The most important mycotoxins are mainly produced by four types of fungi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria*.

Mycotoxin occurrence in food and feed above maximum contents involves a risk to human and animal health, since mycotoxins have been shown to have both acute and chronic toxic effects, being the chronic one the most concerning problem related to teratogenic, carcinogenic or mutagenic effects.

The main objective of this study is to evaluate the incidence of aflatoxins and deoxynivalenol in different samples of maize (49 samples) and wheat (98 samples), supplied by cooperatives belonging to the communities of Aragon and Navarra.

Carrying out this study, it was necessary to use a methodology based on an extraction by organic solvents, immunoaffinity columns (IAC) purification and chromatographic determination by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector and photochemical derivatization in case of aflatoxins, and Diode Array Detector (DAD) for deoxynivalenol.

Only one sample and three wheat samples showed higher concentrations than the maximum limits established by legislation for human consumption. However, these limits are lower for the limits settled for animal consumption. The rest of analyzed samples had values of very low contamination. Most of them, lower than the limits of detection.

1. Introducción

Las **micotoxinas** son metabolitos secundarios tóxicos producidos por mohos filamentosos que pertenecen fundamentalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos pueden estar presentes de forma natural en los productos agrícolas en el campo, pero también durante la post-cosecha y el almacenamiento de materias primas como los cereales y frutos secos (CAST, 2003).

Estos compuestos, son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas que conllevan sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. Se estima, que entre el 10 y el 30% de los granos cosechados se pierden debido a la presencia de infecciones fúngicas, y que aproximadamente un 25% de los cultivos de cereales del mundo están contaminados por algún tipo de micotoxinas (FAO, 2003).

Hasta el momento se han identificado más de 300 tipos de micotoxinas, sin embargo sólo una treintena preocupan por su incidencia y toxicidad, entre las que se encuentran las aflatoxinas y el deoxinivalenol.

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus* en unas determinadas condiciones de temperatura y humedad. Durante muchos años, las aflatoxinas no fueron consideradas un problema en la producción agrícola europea. Sin embargo, esta situación está cambiando pues poco a poco la contaminación por aflatoxinas de los cultivos, en particular del maíz, se está propagando en todo el sudeste de Europa. Así, en el año 2013, saltaron las alarmas en Andalucía cuando se detectaron dos millones de litros de leche contaminados por estas micotoxinas. La contaminación procedía de una partida de cereales contaminada con mohos productores del género *Aspergillus* y que había sido utilizada para alimentar al ganado. Esta proliferación de mohos pudo ser debida a las condiciones climáticas que habían acontecido en los últimos meses en la zona, con abundantes lluvias acompañadas de altas temperaturas, además de un almacenamiento del grano en unas condiciones de elevada humedad.

Por otro lado, también hay que destacar la importancia del deoxinivalenol, una micotoxina producida por hongos de *Fusarium*, frecuentemente detectados en la zona del Valle del Ebro, debido a sus condiciones ambientales. Estas condiciones varían

desde bajas temperaturas acompañadas con una alta humedad hasta el punto extremo, favoreciendo la proliferación de estos mohos ya en el cultivo.

Hacer frente a estas y otras micotoxinas, es un reto continuo para el que se necesitan los mejores conocimientos, la tecnología y el personal formado en el campo de la seguridad alimentaria. Por todo ello, en este trabajo se plantea como objetivo llevar a cabo una evaluación de la incidencia de aflatoxinas y deoxinivalenol en muestras de maíz y trigo, respectivamente, procedentes del Valle del Ebro.

2. Objetivos

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Investigar las tasas de contaminación de aflatoxinas en muestras de maíz, basado en la purificación por columna de inmunoafinidad y determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*) acoplada a un detector de fluorescencia (FLD, *fluorescence detector*) con derivatización fotoquímica (PHRED, *photochemical reactor for enhanced detection*).
- Investigar las tasas de contaminación de deoxinivalenol en muestras de trigo, basado en la purificación por columna de inmunoafinidad y determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de diodos (DAD, *diode array detector*).
- Evaluar el grado de contaminación determinado mediante la comparación con otros estudios realizados a nivel internacional y con los límites de seguridad establecidos para los alimentos en la Unión Europea.

3. Revisión bibliográfica

3.1. Mohos productores de aflatoxinas y deoxinivalenol: factores que influyen en su desarrollo y en la producción de toxinas

Las **aflatoxinas** están producidas fundamentalmente por tres especies del género *Aspergillus* que se incluyen en la sección Flavi: *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus*. Las colonias de estas especies son de color verde amarillento a verde oliváceo y la mayoría de los aislamientos presentan cabezas conidiales uniseriadas (Figura 1a) y biseriadas (Figura 1b) (Soriano, 2007).

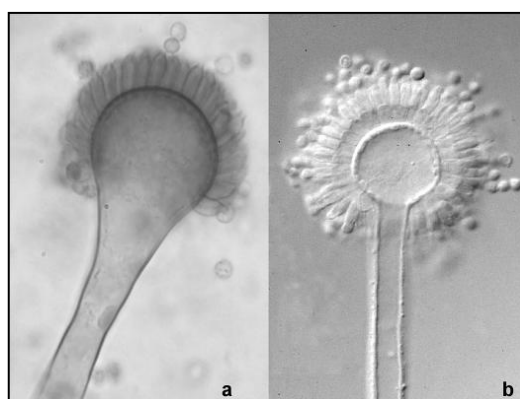


Figura 1. Cabezas conidiales del género *Aspergillus*: a) uniseriada; b) biseriada (Soriano, 2007).

Las aflatoxinas son producidas pre y post-cosecha en determinadas condiciones de temperatura, actividad de agua y disponibilidad de nutrientes, y se pueden encontrar en diversos productos agrícolas de las regiones tropicales y subtropicales, donde habitualmente se dan estas condiciones ambientales (Sweeney y Dobson, 1998).

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* crecen desde 10 a 43°C y a una temperatura óptima de 32 a 33°C. Sin embargo la temperatura óptima para la producción de toxinas se da entre 20 y 30°C (Jiménez *et al.*, 1996; Soriano, 2007). Necesitan una humedad relativa entre un 88 y un 95% para su crecimiento, así como una actividad del agua alta (> 0,83) (Sanchis *et al.*, 2004). Estos hongos, infectan los cultivos y producen aflatoxinas en diferentes productos vegetales antes de su recolección, pero incrementan esa producción cuando el producto ya se ha recolectado y las condiciones de almacenaje permiten o estimulan su crecimiento (Soriano, 2007).

El **deoxinivalenol** se produce fundamentalmente por *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*. La principal característica del género *Fusarium* es la presencia de conidios hialinos, curvados, fusiformes y septados denominados macroconidios (Figura 2) (Soriano, 2007).

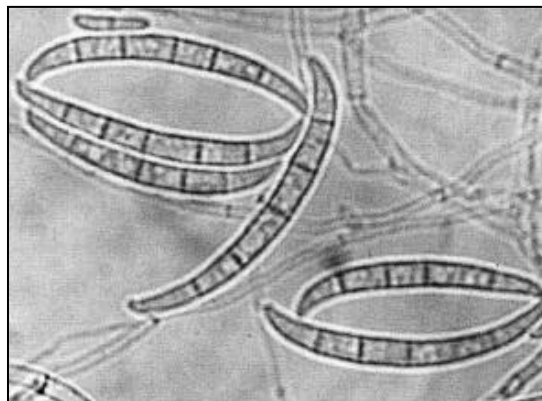


Figura 2. Conidios típicos del género *Fusarium*: macroconidios (Soriano, 2007).

El deoxinivalenol se produce fundamentalmente antes de la cosecha, cuando los cultivos son invadidos por ciertas especies de *Fusarium*, patógenas para las plantas y causan la enfermedad denominada “tizón de la espiga” o “fusariosis de la espiga del trigo” (FHB, *Fusarium Head Blight*) (Figura 3). Existe una relación directa entre la incidencia de la fusariosis de la espiga de trigo con la contaminación por deoxinivalenol. La presencia de esta enfermedad está relacionada con el incremento de la humedad durante el periodo de floración y con la duración del periodo de lluvias (OMS, 2001). En consecuencia, el deoxinivalenol se considera una típica “micotoxina de campo”, formándose principalmente en el cultivo de cereales (principalmente, trigo y maíz), aunque, también puede formarse durante la recolección, transporte, almacenamiento y secado por inadecuadas prácticas de higiene y manipulación de los cereales (ELIKA, 2013).



Figura 3. Síntoma característico de espigas de trigo afectadas por Fusariosis.

Se considera que *Fusarium* es el género productor de toxinas de mayor prevalencia en las regiones templadas del hemisferio norte y se encuentra habitualmente en cereales cultivados en regiones templadas de América, Europa y Asia (Soriano, 2004).

En general, el crecimiento óptimo de las especies del género *Fusarium* se produce a 20-25°C y la producción de las toxinas entre 15 y 25°C (Boeira *et al.*, 2002). Además, está demostrado que las grandes variaciones de temperatura entre el día y la noche favorecen la síntesis de micotoxinas (Soriano, 2007). Las condiciones de crecimiento óptimas, varían además según la especie de que se trate. Así, la especie *Fusarium graminearum* presenta una temperatura óptima de crecimiento de 25°C y una actividad agua de 0,99 (OMS, 2001), que coincide con el óptimo para la producción de sus toxinas (Ramírez *et al.*, 2006). Por otro lado, *Fusarium colmorum* crece a una temperatura óptima de 21°C y a 0,98 de actividad de agua (OMS, 2001). Aunque puede comportarse como psicrotrofo y crecer a 5°C (Pettitt *et al.*, 1996).

En general, el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas por parte de mohos micotoxigénicos depende de la interacción de varios factores como los biológicos, los medioambientales y los relacionados con las prácticas agrícolas llevadas a cabo durante el cultivo, cosecha, almacenamiento y procesado de los cereales.

Uno de los factores más influyentes en el crecimiento de los mohos y la producción de micotoxinas, son las **condiciones climáticas**. Hay que tener en cuenta que los mohos están adaptados a desarrollarse en un amplio intervalo de temperaturas, de tal modo que, la temperatura óptima de crecimiento de los mohos no necesariamente coincide con la temperatura óptima para la síntesis de micotoxinas (Boeria *et al.*, 2002). En cualquier caso, los climas cálidos con mucha humedad ambiental, así como las precipitaciones abundantes antes de la cosecha y durante la floración, favorecen la proliferación de los mohos y posterior biosíntesis de toxinas fúngicas. Por otro lado, el cambio climático está suponiendo un cambio en los patrones de distribución de las micotoxinas.

Por otro lado, la presencia de **insectos** puede provocar el deterioro de los granos de cereal antes, durante y después de la cosecha. De este modo, los daños mecánicos que producen, alteran la integridad de la cubierta del grano, favoreciendo así la penetración e invasión de mohos micotoxigénicos (Avantaggiato *et al.*, 2003; Aldred *et al.*, 2004).

Asimismo, teniendo en cuenta la gran capacidad para proliferar de los mohos, las **buenas prácticas de cultivo y cosecha** son imprescindibles para controlar, minimizar y eliminar la presencia de micotoxinas en los granos de cereal (Codex Alimentarius, 2006).

Una buena práctica agrícola es que la cosecha se debe realizar tan pronto como se haya completado el ciclo de crecimiento del grano. Esta práctica reduce la contaminación en campo antes de la cosecha, y consecuentemente, la contaminación del producto procesado. Se ha comprobado que los granos abandonados en el campo durante largos periodos de tiempo presentan niveles más altos de contaminación (Zain, 2011).

También el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, *Joint FAO/WHO expert committee on food additives*) recomienda que los productos agrícolas se sequen rápidamente tras su cosecha con el fin de evitar el crecimiento de mohos, de tal forma que se consiga rápidamente una humedad del 10-14% (JECFA, 2001).

En el caso de almacenamiento de cereales, éstos deben voltearse para favorecer el oreo y prevenir el desarrollo de mohos. También es importante que el tiempo que transcurra entre la cosecha y el secado sea el menor posible.

Finalmente, es importante señalar que el conocimiento de los factores ambientales que influyen en el crecimiento fúngico, junto con unas buenas prácticas agrícolas han resultado ser determinantes para predecir y controlar la presencia de micotoxinas en la cadena alimentaria.

3.2. Micotoxinas. Aflatoxinas y deoxinivalenol

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son las micotoxinas de mayor importancia en los alimentos y piensos, que se producen principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus* (Sweeney y Dobson, 1998; Njapau *et al.*, 2006) Químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona, comunes a todas ellas (Figura 4). Todas ellas son también fluorescentes, habiéndose aprovechado esta propiedad como base para su detección en los procedimientos analíticos. Sus pesos

moleculares oscilan entre 312 y 350 g/mol, y la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol (Soriano, 2007).

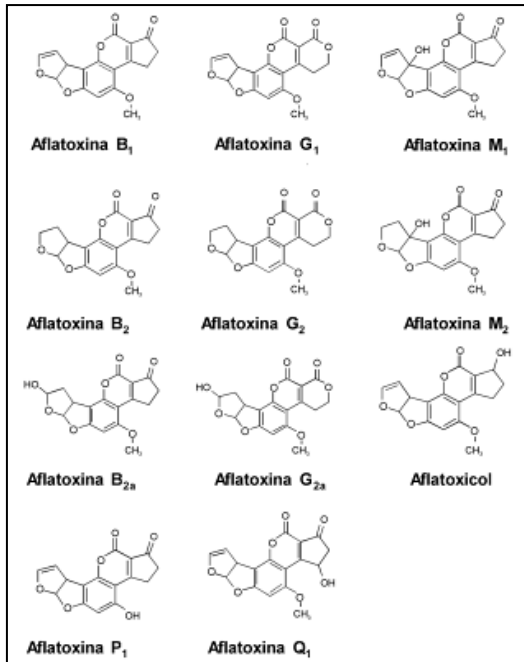


Figura 4. Figuras de algunas aflatoxinas (Soriano, 2007).

Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales sólo seis tienen importancia como contaminantes de los alimentos: las aflatoxinas del grupo B (B₁ y B₂), G (G₁ y G₂) y M (M₁ y M₂). La nomenclatura B y G se deriva de los colores fluorescentes azules (*Blue*) y verdes (*Green*) producidos bajo la luz UV (*ultraviolet*) (Sweeney y Dobson, 1998).

Es importante señalar, que las aflatoxinas M₁ y M₂ son metabolitos oxidativos de las aflatoxinas B₁ y B₂, respectivamente, producidos por los animales tras la ingestión de estas aflatoxinas y que pueden encontrarse en la leche materna y en sus derivados lácteos (Peraica *et al.*, 1999; IARC, 2002).

Deoxinivalenol

El deoxinivalenol, también conocido como DON o vomitoxina, es uno de los 150 compuestos conocidos como tricotecenos de tipo B. Se produce casi siempre antes de la cosecha, cuando los cultivos son invadidos por ciertas especies de *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* y *F. culmorum* (Soriano, 2007).

Su importancia, debido a su notable presencia en distintos alimentos, ha ido creciendo en los últimos años, hasta convertirse en una micotoxina de alta prioridad para las autoridades regulatorias.

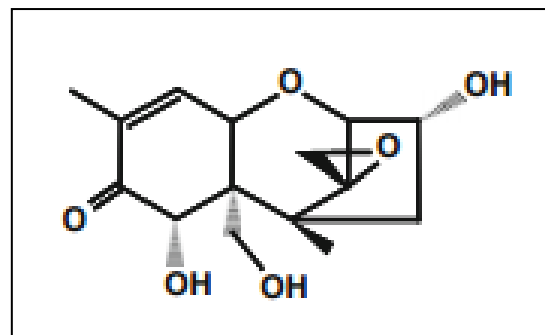


Figura 5. Estructura del DON (Gherbawy, 2010).

El deoxinivalenol (Figura 5) tiene un peso molecular de 296,3 g/mol y es relativamente soluble en agua y altamente soluble en solventes polares acuosos como el metanol, acetonitrilo y acetato de etilo (Krska *et al.*, 2007). Asimismo, es altamente estable en estos solventes orgánicos, en particular en acetonitrilo, que es el solvente más utilizado para su almacenamiento durante largos periodos de tiempo (Widestrand y Pettersson, 2001). El espectro UV no es muy característico al ser un compuesto no fluorescente, aunque la molécula posee una absorción a una longitud de onda de 220 nm (Krska *et al.*, 2007).

3.3. Efectos toxicológicos de las aflatoxinas y el deoxinivalenol

La ingestión de micotoxinas por el hombre y animales provoca una respuesta tóxica, denominada micotoxicosis (Sweeney y Dobson, 1998).

La incidencia de micotoxicosis agudas en Europa es baja, siendo un problema principalmente de salud animal, ya que con frecuencia los alimentos deteriorados por hongos se desechan o se destinan a consumo animal. En ellos la toxicidad de tipo agudo da lugar a sintomatologías muy inespecíficas y esporádicas como falta de apetito, depresión o diarreas, que en ocasiones es difícil de identificar como micotoxicosis. Para el hombre tiene mayor importancia la toxicidad crónica, asociada al consumo de pequeñas concentraciones de micotoxinas durante periodos prolongados (Soriano, 2007).

Los efectos tóxicos causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas (Martínez-Larrañaga y Anadón, 2006). Por ejemplo, **las aflatoxinas** son compuestos con efectos inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos, siendo el principal órgano diana de los efectos tóxicos y carcinogénicos el hígado. Hay que destacar la exposición de la población infantil, pues su desarrollo y crecimiento son críticos a esas edades y corren mayor riesgo de sufrir efectos negativos (Peraica *et al.*, 1999).

En relación a su potencial carcinogénico cabe destacar que, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC; *International Agency for Research on Cancer*) ha clasificado a las aflatoxinas dentro de la categoría de sustancias del tipo 1 en base a la existencia de suficientes evidencias acerca de su carácter

carcinogénico para el hombre, tanto aisladamente como en mezclas con otras aflatoxinas (IARC, 1993 y 2012).

Hasta la fecha, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Unión Europea no han fijado un límite de seguridad (IDT) en base al nivel de efecto adverso no observable (NOAEL). En este caso, la EFSA (*European Food Safety Authority*) ha evaluado la exposición a estos contaminantes, mediante un indicador llamado “Margen de exposición” (MOE) y que se obtiene de dividir la “Dosis Benchmark más baja” (BMDL) entre la ingesta estimada (IDE) de aflatoxinas, para comparar la dosis con la que se observa una incidencia baja pero definitiva de cáncer (EFSA, 2005 y 2007).

Es importante resaltar, que del conjunto de aflatoxinas, destaca por su toxicidad, la aflatoxina B₁, para la que de forma específica, el Comité Científico de la Alimentación Humana de la Unión Europea ha señalado que es un agente cancerígeno genotóxico que contribuye al riesgo de padecer cáncer hepático, incluso a dosis sumamente bajas (SCF, 1996).

Por todo ello, ya en 1998 la Unión europea estableció límites máximos de aflatoxinas en algunos productos como los frutos secos, las frutas desecadas, los aceites vegetales crudos o los cereales como el maíz, basándose en el principio ALARA (*As Low As Reasonably Possible*: tan bajo como sea razonablemente posible) (EFSA, 2007).

El **deoxinivalenol** está considerado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como no clasificable como carcinógeno para humanos (Grupo 3), basándose en que no hay evidencia experimental ni epidemiológica sobre sus efectos mutagénicos y/o carcinogénicos en el hombre y en animales de experimentación (IARC, 1993).

En animales domésticos la exposición a DON provoca pérdida de apetito, rechazo de alimentos, vómitos y una disminución de la ganancia de peso (Pestka, 2010). Con respecto a la toxicidad del DON en humanos, los efectos adversos incluyen: náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, mareos y fiebre. Estos síntomas pueden desarrollarse en los 30 minutos posteriores a la exposición aguda a altas dosis y son difíciles de distinguir de otras patologías intestinales (Sudakin, 2003).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Unión Europea en su reunión n° 74, publicó una nueva evaluación de riesgo de DON, estableciendo una ingesta diaria tolerable máxima provisional (IDTMP) de 1 µg/kg de peso corporal (pc) considerando un NOAEL de 100 µg/kg de peso corporal por día y un factor de seguridad de 100. Como conclusión, se consideró que este nivel de toxina no produciría efectos adversos sobre el sistema inmune, crecimiento o reproducción (JECFA, 2011).

3.4. Incidencia de micotoxinas en cereales: Maíz y trigo

Las **aflatoxinas** se han detectado como contaminantes naturales en un gran número de productos agrícolas, habiéndose confirmado su presencia en prácticamente todas las zonas del mundo y, en mayor o menor grado, en casi todos los alimentos de primera necesidad (Soriano, 2007).

Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación fúngica por *Aspergillus* y la consiguiente producción de aflatoxinas incluyen típicamente al maíz, las semillas de algodón y los frutos secos (IARC, 2002). La presencia de AFB₁ en productos de origen animal tales como los huevos, carne, sangre, vísceras, etc., puede darse como consecuencia de la ingestión de piensos contaminados por parte de los animales productores, aunque la tasa de transferencia desde el pienso hasta los productos comestibles de origen animal suele ser muy baja y, por tanto, su control no suele considerarse prioritario desde el punto de vista de la salud pública. Mención aparte merece la leche y los productos lácteos en donde, aunque también se ha detectado la presencia de AFB₁, la atención sanitaria debe fijarse más bien en la presencia de la AFM₁, metabolito oxidativo de la primera. (Soriano, 2007).

La contaminación de los piensos y alimentos con aflatoxinas, tiene una mayor incidencia en los trópicos que en zonas templadas del mundo. Sin embargo, debido al movimiento de los productos agrícolas alrededor del mundo, ninguna región está libre de aflatoxinas (IARC, 2002). También se ha encontrado presencia de aflatoxinas en productos vegetales, como hortalizas de hoja verde (Hariprasad *et al.*, 2013) y café (García-Moraleja *et al.*, 2015).

Del mismo modo, el **deoxinivalenol** presenta una distribución mundial. *Fusarium graminearum* se aísla a partir de forrajes de gramíneas, suelos y semillas de cereales (cebada y maíz) y *F. culmorum* es más frecuente en zonas templadas y se aísla a partir de suelos y cereales (Soriano, 2007). El DON es uno de los contaminantes más comunes en el trigo y en el maíz (Lattanzio *et al.*, 2009).

En el año 2010, la JECFA examinó los datos presentados por varios países y los datos de la bibliografía científica publicados entre los años 2001-2009, y constató la presencia frecuente de DON en Europa en cereales tal y como se representa en la Figura 6.

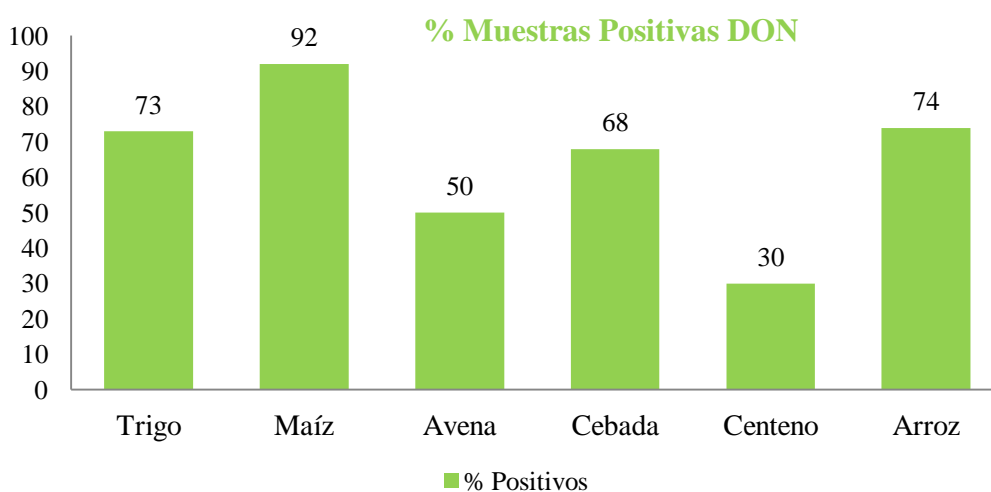


Figura 6. Incidencia de deoxinivalenol en cereales en Europa entre los años 2001 y 2009 (JECFA, 2010).

Según este estudio, el maíz, el trigo y el arroz son los cereales más susceptibles de estar contaminados con deoxinivalenol en la Unión Europea. Más concretamente, en un trabajo en el que se analizó la presencia de DON en 175 muestras de cereales (cereales para desayuno, aperitivos de maíz al horno y fritos) consumidos por la población española, se detectó la presencia de DON en un 26,8% de las muestras. La tasa de contaminación más alta fue de 131,7 µg/Kg en unos aperitivos de maíz horneados (Castillo *et al.*, 2008). En otro estudio realizado en España, se analizaron 25 muestras de alimentos derivados del maíz con un gran consumo en España (copos de maíz, maíz dulce en conserva y aperitivos de maíz) y se detectó la presencia de DON en el 68% de los casos. La tasa de contaminación más alta se produjo en los copos de maíz con 195,1µg/Kg (Cerveró *et al.*, 2007).

Por otro lado, la Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA) publicó en 2014 un estudio realizado entre los años 2008 y 2009 respecto a la presencia de micotoxinas en alimentos especiales: 18 muestras de alimentos sin gluten y 35 muestras de alimentos de importación, consumidos principalmente por la población celíaca y la población inmigrante, respectivamente. Los alimentos sin gluten, compuestos principalmente por harina de maíz o de arroz, presentaron un bajo porcentaje de muestras contaminadas con DON (11,11 % positividad) en muestras de pasta y pan. Por otra parte, en los alimentos de importación, el DON se encontró en el 42,86 % muestras, principalmente en alimentos a base de trigo. En todos los casos los valores se encontraban por debajo de los valores de seguridad para cada una de las micotoxinas, por ello, la ACSA concluye que estos alimentos especiales no deberían representar una preocupación para la salud de los colectivos que los consumen (ACSA, 2014).

3.5. Legislación

Las micotoxinas están consideradas como uno de los grupos de contaminantes naturales alimentarios más importantes, debido no sólo a las importantes pérdidas económicas que ocasionan, sino también por sus efectos adversos sobre la salud humana y animal.

La Unión Europea ha elaborado el Reglamento (CE) nº 1881/2006 en el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, entre los que se encuentran las micotoxinas en productos alimenticios incluyendo el maíz y el trigo, como se expone en la Tabla 1 y en la Tabla 2, respectivamente.

El contenido máximo permitido de aflatoxina B₁ en maíz es 5 µg/Kg y de aflatoxinas totales (B₁, B₂, G₁ y G₂) es de 10 µg/Kg. Por otro lado, el contenido máximo permitido de deoxinivalenol en trigo blando es de 1250 µg/Kg, y en el caso de trigo duro es de 1750 µg/Kg.

Tabla 1. Contenidos máximos de aflatoxinas en productos alimenticios. Reglamento (CE) nº 1881/2006.

2.1	Aflatoxinas	Contenidos máximos (µg/kg)		
		B ₁	Suma de B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂	M ₁
2.1.6	Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos derivados de la transformación de cereales, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.1.7, 2.1.10 y 2.1.12	2,0	4,0	-
2.1.7	Maíz destinado a ser sometido a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingrediente de productos alimenticios	5,0	10,0	-
2.1.10	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,10	-	-

Tabla 2. Contenidos máximos de deoxinivalenol en productos alimenticios. Reglamento (CE) nº 1881/2006.

2.4	Deoxinivalenol	Contenidos máximos (µg/kg)
2.4.1	Cereales no elaborados que no sean trigo duro, avena y maíz	1250
2.4.2	Trigo duro y avena no elaborados	1750
2.4.3	Maíz no elaborado	1750
2.4.4	Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales (incluida la harina de maíz, y el maíz triturado y molido), salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen, a excepción de los productos alimenticios enumerados en el punto 2.4.7	750
2.4.5	Pasta (seca)	750
2.4.6	Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno	500
2.4.7	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
2.4.8	Fracciones de la molienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, y otros productos de la molienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, no destinados al consumo humano directo	750
2.4.9	Fracciones de la molienda del maíz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, y otros productos de la molienda del maíz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, no destinados al consumo humano directo	1250

En el caso de que las materias primas no cumplan con los límites máximos establecidos, los operadores económicos bajarán la posibilidad de destinarlas a alimentación animal.

Para esa función, las materias primas no deben superar los límites máximos establecidos por el Reglamento (UE) n° 574/2011, respecto al contenido de aflatoxina B₁, y seguir unos valores orientativos de la Recomendación 2006/576/CE de la Comisión, respecto al contenido de deoxinivalenol

Conforme a esta normativa, el contenido máximo permitido en materias primas para piensos es de 20 µg/Kg para aflatoxina B₁ y el valor recomendado de deoxinivalenol es de 8000 µg/Kg y de 12 µg/Kg para subproductos de maíz.

3.6. Métodos de análisis de aflatoxinas y deoxinivalenol

La importancia del análisis de micotoxinas en alimentos reside en el cumplimiento de las reglamentaciones y en la verificación de los sistemas de control de seguridad alimentaria con el fin de preservar la salud de la población (Park *et al.*, 1998).

Para llevar a cabo estos análisis, son varios los organismos que han publicado métodos normalizados de análisis para diferentes micotoxinas, validados por estudios interlaboratorios: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, *Association of Official Analytical Chemists*), el Comité Europeo de Normalización (CEN, *European Committee for Standardization*) y la Asociación Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*, ISO). En el caso de España, existe la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), que adopta y convierte las normas ISO y CEN en normas españolas (UNE).

El proceso de análisis de micotoxinas se realiza habitualmente en cuatro fases, que en términos generales incluyen la toma de muestras, la extracción de los analitos de interés de la matriz y la purificación para separar componentes interferentes, y por último la identificación y cuantificación de los analitos mediante técnicas de determinación y/o técnicas de confirmación.

En las Tablas 5 y 6 se muestra una revisión bibliográfica de los métodos de análisis más utilizados por diversos autores para el análisis de aflatoxinas y deoxinivalenol en maíz y trigo, respectivamente.

Tabla 3. Métodos de análisis de aflatoxinas en maíz.

Micotoxina	Extracción	Purificación	Determinación	Referencia
Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂	MeOH:H ₂ O	IAC	HPLC-FLD	Matumba <i>et al.</i> , 2014
Aflatoxina B₁	DCM	ACN:H ₂ O	HPLC-FLD Derivatización con TFA	Armorini <i>et al.</i> , 2015
Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂	MeOH:H ₂ O	IAC	HPLC-FLD	Ghiasian <i>et al.</i> , 2011
Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂	ACN:H ₂ O	IAC	HPLC-FLD Derivatización con TFA	Majeed <i>et al.</i> , 2013
Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂	ACN:H ₂ O	IAC	HPLC-FLD	Fu <i>et al.</i> , 2008

MeOH (metanol), ACN (acetonitrilo), TFA (ácido trifluoroacético), DCM (Diclorometano), IAC (columnas de inmunoafinidad), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), FLD (detector de fluorescencia).

Tabla 4. Métodos de análisis de deoxinivalenol en trigo.

Micotoxina	Extracción	Purificación	Determinación	Referencia
DON	ACN:agua	Mycosep®	HPLC-UV	Selvaraj <i>et al.</i> , 2015
DON	Agua milli-Q	IAC	HPLC-DAD	Ennouari <i>et al.</i> , 2013
DON	Agua destilada	IAC	HPLC-DAD	Vidal <i>et al.</i> , 2013
DON	Agua milli-Q	IAC	HPLC-DAD	Bensassi <i>et al.</i> , 2010

ACN (acetonitrilo), IAC (columnas de inmunoafinidad), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas), UV (detector ultravioleta).

3.6.1. Muestreo

El análisis de micotoxinas es un proceso complejo debido a que en muchas ocasiones éstas se distribuyen de manera heterogénea en los lotes, por ello el muestreo tiene un papel fundamental en la precisión de la determinación del contenido de micotoxinas. Además, para que el muestreo sea lo más representativo posible, debe

partirse de grandes volúmenes de muestra. En el Reglamento (CE) nº 401/2006 se especifican los criterios generales que deben cumplir los métodos de muestreo de micotoxinas en distintos alimentos, para garantizar que los laboratorios de control utilicen métodos de análisis con niveles de eficacia comparables.

3.6.2. Técnicas de extracción y purificación

La etapa de extracción consiste en liberar de la matriz alimentaria la o las micotoxinas de interés. Es importante que previamente, y debido a la distribución poco uniforme de las micotoxinas en los alimentos, se lleve a cabo una correcta homogeneización de la muestra.

Para la **extracción** de las micotoxinas se utilizan diferentes solventes. La elección del solvente o combinación de éstos a utilizar en la etapa de extracción depende de la polaridad de la micotoxina, de la naturaleza de la muestra y del procedimiento de purificación que se utilizará. Tanto las aflatoxinas como el deoxinivalenol son altamente solubles en disolventes polares. En el caso del deoxinivalenol, la extracción se realiza con agua o con soluciones acuosas de metanol o acetonitrilo (ACN) en diferentes proporciones, aunque hay una clara tendencia a usar mezclas de ACN:agua, ya que se consiguen extractos más limpios. En los casos en los que las muestras sean posteriormente purificadas con columnas de inmunoafinidad, la extracción se realiza preferentemente con agua (Krska *et al.*, 2007). La adición de sales y el ajuste del pH pueden contribuir a mejorar el rendimiento de las extracciones (Soriano, 2007).

Tras la extracción es importante llevar a cabo la etapa de **purificación**, con la que se consigue eliminar las sustancias o componentes de la muestra que pueden comportarse de manera similar al analito de interés, y que por tanto, pueden interferir en su detección y cuantificación.

Esta etapa puede no ser necesaria cuando para la posterior determinación de los analitos, se emplean técnicas inmunoquímicas específicas, sin embargo, cuando empleamos métodos cromatográficos de determinación, se deben utilizar procedimientos como la partición líquido-líquido, la extracción y/o dispersión en fase sólida, columnas de inmunoafinidad (IAC) y otras columnas con mezcla de diferentes

adsorbentes, como son las columnas multifuncionales Mycosep® (Trombete *et al.*, 2013).

La purificación con columnas de inmunoafinidad está siendo muy utilizada en los últimos años para el análisis de micotoxinas en cereales por su facilidad de uso y alta selectividad (Krska *et al.*, 2007). Estas columnas están formadas por anticuerpos monoclonales anti-micotoxina que se encuentran inmovilizados en un gel de sefarosa o agarosa.

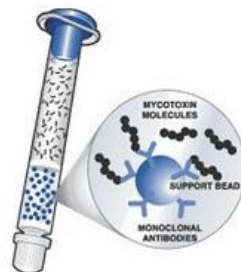


Figura 7. Columna de inmunoafinidad con la micotoxina unida a los anticuerpos inmovilizados en el gel (VICAM).

El procedimiento consiste en acondicionar previamente la columna, y posteriormente añadir el extracto a analizar. Las micotoxinas se unirán a los anticuerpos específicos fijados a la fase estacionaria de la columna. Tras la etapa de lavado con un buffer u otra solución apropiada para eliminar las sustancias interferentes, los analitos se eluyen con el disolvente necesario para romper la unión antígeno-anticuerpo, liberando de este modo la micotoxina.

Debido a la reacción específica antígeno-anticuerpo que se produce, con este método existe una menor cantidad de impurezas en los extractos obtenidos en comparación con otros métodos de purificación.

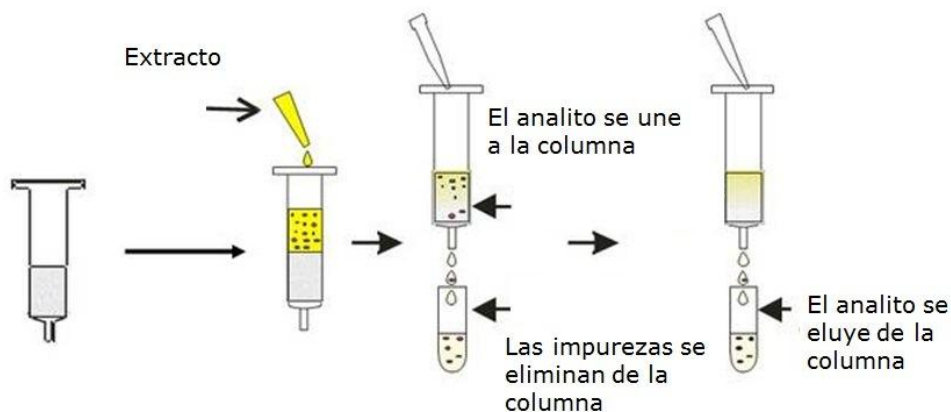


Figura 8. Proceso de purificación con columnas de inmunoafinidad (Romerlabs).

Estas columnas están disponibles tanto para el análisis de aflatoxinas como para DON. Su uso está bien estudiado en muestras contaminadas, y proporcionan recuperaciones más altas que las proporcionadas con otros métodos de purificación.

3.6.3. Técnicas de determinación y confirmación

3.6.3.1. Técnicas de cribado o screening

La finalidad analítica de estas técnicas es la de descartar de una manera rápida, las muestras negativas y reducir al máximo el número de análisis. Son métodos rápidos y sensibles, pero sin embargo, poco selectivos, por lo que las muestras positivas deben ser confirmadas por técnicas más robustas para validar los resultados. No requieren un elevado coste en equipamientos, y no suele ser necesaria la purificación de la muestra después de la extracción.

A este tipo de metodología pertenecen entre otras, la técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) o el test de flujo lateral.

3.6.3.2. Técnicas instrumentales

Los métodos de determinación de las micotoxinas se basan en métodos cromatográficos instrumentales que permiten la separación dinámica de los diferentes componentes de una muestra entre dos fases con una amplia superficie de contacto, una de las cuales es móvil (fase móvil) y la otra es estacionaria (fase estacionaria).

a) Métodos de determinación de aflatoxinas

Tradicionalmente, el método más usado para la determinación de aflatoxinas era la cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) debido a que ofrece la capacidad de analizar una gran cantidad de muestras simultáneamente. Sin embargo, actualmente el análisis de aflatoxinas se realiza mayoritariamente mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de fluorescencia (HPLC-FLD) con columnas de fase reversa C18, para aprovechar la propiedad fluorescente de estas micotoxinas para ser detectadas (Trombete *et al.*, 2013).

b) Métodos de determinación de deoxinivalenol

Inicialmente, la cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*) con derivatización química era el método de rutina para la determinación y cuantificación de los tricotecnos, debido a que son compuestos no fluorescentes y presentan moderada absorción en el rango del UV-visible (Lattanzio *et al.*, 2009).

Las limitaciones de esta técnica, hace que hoy en día la técnica más común sea cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de diodo (DAD) (Ghianian *et al.*, 2011). La separación analítica del DON, se logra, al igual que las aflatoxinas con columnas de fase reversa C18.

3.6.3.3. Técnicas de confirmación

La combinación de la versatilidad de la cromatografía líquida de alta resolución con la sensibilidad de la espectrometría de masas (LC-MS, *liquid chromatography-mass spectrometry*) facilita la identificación, cuantificación e información estructural de micotoxinas permitiendo analizar con una gran precisión la composición molecular de diferentes componentes de una muestra en función de su relación masa-carga (Soriano, 2007).

Recientemente el uso de la cromatografía líquida adaptada a un detector de masas (LC-MS) se ha convertido en uno de los métodos más utilizados para el análisis de micotoxinas ya que ofrece una mayor selectividad y sensibilidad (Serrano *et al.*, 2013; López-Grío *et al.*, 2010).

4. Material y métodos

La determinación de aflatoxinas y deoxinivalenol en las muestras objeto de estudio se llevó a cabo mediante métodos de análisis previamente optimizados y validados en el laboratorio, consistentes en un procedimiento de extracción con disolventes, seguido de purificación con columnas de inmunoafinidad y determinación por cromatografía líquida de alta resolución. Estos métodos están basados en los métodos normalizados de análisis de aflatoxinas y deoxinivalenol en cereales y derivados que se recogen en la literatura científica.

4.1. Material, equipos y reactivos

4.1.1. Material

- Columnas de inmunoafinidad AFLAtest® WB SR (Vicom, Milford, Massachusetts, EEUU) para aflatoxinas.
- Columnas de inmunoafinidad DONtest™ WB (Vicom Milford, Massachusetts, EEUU) para deoxinivalenol.
- Material de laboratorio estándar:
 - Material de vidrio: Viales de color ámbar de 4 mL, embudos, pipetas, vasos de precipitados, probetas, matraces aforados.
 - Material de plástico: Tubos de centrifuga de 50 mL, puntas de micropipeta, frascos de orina, pipetas Pasteur, jeringas desechables de 20 mL.
- Microjeringa de vidrio de 250 µL SGE para HPLC (Symta, Madrid, España).
- Micropipetas de volumen variable (10-100 µL y 100-1000 µL) (BIOHIT Proline® Pipette, Helsinki, Finlandia).
- Papel de filtro Whatman nº 4 de 125 mm. de diámetro (Symta, Madrid, España).
- Papel de microfibras de vidrio (Chmlab Group; Barcelona; España).

4.1.2. Equipos

- Balanza analítica monoplato Sartorius CP 224 S con 0,0001 g de precisión (Sartorius Goettingen, Alemania).
- Balanza granatario monoplato Sartorius 1103 (Goettingen, Alemania).

- Baño de ultrasonidos Branson 3510 (Selecta, Barcelona, España).
- Bomba de vacío XX5522050 Millipore (de 0 a 100 kPa) (Millipore, Massachusetts, EEUU).
- Cámara frigorífica Calatán (Valencia, España)
- Concentrador de muestras con placa calefactora para evaporación por corriente de N₂ (Biocote, Coventry, Reino Unido).
- Congelador Temprow -20°C (-18°C a -28°C) (Selecta, Barcelona, España).
- Cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent HP 1100 series (Agilent Technologies Minneapolis, MN; EEUU) equipado con:
 - Columna cromatográfica de fase reversa octadecil RP C18 de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, ACE 5 C18 (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Escocia).
 - Precolumna de fase reversa RP18 pK5 (Symta, Madrid, España).
 - Inyector manual.
 - Módulo de bomba o sistema de bombeo binario para la fase móvil
 - Detector de fluorescencia (FLD)
 - Detector de derivatización fotoquímica PHRED UVE
 - Detector ultravioleta de red de diodos (DAD)
 - Unidad de control del equipo y tratamiento de datos con el software Chemstation 3D
- Molino K-6 Platino (Ascaso Factory, Barcelona, España).
- Rota-Tubos MS2 Minishaker IKA (Staufen, Alemania).
- Sistema de filtración a vacío compuesto por: Bomba de vacío, matraz Erlenmeyer de 1 L, portafiltros con pinza, matraz kitasato de 1 L (Áfora, Barcelona, España).

Todos los equipos utilizados para la determinación de micotoxinas están sometidos a controles de calidad periódicos llevados a cabo por sus respectivos servicios de mantenimiento.

4.1.3. Reactivos

- Acetonitrilo (CH₃CN) grado HPLC (LabScan Analytical Sciences Dublín, Irlanda).
- Agua desionizada calidad milli-Q. Resistividad 18,2 mΩ/cm (Millipore, Milford, Massachusetts, EEUU)

- Cloruro de sodio (NaCl) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Gas Nitrógeno N₂ C55 (Carburos Metálicos, Zaragoza, España).
- Metanol (CH₃OH) grado HPLC (LabScan Analytical Sciences, Dublín, Irlanda).
- Patrón mix de aflatoxinas (Patrón comercial) con concentraciones de 1 µg/mL de aflatoxinas B₁ y G₁, y de 0,3 µg/mL de aflatoxinas B₂ y G₂ en metanol (Pureza 99,5%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania.).
- Patrón de deoxinivalenol (Patrón comercial) con una concentración de 100 µg/mL de deoxinivalenol en acetonitrilo (Pureza 99,4%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Ambas soluciones comerciales se almacenaron en congelación a -20°C por recomendación del fabricante.

4.1.3.1. Preparación y mantenimiento de patrones de calibración

La calibración de las soluciones patrón se ha realizado siguiendo los procedimientos descritos por las normas UNE-EN ISO 16050:2011 (aflatoxinas) y UNE-EN 15891:2011 (deoxinivalenol).

Cada día de trabajo se realizó una recta de calibrado de los metabolitos objeto de análisis:

- **Aflatoxinas:** Para elaborar la recta de calibrado se partió de la solución comercial en metanol y se elaboró una solución madre de 0,1 µg/mL de B₁ y G₁, y 0,03 µg/mL de B₂ y G₂ en la fase móvil de elección (Metanol/acetonitrilo/agua) (5/1/4). A partir de esta solución madre, se prepararon los patrones de calibración a los niveles que se indican: 0,5; 1; 2,5; 5; 10 ng/mL para B₁ y G₁, y de 0,15; 0,3; 0,75; 1,5; 3 ng/mL para B₂ y G₂. Todos estos patrones se prepararon igualmente en la fase móvil de elección ya mencionada.
- **Deoxinivalenol:** Para la elaboración de la recta de calibrado se elaboró en primer lugar una solución madre de 100 µg/mL en acetonitrilo. A partir de esta disolución, se prepararon el resto de soluciones patrón de calibración en la fase móvil de elección (Metanol/acetonitrilo/agua) (5/5/90) a las concentraciones que se indican: 0,1; 0,5; 1; 2; 5 µg/mL. En este caso, se optó por inyectar dos patrones de calibración, de concentraciones superiores a las indicadas por la norma, ya que era de

esperar, que en algunas muestras se encontraran elevados niveles de contaminación por DON.

Los patrones comerciales y las soluciones madre preparadas a partir de éstos, se mantuvieron en un vial ámbar en congelación a -20°C , lo que garantiza su estabilidad a largo plazo. Las soluciones de calibración, se mantuvieron en un vial ámbar en refrigeración a 8°C .

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

4.1.4. Precauciones y normas de trabajo

Debido a la toxicidad de las micotoxinas y el riesgo de contaminación que implica su manipulación en el laboratorio, es obligatorio tomar una serie de precauciones en el manejo de este tipo de sustancias.

De este modo, la manipulación de estos compuestos se realizó siempre con guantes de nitrilo para evitar entrar en contacto con las toxinas y debajo de la campana de extracción de gases.

Asimismo, todo el material en contacto con muestras contaminadas se detoxifica mediante la adición de una solución acuosa de lejía comercial al 10%, que se mantiene durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (Bacaloni *et al.*, 2008). Posteriormente, el material reutilizable se lava con una solución jabonosa y se le da un aclarado final con agua destilada.

El material de plástico empleado es desechable y de un solo uso, por lo que se procede a su eliminación tras su descontaminación mediante el procedimiento descrito. Asimismo, los restos de disolventes utilizados, se eliminan en contenedores de residuos orgánicos destinados exclusivamente con este fin.

Además, es importante tener en cuenta la estabilidad de las soluciones patrón, ya que en el caso concreto de las aflatoxinas, al ser fotosensibles, tienen que estar protegidas de la luz directa, ya que si no se degradarían. (CE, 1992; Nkama *et al.*, 1987). Aunque el deoxinivalenol no es tan sensible a la luz como las aflatoxinas se siguieron las mismas normas de trabajo para su manipulación,

Tanto las fases móviles como el metanol, que se emplea para la limpieza del sistema HPLC, se filtran bajo campana y se desgasifican en un baño de ultrasonidos antes de su uso.

4.2. Recepción y acondicionamiento de las muestras de maíz y trigo para el análisis de micotoxinas

El estudio de las tasas de contaminación por micotoxinas en cereales se ha llevado en **49 muestras de maíz** de la cosecha de 2014 y **98 muestras de trigo** correspondientes a la cosecha de 2015, todas ellas procedentes de las Comunidades Autónomas de Navarra y Aragón.

Debido a que la toma de muestras para este estudio se realizó entre enero y febrero y la cosecha del maíz se realiza habitualmente entre los meses de Octubre y Noviembre, muchas de las muestras analizadas procedían de almacenes de las cooperativas o se recogieron en épocas en las que se considera que la cosecha del maíz es tardía (Diciembre y Enero).

En el caso del maíz se han analizado 29 muestras recogidas directamente del campo y 20 muestras procedentes de almacenes de cooperativas que habían pasado previamente por secadero. En cuanto a las muestras de trigo, tanto duro como blando, éstas también procedían del campo o bien de silos donde se almacenaba el grano recién cosechado. El número y tipo de muestras analizadas se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Número y tipo de muestras analizadas de maíz y trigo.

Matriz alimentaria		Número de muestras	
Maíz	Maíz de campo	29	49 muestras
	Maíz almacenado	20	
Trigo	Trigo Blando	65	98 muestras
	Trigo Duro	33	

La naturaleza aleatoria de la contaminación fúngica y su desigual distribución hace que el muestreo sea una etapa clave a la hora de obtener una muestra representativa. Debido a esto se tomaron sub-muestras de distintos puntos del remolque una vez cosechado el grano así como de distintas zonas de la nave o silo donde se almacenó el cereal tras el secadero (maíz) o tras la recolección (trigo).

Las muestras se recibieron en la Facultad de Veterinaria en distintos formatos, desde pequeños sacos de rafia hasta bolsas herméticas de plástico de 1000 gramos. Todas las muestras se mantuvieron en su envase original hasta el momento de la molienda.

Previo a su análisis, las muestras de grano limpio recibidas en el laboratorio fueron trituradas en un molino K-6 Platino. Para obtener sub-muestras representativas, se recogieron aproximadamente 250 gramos de la fracción intermedia de la molienda con el molino de laboratorio, se etiquetaron los botes y se mantuvieron en congelación hasta el momento de su análisis.

Independientemente de la matriz, todas las muestras analíticas fueron bien mezcladas y homogeneizadas antes de su análisis en el laboratorio, para reducir la variabilidad de los resultados.

4.3. Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en cereales

4.3.1. Determinación de aflatoxinas en maíz

El método empleado para la determinación de aflatoxinas en las muestras de maíz, previamente optimizado y validado en el laboratorio de análisis, está basado en el procedimiento descrito en la norma estandarizada de referencia 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”. Asimismo, se tuvieron en consideración los protocolos de trabajo elaborados por el fabricante de las columnas de inmunoafinidad empleadas: “AFLAtest® WB SR HPLC procedure for corn”.

En la Figura 9 se muestra, a modo de esquema, el procedimiento de análisis de aflatoxinas en maíz llevado a cabo.

Método de análisis de AFLATOXINAS en muestras de MAÍZ mediante extracción y purificación con columnas de inmunoafinidad AFLAtest® WB SR

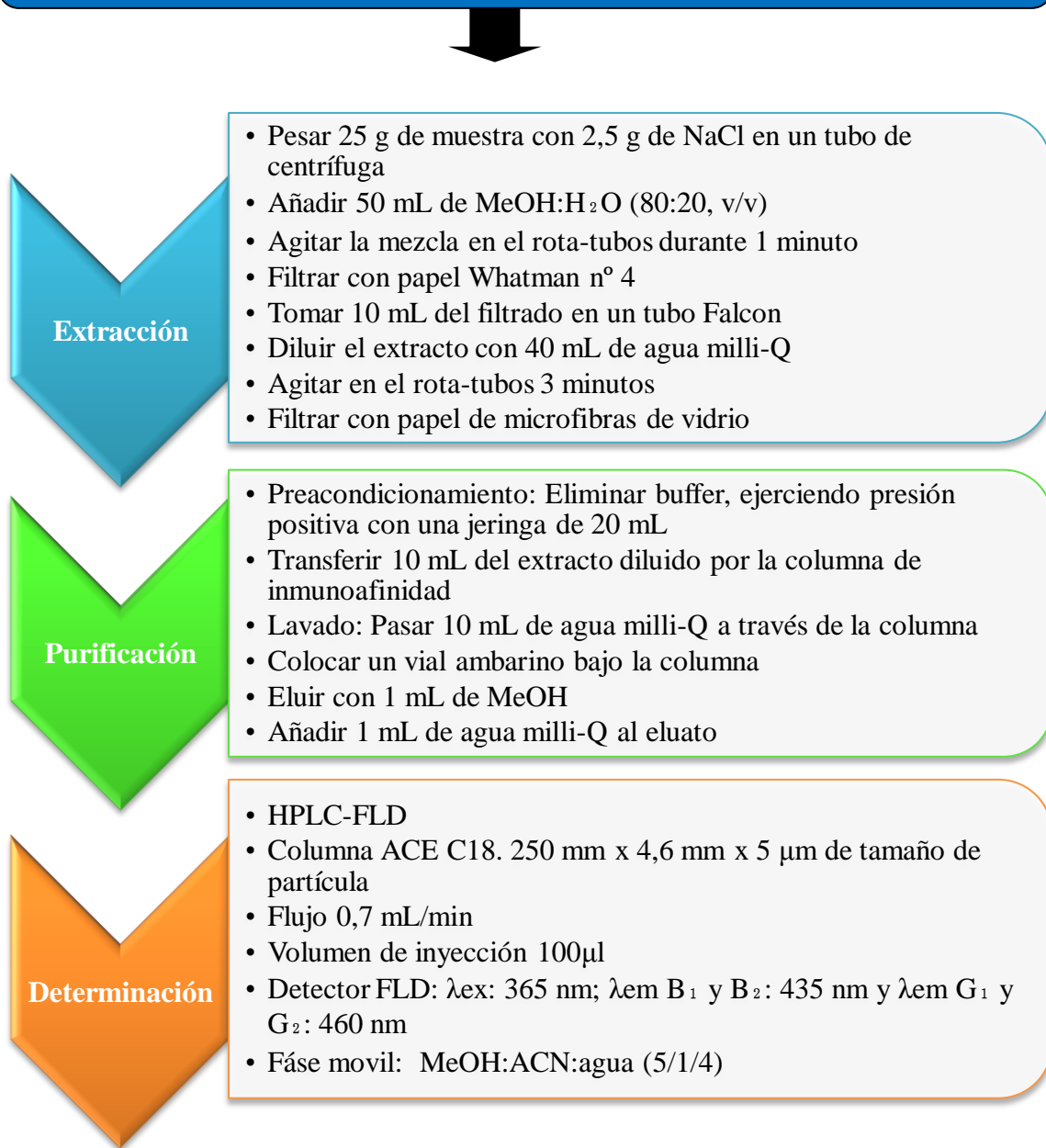


Figura 9. Método de análisis de aflatoxinas en maíz mediante extracción y purificación con columnas de inmunoafinidad AFLAtest® WB SR.

4.3.2. Determinación de deoxinivalenol en trigo

El método empleado para la determinación de deoxinivalenol en las muestras de trigo, previamente optimizado y validado en el laboratorio de análisis, está basado en el procedimiento descrito en la norma estandarizada de UNE-EN 15891:2011 “Productos alimenticios. Determinación de deoxinivalenol en cereales, productos a base de cereales

y en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método HPLC con purificación de columna de inmunoafinidad y detección por UV”. Asimismo, se tuvieron en consideración los protocolos de trabajo elaborados por el fabricante de las columnas de inmunoafinidad empleadas: “DONtest™ WB HPLC procedure for wheat”

A continuación se describe de manera esquemática el método analítico llevado a cabo para la detección de deoxinivalenol en trigo (Figura 10).



Figura 10. Método de análisis de deoxinivalenol en trigo mediante extracción y purificación con columnas de inmunoafinidad DONtest™ WB.

4.4. Control de calidad de los resultados analíticos

De forma continua se debe demostrar la capacidad del laboratorio para tener resultados precisos. Por ello, aun contando con metodologías de análisis previamente validadas en el laboratorio para el análisis de las micotoxinas de interés en las matrices objeto de estudio se han establecido una serie de procedimientos que permiten garantizar la calidad de los resultados analíticos obtenidos a lo largo del tiempo.

De esta forma, además de los procedimientos de limpieza de material y control del origen de disolventes y reactivos, las muestras a analizar se han dividido en lotes analíticos. El análisis de cada uno de estos lotes se llevó a cabo en un día completo, de tal manera que cada día de trabajo se realizó una recta de calibrado de los metabolitos objeto de análisis. Además, a lo largo del tiempo que duró el trabajo experimental, se incluyó junto con las muestras de interés, el análisis de un blanco de reactivos o blanco analítico, que sirve para estudiar la especificidad y determinar si durante el proceso analítico se han introducido interferencias o contaminaciones que afectan a la determinación de los analitos de interés, así como muestras con concentraciones conocidas de los analitos objeto de estudio, con el objetivo de comprobar la veracidad de la técnica.

5. Resultados y discusión

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de maíz y trigo, analizadas siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior.

De este modo, se obtuvieron los cromatogramas de todas las muestras analizadas, identificándose los picos de las aflatoxinas y deoxinivalenol presentes en cada una de las muestras por comparación de sus tiempos de retención con los de las correspondientes soluciones patrón.

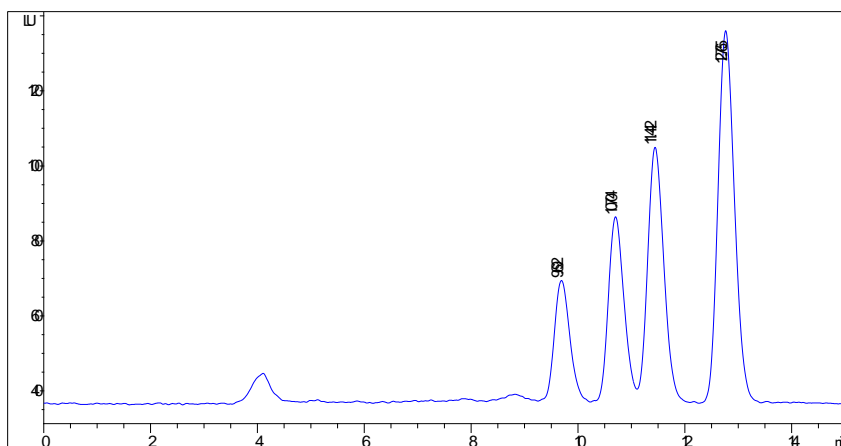


Figura 11. Cromatograma de un patrón mix de aflatoxinas de 2,5 ng/mL para G₁ y B₁, y de 0,75 ng/mL para G₂ y B₂.

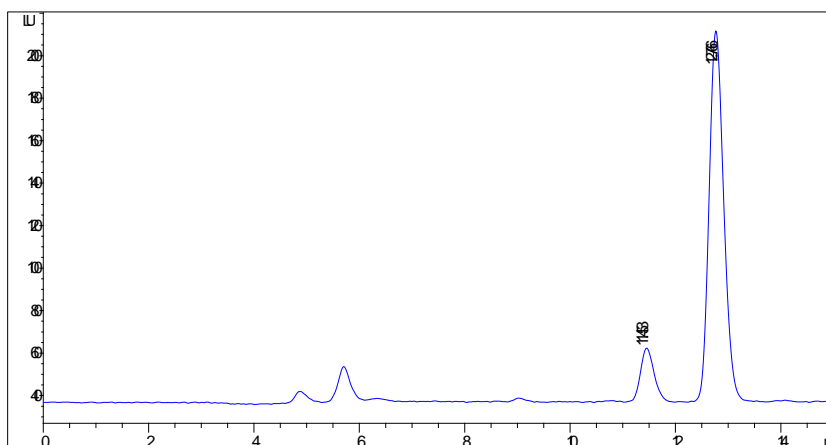


Figura 12. Cromatograma de una muestra de maíz almacenado contaminada con 0,58 µg/Kg de aflatoxina B₂ y 7,76 µg/kg de aflatoxina B₁.

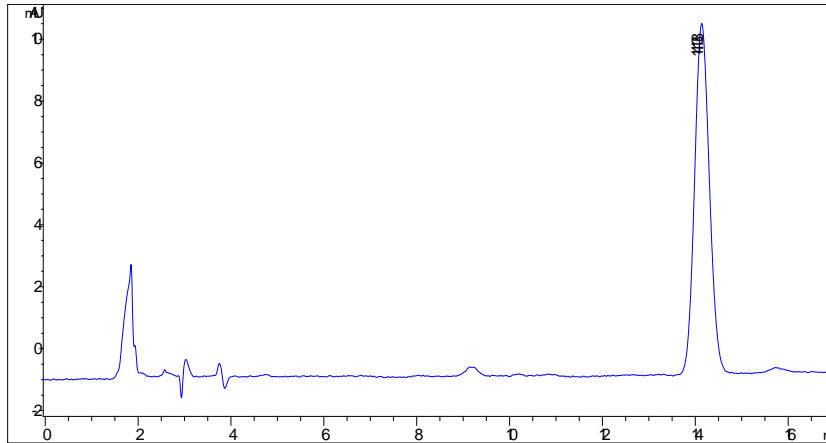


Figura 13. Cromatograma de un patrón de deoxinivalenol de 2 µg/mL.

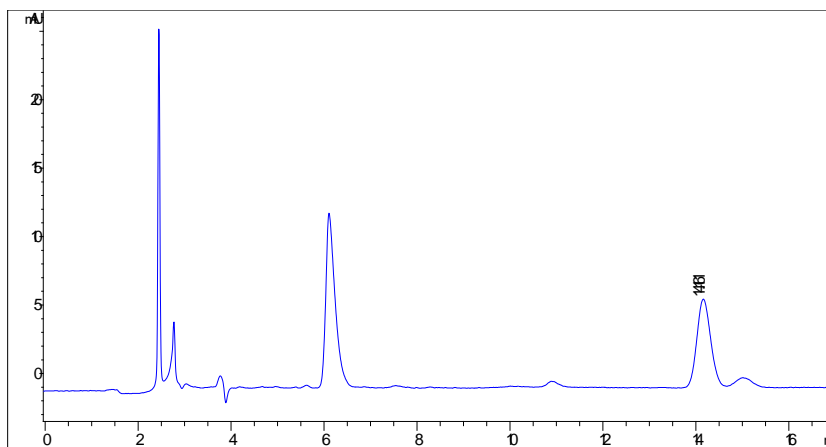


Figura 14. Cromatograma de una muestra de trigo blando contaminada con 2020 µg/Kg de deoxinivalenol.

Señalar que los estudios de especificidad y veracidad llevados a cabo, mostraron que a lo largo del tiempo que duró el análisis de las muestras se cumplió con los criterios establecidos para estos parámetros (Norma UNE-EN ISO 16050:2011 y Reglamento (CE) nº 401/2006).

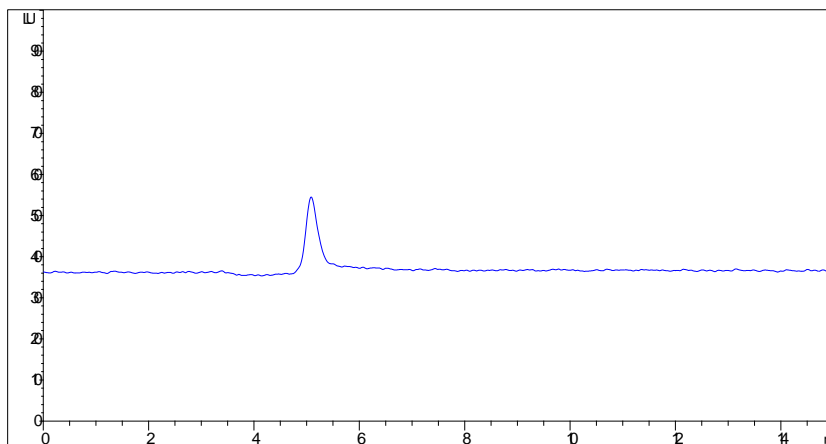


Figura 15. Cromatograma de una muestra de maíz no contaminada.

Así, en el análisis de muestras contaminadas experimentalmente con aflatoxinas totales (2 µg/kg) y DON (400 µg/kg) se obtuvieron valores de recuperación superiores al 90% en ambos casos, cumpliendo por lo tanto con los parámetros descritos en el Reglamento (CE) nº 401/2006 de la Comisión, por el cual se aceptan valores de recuperación entre un 70 y 110% para el primer caso, y entre un 60 y un 110% para el segundo.

La linealidad, representada a través de una recta de regresión, se utiliza para calcular por interpolación, la concentración de analito en las muestras. Esta linealidad se verificó tras la obtención de un valor de $R^2 > 0,999$ en cada una de las rectas de calibrado elaboradas diariamente. En las Figuras 16 a 20 se muestran las rectas de calibrado elaboradas mediante el método del patrón externo, obteniéndose la ecuación de la recta con la que calcular las concentraciones para cada tipo de analito en cada una de las muestras analizadas. Finalmente, tras aplicar un factor de multiplicación de la técnica de 2 para ambas micotoxinas, se expresaron los resultados analíticos en µg/Kg.

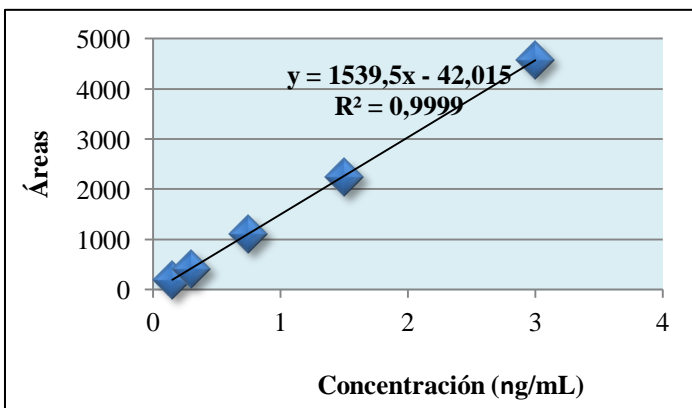


Figura 16. Recta de calibrado para G_2 (0,15 ng/mL - 3 ng/mL).

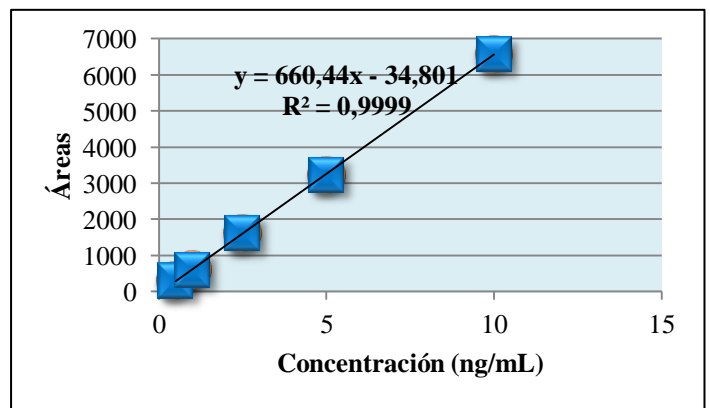


Figura 17. Recta de calibrado para G_1 (0,5 ng/mL - 10 ng/mL).

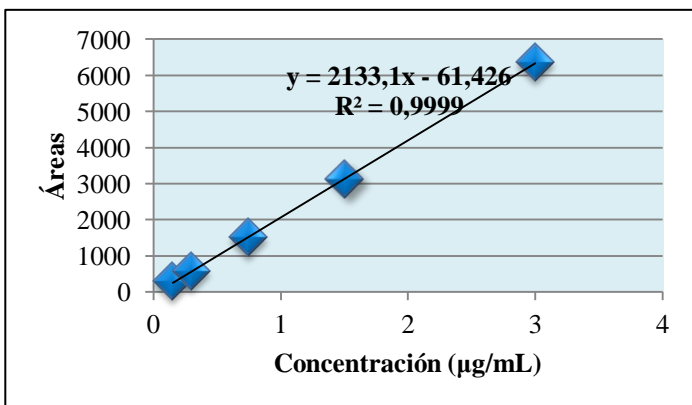


Figura 18. Recta de calibrado para B_2 (0,15 ng/mL - 3 ng/mL).

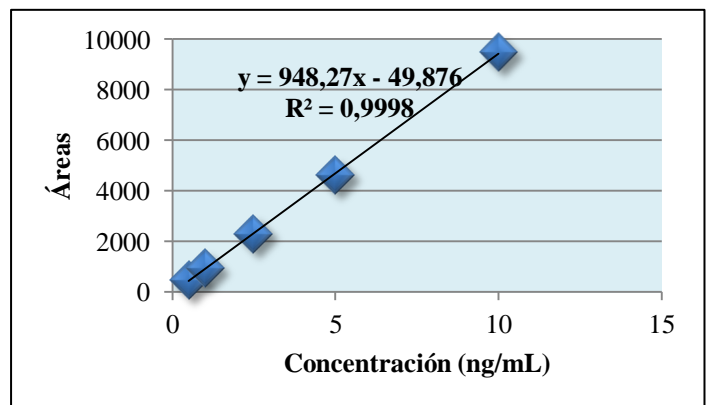


Figura 19. Recta de calibrado para B_1 (0,5 ng/mL - 10 ng/mL).

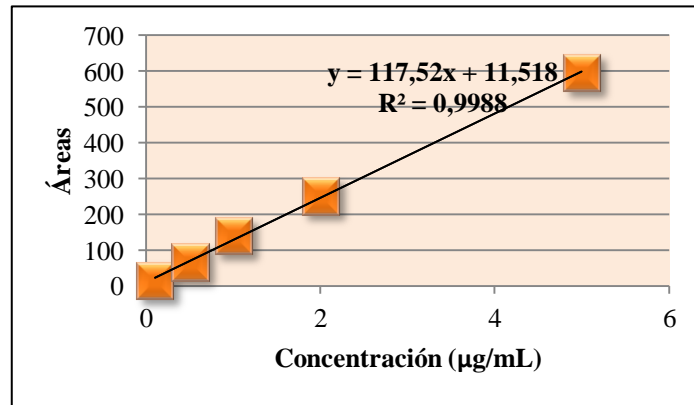


Figura 20. Recta de calibrado para DON (0,1 µg/mL - 5 µg/mL).

Para cuantificar las tasas de contaminación de aflatoxinas y DON en maíz y trigo, respectivamente, se consideraron como positivas aquellas muestras que mostraron concentraciones de analito por encima de los correspondientes límites de detección (LD). A ese respecto, señalar que el LD se define como la mínima cantidad de analito presente en las muestras que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar. Por otra parte, el LC es la menor cantidad de analito de la muestra que puede ser medida cuantitativamente con una certeza estadística razonable. Es importante tener en cuenta los valores obtenidos de límites de detección y de cuantificación de las distintas metodologías empleadas.

Tabla 6. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) para aflatoxinas y deoxinivalenol de las metodologías de análisis utilizadas.

	Aflatoxinas				Deoxinivalenol
	G ₂	G ₁	B ₂	B ₁	
LD (µg/Kg)	0,05	0,075	0,05	0,05	33
LC (µg/Kg)	0,1				100

Es importante señalar que en el caso de las aflatoxinas, los límites de detección y cuantificación mostrados resultaron ser semejantes a los obtenidos por otros autores, como Medina y Magan en el año 2012: (G₂: 0,023 µg/Kg; G₁: 0,042 µg/Kg; B₂: 0,012 µg/Kg y B₁: 0,015 µg/Kg). Con respecto al límite de cuantificación, se comprobó en este mismo estudio que los valores también eran próximos a 0,1 µg/Kg (0,131-0,072 µg/Kg). En el caso del DON, los límites de detección y cuantificación de la técnica empleada en

este trabajo para su análisis en matrices alimentarias, también están en concordancia con los publicados por otros autores (Savi *et al.*, 2016).

Tasas de contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en maíz

El maíz, es una matriz alimentaria en la que en la Unión Europea, habitualmente, se evalúa la incidencia de otro tipo de micotoxinas como las toxinas de *Fusarium*. En nuestro caso, se tomó la decisión de analizar la incidencia de aflatoxinas en esta matriz debido a que es un peligro emergente, ya que el cambio climático está haciendo que aumenten los niveles de contaminación de estas micotoxinas. Por ese motivo, existen pocos resultados comparables de países europeos, pero si los hay respecto a países con climas más cálidos, que sufren con más frecuencia este tipo de contaminación.

En la Tabla 7 se recogen los resultados de contaminación por aflatoxinas de las muestras de grano de maíz analizadas. Tras el análisis, sólo se detectaron dos muestras con concentraciones de aflatoxinas por encima del límite de detección de la técnica. Una de ellas presentaba concentraciones por encima del LD tanto de B₁ como de B₂ mientras que la otra, superaba el límite de detección establecido, únicamente para la aflatoxina B₁. Ambas, procedían de muestras que habían estado almacenadas desde su cosecha. Es importante destacar, que ninguna de las muestras analizadas presentó contaminación con las cuatro aflatoxinas estudiadas y legisladas (G₂, G₁, B₂ y B₁). Esto puede ser debido a que el origen de la contaminación por aflatoxinas B₁ y B₂ en el maíz se debiera a la infección por mohos de la especie *Aspergillus flavus* que es un moho que se sabe que generalmente produce solo aflatoxinas B₁ y B₂ (Ehrlich *et al.*, 2007).

Tabla 7. Análisis descriptivo de los datos obtenidos de las muestras positivas de maíz.

MAÍZ				
Tipo de muestra	n (número de muestras)	n muestras positivas	% Positividad	Intervalo o rango (µg/Kg) de aflatoxinas totales
Maíz de campo	29	0/29	0 %	-
Maíz almacenado	20	2/20	10 %	0,61 - 8,34

Los resultados obtenidos indicaron tasas de contaminación comprendidas entre 0,61 y 8,34 µg/Kg para la suma de las aflatoxinas detectadas. Una de las dos muestras

contaminadas presentó tasas de contaminación de 0,58 y 7,76 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de B_2 y B_1 , respectivamente. La otra muestra positiva (con una tasa de contaminación inferior a la anterior) también resultó estar contaminada con aflatoxina B_1 a una concentración de 0,61 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Ninguna de las dos muestras superaba el límite máximo establecido por el Reglamento (CE) n° 1881/2006 para la suma de aflatoxinas totales en maíz (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Sin embargo una de ellas sí que superaba el límite máximo parcial establecido por la legislación para aflatoxina B_1 destinada a alimentación humana (5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Esta muestra por lo tanto, no puede destinarse al consumo humano directo, aunque sí puede destinarse para la alimentación animal, porque no supera el límite máximo establecido en 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ por el Reglamento (UE) n° 574/2011 respecto al contenido de aflatoxina B_1 en piensos destinados al consumo animal.

Positividad (%) de aflatoxinas totales en maíz

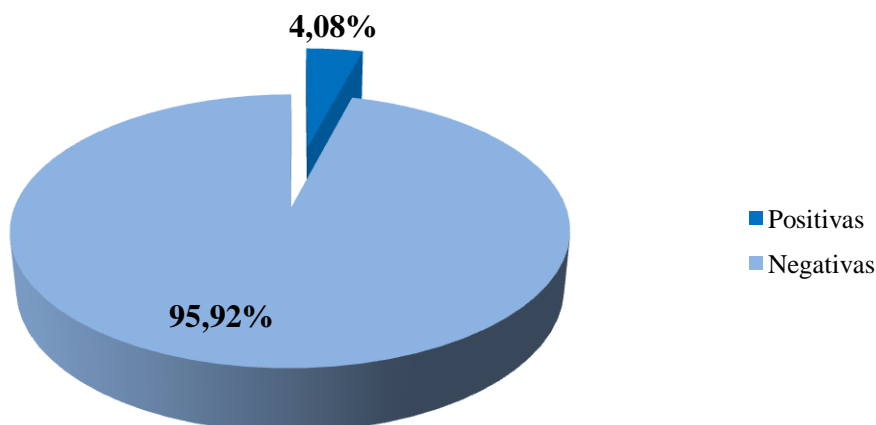


Figura 21. Positividad (%) de la contaminación por aflatoxinas totales en muestras de maíz.

Si tenemos en cuenta las aflatoxinas totales analizadas en todas las muestras de maíz, podemos determinar un porcentaje de positividad del 4,08%, que corresponde en su totalidad y como se ha mencionado anteriormente, a muestras de maíz que fueron sometidas a un almacenamiento post-cosecha.

A pesar de no existir apenas datos Europeos comparables, los resultados obtenidos son similares a los hallados en España por Cano-Sancho *et al.*, (2013) y en Italia por Armorini *et al.*, (2015). En el primero de estos trabajos, se analizaron aflatoxinas totales en 394 muestras (maíz dulce y aperitivos de maíz) de las cuales sólo 3 resultaron

positivas (0,76%). Con un intervalo de contaminación de 0,8 a 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En relación al estudio llevado a cabo en Italia, destaca el elevado porcentaje de positividad encontrado por estos autores, de un 26%, en el análisis de muestras de harina de maíz ($n=50$), en las que además se hallaron tasas de contaminación comprendidas entre 0,17 y 3,75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxina B_1/Kg de harina de maíz. En general, destaca el hecho de que todos estos niveles se consideran bajos y no superan el contenido máximo de aflatoxinas totales y B_1 establecido por la legislación, al igual que las muestras analizadas en nuestro laboratorio.

Por el contrario, en otros trabajos (Zinedine *et al.*, 2007) se han detectado niveles de positividad de aflatoxinas en harina de maíz procedente de Marruecos de hasta el 80%, superando el 10% de las muestras positivas los límites máximos establecidos por la legislación europea, tanto para AFB_1 como para AFs totales.

En zonas tropicales, como el África Subsahariana, han hallado unos elevadísimos niveles de contaminación en cultivos de maíz, con el problema añadido de que éste constituye un alimento básico e imprescindible para la gran mayoría de la población africana. Así, en un estudio realizado por Probst *et al.* (2014), se analizaron 364 muestras de maíz cultivado por pequeños agricultores en 18 países africanos. Estas muestras analizadas indicaron unas tasas de contaminación de aflatoxinas totales comprendidas entre 2 y 999 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Se ha señalado, que estos niveles de contaminación tan altos podrían ser debidos a unas inadecuadas condiciones de almacenamiento del grano cosechado.

A este respecto, son varios los estudios que muestran al igual que en nuestro trabajo, mayores tasas de contaminación por micotoxinas, en muestras de cereales sometidas a un proceso de almacenamiento (Magan y Aldred, 2007; Yigezu *et al.*, 2008). Ya hemos visto anteriormente, que el crecimiento de los mohos y la síntesis de micotoxinas se ven favorecidos por una serie de factores como la temperatura y la humedad en el almacenamiento de los granos de maíz.

En el caso de las muestras analizadas en este trabajo y que se tomaron en los almacenes de las cooperativas, todas ellas presentaban porcentajes de humedad que no suponían un riesgo (entre 11,2 y 15%) con lo que se podría correlacionar que la escasa presencia de muestras positivas se asociaría al porcentaje bajo de humedad del grano tomado en la etapa de almacenamiento. Sin embargo, es importante destacar que la

muestra altamente contaminada presentaba un porcentaje de humedad elevado (32%) y se comprobó que este factor tenía un gran impacto sobre la proliferación fúngica, ya que la muestra recibida presentaba un alto grado de contaminación que se pudo comprobar macroscópicamente.

Esta muestra procedía de un almacén en el que se había desarrollado en la superficie del montón de cereal una capa mohosa. La causa fue la condensación de humedad en la superficie de la masa del cereal almacenado que incrementó la humedad del grano. En dicho episodio, para evitar la contaminación con micotoxinas del almacén, la cooperativa llevó a cabo la retirada y descarte de la capa superficial para impedir que entrara en la cadena alimentaria. Una vez retirada la capa superficial, se tomaron sub-muestras en distintos puntos del silo que correspondían a las capas subyacentes que resultaron ser negativas a aflatoxinas. La humedad de estos granos no sobrepasaba el 12% con lo que podría considerarse como una práctica adecuada de almacenamiento para evitar la contaminación de los granos de maíz con aflatoxinas. Esos valores son considerados por muchos autores como seguros para evitar el crecimiento de mohos micotoxigénicos (Wicklow, 1995).

Tasas de contaminación por deoxinivalenol en trigo

En la siguiente tabla (Tabla 8) se muestran los resultados obtenidos en el análisis de DON en las muestras de trigo duro y blando analizadas. Tras el análisis, se detectaron 15 muestras contaminadas con DON a concentraciones por encima del límite de detección, 5 procedentes de muestras de trigo blando y 10 procedentes de trigo duro.

Tabla 8. Análisis descriptivo de los datos obtenidos de las muestras positivas de trigo.

TRIGO					
Tipo de muestra	n (número de muestras)	n muestras positivas	% Positividad	Intervalo o rango (µg/Kg) de deoxinivalenol	Media (µg/Kg)
Trigo Blando	65	5/65	7,69 %	190 - 2180	1024
Trigo Duro	33	10/33	30,30 %	160 - 3800	931

Los resultados obtenidos indican una contaminación media de deoxinivalenol en trigo blando de 1024 µg/Kg, con unas tasas de contaminación comprendidas entre 190 y 2180 µg/Kg. El porcentaje de positividad en este tipo de muestras fue de un 7,69%.

Además, dos de ellas superaban el límite máximo establecido por el Reglamento (CE) n° 1881/2006 para deoxinivalenol en trigo blando destinado a alimentación humana (1250 µg/Kg) aunque no superaban los niveles recomendados por la Comisión (Recomendación 2006/576/CE) para el uso como materia prima para la fabricación de piensos de alimentación animal (8000 µg/Kg).

De igual forma, la contaminación media de DON en las muestras de trigo duro fue de 931 µg/Kg, con unas tasas de contaminación comprendidas entre 160 y 3800 µg/Kg. El porcentaje de positividad en este tipo de muestra alcanzó un valor de 30,3%. Sin embargo, a pesar de este elevado porcentaje de muestras positivas, es importante destacar que sólo una de ellas superaba el límite máximo establecido por el Reglamento (CE) n° 1881/2006 para deoxinivalenol en trigo duro destinado a alimentación humana (1750 µg/Kg), y al igual que lo sucedido con las muestras de trigo blando, podría destinarse al consumo animal.

Es destacable la existencia de una mayor incidencia de muestras contaminadas por DON en trigo duro frente a trigo blando. Este hecho, coincide con lo publicado por otros autores como Ioos *et al.*, (2014) e Infantino *et al.*, (2015), quienes afirmaron que el trigo duro es más susceptible a padecer la FHB (*Fusarium Head Blight*: fusariosis de la espiga del trigo) que el trigo blando por carecer de ciertos genes de resistencia a la enfermedad (Kishii *et al.*, 2005).

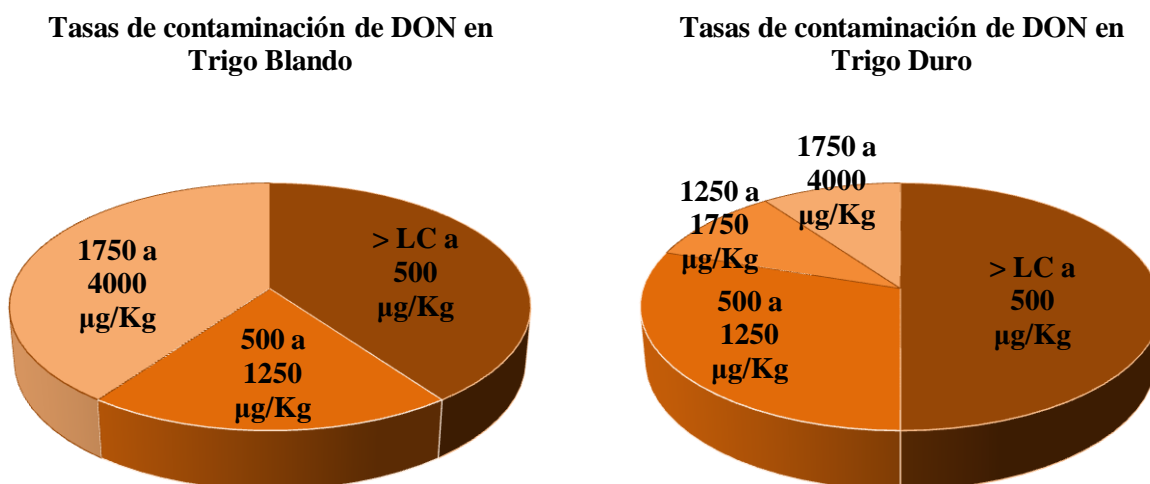


Figura 22. Tasas de contaminación de DON en trigo por encima del límite de cuantificación de la técnica.

Pese a existir una mayor incidencia de la contaminación por DON en el trigo duro frente al trigo blando; el 60% de las muestras contaminadas de trigo blando y el 50 % de trigo duro presentaron una contaminación superior a 500 µg/Kg, frente al 50% obtenido del trigo duro. Esto nos indica que ambos tipos de trigo, presentan un porcentaje similar de muestras con los mismos niveles de contaminación a pesar de que el trigo duro sea más sensible.

En cuanto a las muestras que superaron los contenidos máximos establecidos por la legislación en trigo blando y trigo duro, en ambos casos se determinó el mismo porcentaje de muestras por encima de estos límites (3,08 y 3,03%).

Tanto los niveles de contaminación de las muestras de trigo analizadas en nuestro trabajo como los porcentajes hallados de positividad, son similares a los resultados obtenidos recientemente por Savi *et al.*, (2016), quienes informaron de la presencia de DON en 7 de 35 (20%) muestras de trigo molido analizadas procedentes de Brasil. En España, González-Osnaya *et al.*, (2011), encontraron DON en 28% de las 75 muestras de pan a base de trigo analizadas, que pese a no ser la misma matriz alimentaria, el porcentaje es similar al nuestro.

En otras ocasiones, se ha informado de la presencia de esta micotoxina en cantidades muy superiores a las descritas. Así, Bensassi *et al.*, (2010), notificaron la presencia de DON en 54 de las 65 muestras analizadas de trigo duro en la zona de Túnez (83%), superando todas ellas el límite máximo establecido por la legislación de 1750 µg/Kg. Estos datos tan elevados son la consecuencia de unas condiciones climáticas favorables para la infección por *Fusarium* y la síntesis de deoxinivalenol en los granos de trigo.

Ya en el año 2001, la JECFA evaluó los niveles de contaminación por DON en diversos cereales a partir de los datos presentados por 13 países a nivel mundial, así como los publicados en la bibliografía científica durante los años 1999 y 2000. Posteriormente, en el año 2010, como se ha citado anteriormente, el Comité Mixto evaluó los datos presentados por 11 países, entre ellos Bélgica, Brasil, China, Francia o Hungría, junto con los datos disponibles en la literatura durante el periodo de 2001 a 2009. En ambos estudios, se observó que el DON es un contaminante frecuente de los cereales, cuyos niveles más altos se encontraron en trigo, cebada y maíz. En estos

informes el número de muestras de trigo positivas fue superior en el año 2010 (73%, frente al 57% de positividad en 2001). Este aumento en los niveles de contaminación por DON se debe, principalmente al cambio climático, ya que los niveles de temperatura y de humedad son factores claves para el crecimiento fúngico y la posterior producción de micotoxinas. Por ello, la constante variación del clima juega un papel muy importante en la incidencia de micotoxinas (Avantaggiato *et al.*, 2003).

En general, podemos decir que los resultados obtenidos del análisis de las muestras de trigo muestran unos niveles de contaminación inferiores a los citados por otros autores, especialmente en la zona del mediterráneo.

6. Conclusiones

Primera

Las metodologías analíticas usadas en este estudio garantizan la extracción de las aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) y deoxinivalenol de muestras de maíz y trigo, respectivamente, la adecuada separación de los analitos del resto de sustancias coextraídas con el empleo de columnas de inmunoafinidad y su detección y cuantificación sensible y selectiva, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia (FLD) y fotoquímico (PHRED) para el análisis de aflatoxinas, y con detector de diodos (DAD) en el caso de deoxinivalenol.

Segunda

La frecuencia de presentación de aflatoxinas en las muestras de maíz es baja (4,1%) detectándose únicamente aflatoxinas del tipo B y no hallando en ninguna muestra la presencia de las cuatro aflatoxinas estudiadas (B₁, B₂, G₁ y G₂). Este perfil de contaminación parece indicar una posible contaminación de estas materias primas con mohos de la especie *Aspergillus flavus* que se sabe que generalmente produce únicamente aflatoxinas del tipo B₁ y B₂.

Tercera

Al igual que ha sido reflejado con anterioridad en otros trabajos, las muestras de maíz contaminadas con aflatoxinas, en cantidades que solo en un caso superaron los límites máximos establecidos por la legislación para la aflatoxina B₁, procedían de maíz que había sido almacenado. El análisis de humedad de estas muestras permitió correlacionar la práctica de almacenamiento y más concretamente, el incremento de la humedad del grano de cereal con el incremento de la contaminación por aflatoxinas.

Cuarta

El 15,30% de las muestras de trigo presentaron contaminación por deoxinivalenol, con una tasa media de 978 µg/Kg. En general, las tasas de contaminación fueron bajas, y similares a las descritas en otros trabajos, superándose los contenidos máximos establecidos por la legislación para alimentación humana en sólo dos de las muestras de trigo blando y en una de las muestras de trigo duro analizadas, aunque ninguna de ellas superó los límites máximos recomendados en la legislación para la alimentación animal.

Quinta

El mayor porcentaje de contaminación encontrado en las muestras de trigo duro (30,3%) con respecto a las muestras de trigo blando (7,76%) confirma, como ya ha sido indicado en otros trabajos, la mayor susceptibilidad del trigo duro a ciertas micotoxinas como el deoxinivalenol, en comparación con el trigo blando, debido a la ausencia de genes de resistencia.

7. Bibliografía

- ACSA (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria)**, (2014). Presencia y co-presencia de aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas y zearalenona en alimentos especiales: alimentos sin gluten y de importación.
- Aldred, D., Magan, N.**, (2004). Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153, 165-171.
- Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A., Roncada, P.**, (2015). Occurrence of aflatoxin B₁ in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling. *Food Control*, 50, 858-863.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A.**, (2003). Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1283-1290.
- Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Samperi, R., Lagan, 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.
- Bensassi, F., Zaied, C., Abid, S., Hajlaoui, M.R., Bacha, H.**, (2010). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control*, 21, 281-285.
- Boeira, L.S., Brynce, J.H., Stewart, G.G., Flannigan, B.**, (2002). Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeasts growth to *Fusarium* mycotoxins zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B₁. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50, 69-81.
- Castillo, M.A., Montes, R., Navarro, A., Segarra, R., Cuesta, G., Hernández, E.**, (2008). Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 423-427.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology)**, (2003). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Report No. 139. Ames, Iowa, USA.
- Cerveró, M.C., Castillo, M.A., Montes, R., Hernández, E.**, (2007). Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenons in commercially available corn-based foods in Spain. *Revista Iberoamérica de Micología*, 24, 52-55.
- 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.
- Directiva 92/95/CEE de la Comisión**, del 9 de Noviembre de 1992 por la que se modifica el Anexo de la séptima Directiva 76/372/CEE que establece métodos de análisis comunitarios para el control oficial de piensos. L 327: 5-62.

- EFSA (European Food Safety Authority)**, (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. *The EFSA Journal*, 282, 1-31.
- EFSA (European Food Safety Authority)**, (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.
- ELIKA (Fundación Vasca de la Seguridad Alimentaria)**, (2013). Ficha de oxinivalenol, del 27 de Marzo del 2013. Disponible en: www.elika.eus/es/
- Ennouari, A., Sanchis, V., Marín, S., Rahouti, M., Zinedine, A.**, (2013). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. *Food Control*, 32, 115-118.
- FAO (Food and Agriculture Organization)**, (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.
- García-Moraleja, A., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E.**, (2015). Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. *Food Control*, 57, 282-292.
- Georgiadou, M., Dimou, A., Yanniotis, S.**, (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A far to storage study. *Food Control*, 26, 580-586.
- Ghiasian, S.A., Shephard, G.S., Yazdanpanah, H.**, (2011). Natural occurrence of aflatoxins from maize in Iran. *Mycopathologia*, 172, 153-160.
- González-Osnaya, L., Cortés, C., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J.**, (2011). Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialized in Spain. *Food Chemistry*, 124, 156-161.
- Hariprasad, P., Durivadivel, P., Snigdha, M., Venkateswaran, G.**, (2013). Natural occurrence of aflatoxin in green leafy vegetables. *Food Chemistry*, 138 (2-3), 1908-1913.
- IARC (International Agency for Research on Cancer)**, (1993). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon. Francia. Vol. 56.

- IARC (International Agency for Research on Cancer)**, (2002). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Some traditionally herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon. Francia. Vol. 82.
- IARC (International Agency for Research on Cancer)**, (2012). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chemical agents and related occupations: a review of human carcinogens. Lyon. Francia. Vol. 100 F.
- Infantino, A., Aureli, G., Costa, C., Taiti, C., Antonucci, P., Menesatti, P., Pallottino, F., De Felice, S., D'Egidio, M.G., Mancuso, S.**, (2015). Potential application of PTR-TOFMS for the detection of deoxynivalenol (DON) in durum wheat. *Food Control*, 57, 96-104.
- Ioos, R., Belhadj, A., Menez, M.**, (2014). Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia*, 158, 351-362.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)**. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food additives Series n. 47; *FAO Food and Nutrition Paper*, 74.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)**, (2010). Evaluation of certain food additives and contaminants. Report of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series n. 958; *FAO Food and Nutrition Paper*.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)**, (2011). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *FAO Food and Nutrition Paper* 72.
- Jiménez, M., Manez, M., Hernández, E.**, (1996). Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 417-421.
- Kishii, M., Ban, T., Ammar, K.**, (2005). *Improvement of FHB resistance of durum wheat*. In: Proceedings 2005 US National Fusarium Head Blight Forum, December 11-13, Milwaukee, 52.
- Krska, R., Welzig, E., Boudra, H.**, (2007). Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 241-264.
- Lattanzio, V.M.T., Pascale, M., Visconti, A.**, (2009). Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 758-768.
- López-Grío, S.J., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., Romero-González, R.**, (2010). Determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in animal feed by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 33, 502-508.

- Magan, N., Aldred, D.,** (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131-139.
- Majeed, S., Iqbal, M., Asi, M.R., Iqbal, S.Z.,** (2013). Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science*, 58, 446-450.
- Martínez-Larrañaga, R.M., Anadón, A.,** (2006). Micotoxinas. En: Cameán, A.M., Repetto, M. (eds.) *Toxicología Alimentaria*. Díaz de Santos, Madrid, 289-309.
- Matumba, L., Monjerezia, M., Biswick, T., Mwatseteza, J., Makumba, W., Kamangira, D., Mtukuso, A.,** (2014). A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of locally and imported processed foods on Malawian retail market. *Food Control*, 39, 87-91.
- Medina, A., Magan N.,** (2012) Comparison of three different C18 HPLC columns with different particle sizes for the optimization of aflatoxins analysis. *Journal of Chromatography B*, 889-890,138-143.
- Njapau, H., Trujillo, S., Van Egmond, H.P., Park, D.L.,** (2006). *Mycotoxins and phycotoxins: Advances in determination, toxicology and exposure management*. Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Nkama, J., Nobbs, J.H., Muller, H.G.,** (1987). Destruction of aflatoxins B1 in rice exposed to light. *Journal of Cereal Science*, 5, 167-173.
- Park, D.L., Njapau, H., Coker, R.D.,** (1998). Sampling programs for mycotoxins: Perspectives and recommendations. En: Miraglia, M., Van Egmond, H.P., Brera, C. y Gilbert, J. (eds.). *Mycotoxins and phycotoxins-developments in chemistry, toxicology and food safety*. Alaken, Inc. Colorado, EE.UU., 53-64.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M.,** (1999). Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9), 754-766.
- Pestka, J.J.,** (2010). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 283-298.
- Pettitt, T.R., Parry, D.W., Polley, R.W.,** (1996). Effect of temperature on the incidence of nodal foot rot symptoms in Winter wheat crops in England and Wales caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 79, 233-242.
- Probst, C., Brandyopadhyay, R., Cotty, P.J.,** (2014). Diversity of aflatoxina-producing fungi and their impact on food safety in Sub-Saharan Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 113-122.
- Ramírez, M., Chulze, S., Magan, N.,** (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two argentinian strains of *Fusarium*

graminearum on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 291-296.

Recomendación 2006/576/CE de la Comisión, de 17 de Agosto de 2006 sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal. DOUE L 229: 7-9.

Reglamento (CE) nº 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) nº 1881/2006 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 (UE) nº 574/2011 de la Comisión, de 16 de Junio de 2011 por el que se modifica el Anexo I de la Directiva 2002/32/CS del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melanina y *Ambrosia* spp., y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonóstatos, y por la que se consolidan sus anexos I y II. DOUE L 159: 7-24.

Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J., (2004). Micotoxinas y seguridad alimentaria. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 11 (1), 17-23.

Savi, G.D., Piacentini, K.C., Tibola, C.S., Santos, K., Maria, G.S., Scussel, V.M., (2016). Deoxynivalenol in the wheat milling process and wheat-based products and daily intake estimates for the southern Brazilian population. *Food Control*, 62, 231-236.

SCF (Scientific Committee on Food), (1996). Opinion on Aflatoxins, Ochratoxin A and Patulin. *Reports of the Scientific Committee on Food*, 36.

Selvaraj, J.N., Zhao, Y., Sangare, L., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Xue, X., Liu, Y., (2015). Limited survey of deoxynivalenol in wheat from different crop rotation fields in Yangtze-Huaihe river basin region of China. *Food Control*, 53, 151-155.

Serrano, A.B., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E., (2013). Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging *Fusarium* mycotoxins in pasta by LC-MS/MS. *Food Control*, 32, 105-114.

Soriano Del Castillo, J.M., Dragacci, S., (2004). Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International*, 37, 985-1000.

Soriano Del Castillo, J.M., (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos.

Sudakin, D.L., (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143, 97-107.

Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W., (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 141-158.

- Trombete, F.M., Saldanha, T., Direito, G.M., Fraga, M.E.,** (2013). Trichothecenes and aflatoxins contamination in wheat and wheat products: occurrence and methods of determination. *Revista Chilena de Nutrición*, 40, 181-188.
- UNE-EN ISO 16050:2011** 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”.
- UNE-EN 15891:2011** para la “Determinación de desoxinivalenol en cereales, productos a base de cereales y en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método HPLC con purificación con columna de inmunoafinidad y detección por UV.
- Vidal, A., Marín, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V.,** (2013). Determination of aflatoxins, deoxynivalenol ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 133-138.
- Wicklow, D.T.,** (1995). The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 197–249.
- Widestrand, J., Pettersson, H.,** (2001). Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. *Food Additives & Contaminants*, 18, 987–992.
- Yigezu, A., Alexander, C.E., Preckel, P.V., Maier, D.E., Woloshuk, C.P., Mason, L.J., Lawrence, J., Moog, D.J.,** (2008). Optimal management of molds in stored corn. *Agricultural Systems*.98, 220-227.
- Zain, M. E.,** (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.
- Zinedine, A., Juan, C., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Idrissi, L., Mañes, J.,** (2007). Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 124-127.

Páginas web consultadas:

<http://www.aesan.msc.es>

http://ec.europa.eu/index_en.htm

<http://www.efsa.europa.eu/>

faostat.fao.org

www.mycotoxins.org