



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo fin de Máster en
Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Evaluación de la contaminación por micotoxinas en alimentos infantiles

Evaluation of mycotoxin contamination in baby food

Autora

Gala Morreres Esteve

Directoras

Marta Herrera Sánchez

Susana Lorán Ayala

Universidad de Zaragoza

17 de Junio de 2016

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
1 Introducción	3
1.1 Micotoxinas.....	3
1.1.1 Toxicidad.....	6
1.2 Aflatoxinas (AFs).....	7
1.2.1 Clasificación y características	7
1.2.2 Toxicidad.....	8
1.2.3 Presencia de aflatoxinas en alimentos	9
1.2.4 Métodos de análisis de aflatoxinas en alimentos.....	13
2 Justificación y objetivos	14
3 Material y métodos.....	15
3.1 Muestras	15
3.2 Material	17
3.3 Equipos.....	17
3.4 Reactivos	18
3.4.1 Preparación y mantenimiento de los patrones de calibración	19
3.5 Método analítico para la determinación de aflatoxinas en alimentos infantiles.....	19
3.5.1 Optimización del método analítico.....	20
3.5.2 Método analítico.....	21
3.6 Control de calidad analítica de los resultados	23
3.6.1 Especificidad	23
3.6.2 Precisión de la inyección.....	23
3.6.3 Veracidad	24
3.6.4 Linealidad.....	24
3.6.5 Sensibilidad del método	25
3.7 Análisis estadístico.....	25
4 Resultados y discusión	26

4.1	Optimización de las condiciones del HPLC del método analítico de determinación de aflatoxinas en alimentos infantiles	26
4.1.1	Elección de la fase móvil y definición de los tiempos de retención.....	26
4.1.2	Longitudes de onda de excitación y de emisión.....	28
4.1.3	Temperatura de la columna	29
4.2	Control de calidad analítica de los resultados	30
4.2.1	Especificidad	30
4.2.2	Precisión de la inyección.....	31
4.2.3	Veracidad	31
4.2.4	Linealidad.....	31
4.2.5	Sensibilidad del método	33
4.3	Análisis de aflatoxinas en las muestras totales.....	34
5	Conclusiones	41
6	Bibliografía	43
	Anexo	49

Resumen

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos generalmente por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium*. Estos compuestos se generan en los cultivos de los cereales o durante su procesado debido a una mala manipulación, llegando así a contaminar los productos en diferentes puntos de la cadena alimentaria. Las micotoxinas analizadas en este estudio son las aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂). Éstas son contaminantes muy tóxicos y la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) las clasifica dentro del Grupo I como sustancias cancerígenas para el hombre. Aparte de tener un efecto cancerígeno, también poseen efectos inmunosupresores, mutagénicos y teratogénicos. Suelen encontrarse en productos como los cereales, principalmente en maíz, frutos secos y otras semillas. Es por eso, que la población infantil, especialmente los bebés, son un importante grupo de riesgo debido a que los cereales son su principal alimento durante los primeros meses de vida y debido a la relación de cereales consumidos con su peso corporal, hace que su vulnerabilidad a la contaminación sea mucho mayor que en adultos.

El objetivo general de este estudio es determinar las tasas de contaminación por aflatoxinas en alimentos infantiles comerciales a base de cereales y para ello se realizó una extracción de la muestra seguido de una purificación mediante columnas de inmunoafinidad (IAC) y determinación posterior mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia y derivatización fotoquímica.

El porcentaje de positividad de aflatoxinas en las muestras de cereales infantiles analizadas (n = 60) fue del 18,3%. Del total de las muestras contaminadas, un 90,9% superaron los límites máximos establecidos por la legislación para la AFB₁.

Los resultados obtenidos indican una contaminación media de aflatoxina B₁ de 137,9 ng/kg, con unas tasas de contaminación comprendidas entre 87,3 y 226,8 ng/kg. El valor medio de contaminación para la aflatoxina G₁ es de 196,3 ng/kg y se encuentra en unos rangos de 120,5 y 164,7 ng/kg. Solo 1 muestra dio resultados positivos para AFG₂ y AFB₂ con unos valores de contaminación de 114,1 y 196,2 ng/kg respectivamente.

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium* or *Fusarium* genera. These compounds could be synthesized in cereal crops during its process in due to poor agricultural practices, contaminating products at different points in the food chain. Mycotoxins studied and analyzed in this article are aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂). They are very toxic contaminants and they were classified as Group I (Carcinogenic to humans) by IARC (*International Agency for Research on Cancer*). In addition to having a carcinogenic effect, they also have immunosuppressive, mutagenic and teratogenic effects. Aflatoxins are present in products such as cereals, mainly maize, nuts and other seeds. Children population, especially infants, are an important risk group because cereals are their main food during the first months of their life and because the relationship between cereals consumed and their body weight making them more vulnerable to aflatoxin contamination.

The main objective of this study was to determine the contamination rate of aflatoxin in commercial baby food cereals. Regarding this, we did a sample extraction and purification using immunoaffinity columns (IAC) and finally was determined by in-house validated chromatographic method (*High Performance Liquid Chromatography*) with fluorescence detector and photochemical derivatization.

The percentage of positives samples with aflatoxins in the total infant cereals analyzed (n = 60) was 18,3%. Of the total contaminated samples, 90,9% exceeded the maximum established by the legislation for AFB₁.

The results indicate an average aflatoxin B₁ contamination 137.9 ng/kg, with rates of contamination between 87.3 and 226,8 ng/kg. The average value of contamination for aflatoxin G₁ is 196,3 ng/kg and the ranges of contamination are between 120.5 and 164,7 ng/kg. Only one sample tested positive for AFG₂ and AFB₂ with values of 114.1 and 196,2 ng/kg respectively.

1 Introducción

1.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por diferentes especies fúngicas de géneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Claviceps* (Erkekoğlu *et al.*, 2008). Estas toxinas son consideradas como uno de los contaminantes alimentarios más peligrosos (Abdulkadar *et al.*, 2004) debido a que pueden contaminar alimentos presentes en cualquiera de las etapas de la cadena de producción, siendo tóxicos tanto para animales como para las personas (Raiola *et al.*, 2015). Debido a la posible presencia de micotoxinas en los alimentos y la exposición a éstas a través de la dieta, se requieren métodos analíticos sensibles y selectivos para las distintas matrices de alimentos.

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que las micotoxinas afectan a una cuarta parte de los cultivos a nivel mundial, incluyendo alimentos básicos como el maíz, semillas de algodón y frutos secos (IARC, 2002b). En menor frecuencia, pueden contaminarse productos de origen animal como los huevos, la carne o la leche como consecuencia de la ingestión de los animales de piensos contaminados con micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007 y Arroyo-manzanares *et al.*, 2014).

Actualmente se conocen más de 400 micotoxinas pero, de todas ellas, las que más preocupan por su incidencia y toxicidad son las aflatoxinas (AFs), la ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), fumonisinas (FUM), toxinas T-2 y HT-2, citrinina y los alcaloides del cornezuelo. En la Tabla 1 se destacan las micotoxinas consideradas más importantes por su papel en la salud humana y animal así como por el impacto económico que implica su presencia en los piensos y alimentos (Ashiq, 2015).

La producción de micotoxinas en los cultivos agrícolas puede ocurrir en diferentes puntos de la cadena alimentaria: durante la precosecha, la cosecha, el secado y el almacenamiento.

Las condiciones ambientales y las malas prácticas agrícolas, de fabricación, de almacenamiento y de secado de granos y forrajes, promueven el crecimiento de hongos, lo que aumenta el riesgo de la producción de micotoxinas (Marin *et al.*, 2013).

Tabla 1. Clasificación de las micotoxinas más importantes mohos productores, alimentos implicados en la contaminación por micotoxinas e implicaciones sobre la salud humana (Arroyo-manzanares *et al.*, 2014).

Micotoxina	Moho productor	Alimentos	Implicaciones para la salud
AFs	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Cacahuetes, arroz, maíz, especias, higos	Carcinoma hepatocelular, lesiones hepáticas, retraso del crecimiento
OTA	<i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>P. verrucosum</i>	Vino, cerveza, frutas, uvas pasas, café, chocolates, cereales	Lesiones renales, nefropatía endémica de los Balcanes, tumores uroteliales
FUM	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. graminearum</i>	Maíz, productos de maíz, higos	Defectos del tubo neural, cáncer de esófago
ZEA	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	Trigo, maíz, cebada, sorgo, avena	Trastornos reproductivos, infertilidad, cambios puberales precoces
DON	<i>F. graminearum</i>	Cereales, productos de cereales	Vómitos, deformidades del feto, diarrea, dolor de cabeza, gastroenteritis
PAT	Especies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Byssochlamys</i> , <i>Paecilomyces</i>	Manzanas, productos derivados de manzana	Trastornos gastrointestinales y neurológicos

Por otro lado, las micotoxinas se definen generalmente como termorresistentes, y por lo tanto son capaces de permanecer estables después del procesado industrial (Juan *et al.*, 2014). Así, algunos estudios han demostrado que si bien existe un rango de temperaturas capaz de descomponerlas, éste tiene que ser elevado y se sitúa entre los 237 y los 306°C (Soriano del Castillo, 2007)

Por todo ello, las medidas de prevención de estos contaminantes deben ir dirigidas a evitar su formación tanto en el campo, como durante su procesado industrial, mediante BPA (Buenas Prácticas Agrícolas) y BPF (Buenas Prácticas de Fabricación).

Asimismo, con la finalidad de proteger la Salud Pública, la legislación de la Unión Europea establece Límites Máximos (LM) de micotoxinas en cereales y otros productos alimenticios, en el Reglamento (CE) nº 1881/2006 y posteriores modificaciones por el que se fija el contenido máximo de estos contaminantes en los productos alimenticios.

La contaminación de alimentos básicos de la dieta y piensos con micotoxinas es un problema relevante a nivel mundial. Estos compuestos se producen frecuentemente en zonas con clima cálido y húmedo que favorecen el crecimiento fúngico aunque también pueden proliferar en climas más templados.

Así, según el Informe Anual de la RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), durante el 2015 se notificaron un total de 495 alertas por micotoxinas, lo que representó un porcentaje de un 12,28% sobre el total de alertas (4.030). Más de la mitad (55,40%) de las alertas por micotoxinas, correspondieron a alertas por AFs, en alimentos como los frutos secos y las especias. El total de notificaciones por alerta de aflatoxinas en cereales y alimentos a base de cereales fue de 65.

Como puede verse en la Tabla 2, algunas de las alertas producidas en la Unión Europea más destacadas por su gran número de notificaciones procedían de países como China, Irán, Turquía o de los Estados Unidos de América (RASFF, 2015).

Tabla 2. Número de notificaciones destacadas de 2015 según el sistema de vigilancia de la Unión Europea RASFF teniendo en cuenta la combinación de peligro/alimentos/origen.

Peligro	Alimentos	Origen	Notificaciones
Aflatoxinas	Frutos secos y derivados y semillas	China	97
Aflatoxinas	Frutos secos y derivados y semillas	Irán	55
Aflatoxinas	Frutos secos y derivados y semillas	Turquía	53
Aflatoxinas	Frutas y vegetales	Turquía	48
Aflatoxinas	Frutos secos y derivados y semillas	EEUU	37
Aflatoxinas	Frutos secos y derivados y semillas	España	30

La contaminación primaria con aflatoxinas de los productos agrícolas cultivados en Europa no se ha considerado un problema durante muchos años. Generalmente las alertas notificadas por la RASFF que se producían en la UE eran aquellas que correspondían a la presencia de aflatoxinas en frutos secos procedentes de zonas donde el cambio climático era más relevante. Sin embargo, se ha reportado recientemente la aparición de los compuestos en muestras de maíz debido a la existencia de condiciones favorables para su formación tales como las altas temperaturas, sequía y fuertes daños producidos por insectos en la Unión Europea (EFSA, 2012).

1.1.1 Toxicidad

La ingesta de micotoxinas puede producir intoxicaciones agudas y crónicas que se denominan micotoxicosis. Actualmente, la incidencia de micotoxicosis agudas en Europa es baja, aunque en animales se observa un mayor número de intoxicaciones, debido a que en ocasiones, los productos deteriorados por hongos se destinan a alimentación animal (Soriano del Castillo, 2007).

Para el hombre, tiene menor incidencia pero una mayor importancia debido a sus graves efectos secundarios. La toxicidad aguda se produce cuando se ingieren grandes dosis de micotoxina a través de los alimentos. En cambio, la intoxicación crónica se produce cuando la persona se ha sometido, durante un largo periodo de tiempo, a concentraciones moderadas o bajas de micotoxinas (Barkai y Paster, 2008). De hecho, lo que más preocupa son los efectos producidos por esta exposición a largo plazo, ya que en animales de experimentación se ha podido llegar a demostrar el efecto genotóxico, mutagénico, citotóxico y teratogénico que tienen algunos de estos compuestos (Peraica y Domijan, 2001).

1.2 Aflatoxinas (AFs)

1.2.1 Clasificación y características

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por diferentes especies de hongos del género *Aspergillus*. Hasta la fecha se han identificado 18 tipos de aflatoxinas diferentes, pero por su incidencia y toxicidad las más relevantes son las aflatoxinas B₁ y B₂ (producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*), G₁ y G₂ (producidas por *Aspergillus parasiticus*) y M₁ y M₂ (metabolitos hidroxilados de las aflatoxinas B₁ y B₂ respectivamente). Éstas últimas son excretadas en la leche de animales que han consumido piensos contaminados con aflatoxinas B₁ y B₂ (Cepeda Sáez *et al.*, 2011).

La estructura molecular de las diferentes aflatoxinas puede observarse en la Figura 1.

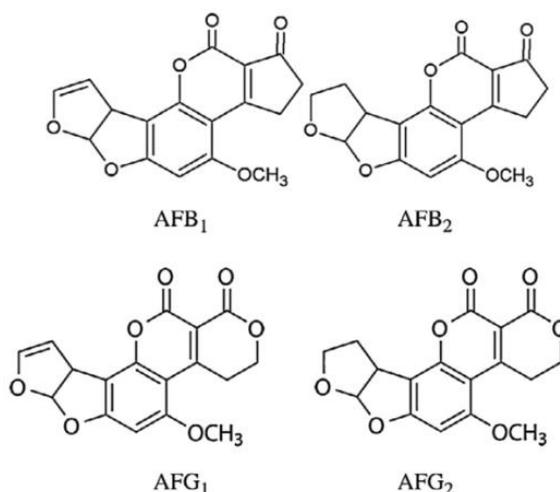


Figura 1. Estructura molecular de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (Marin *et al.*, 2013)

Sus pesos moleculares varían entre 312 y 350 g/mol. La mayoría son poco solubles en agua, por eso se extraen con disolventes orgánicos moderadamente polares, como el metanol. Las AFs purificadas, son bastante termorresistentes (sus puntos de fusión son superiores a los 250°C) y son estables en un rango de pH entre 3 y 10 (Cano-Sancho *et al.*, 2009).

La nomenclatura hace referencia a sus propiedades físico - químicas, ya que las de tipo B presentan fluorescencia azul (*Blue*) y las del tipo G fluorescencia verde (*Green*) cuando se las observa bajo luz ultravioleta a 365nm (Contreras *et al.*, 2009).

Los mohos aflatoxigénicos *A. flavus* y *A. parasiticus* predominan fundamentalmente en climas cálidos y templados. La temperatura óptima para la proliferación de *A. flavus* se encuentra entre 10 y 43°C, aunque el rango de temperaturas para la producción de micotoxinas es más pequeño (de 20 a 30°C). En cambio, para la proliferación de *A. parasiticus*, las temperaturas óptimas se encuentran entre un rango de 28 a 30°C. En ambos casos, la producción se ve favorecida por niveles altos de humedad (>15%) (Cano-Sancho *et al.*, 2009).

1.2.2 Toxicidad

Las aflatoxinas del grupo B y G son micotoxinas genotóxicas y carcinogénicas, habiendo sido clasificadas por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) dentro del Grupo 1 (Sustancias cancerígenas para el hombre) (IARC, 2012). En algunos ensayos en animales de experimentación, se ha demostrado que estos compuestos inducen la formación de tumores, principalmente, en el hígado, aunque también en otros órganos como el pulmón, riñón y colon. Además de estos efectos tóxicos también es importante destacar su potencial teratógeno e inmunosupresor (Zinedine *et al.*, 2006).

El hígado es el principal órgano afectado por la acción tóxica de las aflatoxinas. Los primeros síntomas de hepatotoxicidad son fiebre, malestar general y anorexia que pueden evolucionar hasta dolor abdominal, vómitos, hepatitis y, ocasionalmente pueden causar la muerte (Raiola *et al.*, 2015). El cáncer de hígado es uno de los 6 cánceres más diagnosticados a nivel mundial y su índice de mortalidad es elevado debido a su baja tasa de supervivencia (EFSA, 2007).

Por todo ello, la Unión Europea estableció límites máximos para aflatoxina B₁ en alimentos infantiles para lactantes a base de cereales en 0,1 µg/kg, basándose en el principio ALARA (*As Low As Reasonably Possible*) (EFSA, 2007).

Algunos estudios (Baydar *et al.*, 2007) han evaluado el riesgo de exposición a población susceptible de contaminación por aflatoxinas como son los bebés mayores de 4 meses. Estos autores establecieron, tras el consumo de 26 g de cereales por toma, una ingesta diaria estimada de este contaminante en 24,16 ng de AFB₁ por kg de peso corporal y día. En otro estudio (Blankson y Mill-Robertson, 2016) la ingesta de AFB₁ de los bebés fue de entre 0,011 hasta 0,852 µg/kg por día y peso corporal, mayor que lo de los niños de mayor edad, por su mayor consumo de alimentos en relación al peso corporal. Ambos estudios concluyeron que una continua exposición a estos contaminantes a través de estos productos puede causar graves problemas de salud a niños pequeños y bebés como crecimiento anormal, mal funcionamiento del sistema inmunitario y cáncer.

1.2.3 Presencia de aflatoxinas en alimentos

Las aflatoxinas se encuentran de forma natural en una gran variedad de productos agrícolas (IARC, 2002a). De hecho, estos compuestos pueden encontrarse en diferentes alimentos habituales de nuestra dieta como los frutos secos (almendras, avellanas, pistachos), frutas desecadas, especias y cacao. En cereales como el trigo, el arroz, o la cebada la presencia de aflatoxinas es menos frecuente pero pueden aparecer debido a los nuevos patrones de distribución de las aflatoxinas debido al cambio climático (EFSA, 2012).

Algunos estudios (Contreras *et al.*, 2009) han demostrado que los nutrientes y el tipo de sustrato son importantes para la producción de aflatoxinas. El alto contenido en carbohidratos va a favorecer la producción de aflatoxinas ya que éstos forman parte de la estructura química de estas toxinas. En este sentido se puede afirmar que el maíz, es un buen sustrato para la producción de aflatoxinas debido a su alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de nitrógeno.

La comunidad científica ha publicado en los últimos años, algunos estudios que también han investigado las tasas de contaminación por aflatoxinas en otros cereales que anteriormente no se consideraban susceptibles de esta contaminación, como el maíz, el trigo y el arroz. En la Tabla 3, se pueden observar los resultados obtenidos por diversos autores en estudios de determinación de AFs en diferentes cereales. La cebada es el cereal con un mayor porcentaje de contaminación seguido del arroz, el trigo y el maíz.

Tabla 3. Contenido en AFs en varios estudios realizados con diferentes cereales.

Autor	Materias primas para la elaboración de productos a base de cereales	Aflatoxina	Muestras positivas (%)
Abia <i>et al.</i> , 2013	Maíz	AFB ₁	30
		AFB ₂	16
		AFG ₁	22
Li <i>et al.</i> , 2014	Maíz	AFs	4,8
	Arroz	AFB ₁	9,5
Nguyen <i>et al.</i> , 2007	Arroz	AFB ₁	51
Oueslati <i>et al.</i> , 2012	Trigo	AFG ₂	11,76
	Cebada	AFG ₂	80
	Sorgo	AFB ₁ + AFG ₂	33,67
Soleimany <i>et al.</i> , 2012	Arroz	AFs	56
	Trigo	AFs	75
	Cebada	AFs	50
	Avena	AFs	40

En este sentido, es de gran preocupación para la población el hecho de que, cereales como los comentados anteriormente formen parte habitual de la composición de alimentos infantiles destinados a niños menores de 1 año, estén contaminados con algún tipo de aflatoxina.

Algunos autores han estudiado la contaminación por aflatoxinas en este tipo de productos y, como puede observarse en la Tabla 4, estudios más actuales muestran unas medias de contaminación por aflatoxinas muy superiores a las reportadas por otros autores unos años atrás. Estos resultados muestran un aumento de la susceptibilidad de estos productos a ser contaminados por aflatoxinas.

Tabla 4. Contenido en AFs en diferentes estudios realizados con cereales infantiles

Autor	Tipo de muestras analizadas (n)	Aflatoxina	Muestras positivas (%)	Media ($\mu\text{g/kg}$) $\pm\text{DE}^*$
Aidoo, 2011	Cereales con frutos secos (17)	AFs totales	1,2	19,0 \pm 0,1
	Cereales con leche, frutas y verduras (24)	AFs	1,2	70,1 \pm 0,1
Alvito <i>et al.</i> , 2010	Cereales con fruta y frutos secos (27)	AFB ₁	7	0,009
Baydar <i>et al.</i> , 2007	Cereales infantiles (25)	AFB ₁	88	0,80 \pm 0,44
Blankson y Mill-Robertson, 2016	Multicereales (8)	AFB ₁	88	4,23 \pm 0,20
Hernández y Navarro, 2010	Cereales infantiles convencionales y ecológicos (96)	AFB ₁	46	0,09 \pm 0,40
Tam <i>et al.</i> , 2006	Cereales infantiles a base de soja (30)	AFB ₁	5,65	0,08 \pm 0,11
	Cereales infantiles a base de arroz (26)	AFB ₁	4,52	0,49 \pm 0,70
	Cereales infantiles multicereales (55)	AFB ₁	0,56	0,05 \pm 0,04

*Media \pm desviación estándar de las muestras positivas

Las aflatoxinas constituyen un grave problema para la salud de las personas, especialmente para bebés y niños cuya exposición a dichos agentes es muy elevada como consecuencia del mayor consumo de alimentos en relación a su peso corporal (Juan *et al.*, 2014 y Raiola *et al.*, 2015;. Hay estudios que indican que el riesgo potencial para la salud de cualquier contaminante en los alimentos para lactantes es tres veces superior a la de los adultos (Barlow *et al.*, 1993).

La Asociación Española de Pediatría (APA) recomienda introducir los cereales infantiles a partir del cuarto mes (cereales sin gluten como arroz o maíz), siempre que pueda complementarse con leche materna. Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000), indica que la introducción de los cereales en la dieta del niño se realice alrededor de los seis meses de vida con la finalidad de cubrir las necesidades de energía y nutrientes del lactante cuando la leche materna no puede cubrir todos los requerimientos. Una correcta introducción de los alimentos permite un correcto desarrollo del niño y evita la aparición de problemas de malnutrición.

A pesar de la importancia de estos contaminantes y la susceptibilidad especial de los niños, son escasos los estudios que se han realizado para estudiar la presencia de las AFs en estos productos, es por eso, que la Organización de Consumidores y Usuarios (OCU, 2013), realizó un estudio con 15 alimentos infantiles a base de cereales, con complementos como miel o frutas, de marcas conocidas, encontrando resultados positivos en 4 de los productos analizados. Al comprobar que el 26,7% de las muestras eran positivas en AFs, la organización reclamó a la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) un aumento de los controles de calidad, un mayor número de estudios que valoren los riesgos de la adición de cacao como ingrediente en las papillas infantiles, ya que éste puede ser una gran fuente de contaminación, y exige que se establezcan límites máximos para la suma de las 4 aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) en cereales destinados al consumo infantil ya que en la actualidad sólo está legislada la AFB₁ en este tipo de alimentos.

Cabe destacar que, en la legislación vigente, sólo se ha establecido el contenido máximo para AFB₁ en 0,10 µg/kg para este tipo de alimentos. Actualmente no existen límites máximos establecidos para el contenido total de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, que sí que están legisladas en otros alimentos destinados a consumo humano.

1.2.4 Métodos de análisis de aflatoxinas en alimentos

Existen diversos métodos de análisis recomendados para la determinación de micotoxinas en alimentos. En este sentido, es importante destacar que para la detección y cuantificación de aflatoxinas existen métodos de referencia estandarizados y validados por organismos reconocidos internacionalmente como el Comité Europeo de Normalización (CEN, *European Committee for Standardization*) y la Organización Internacional de Normalización (ISO, *International Organization for Standardization*).

La mayoría de métodos analíticos para la detección y cuantificación de AFs en alimentos se basan en estas fases: toma de muestras, homogenización de cada muestra antes de tomar la porción para el análisis, extracción de los analitos de interés, purificación mediante columnas de inmunoafinidad (IAC) para eliminar restos de matriz que puedan interferir en el análisis e identificación y cuantificación de los analitos mediante técnicas instrumentales.

Las técnicas cuantitativas más utilizadas actualmente son las cromatográficas, como la cromatografía líquida (LC) acoplada a detectores de masas (MS) o de fluorescencia (FLD) con o sin derivatización pre y post-columna.

Asimismo, se suelen utilizar técnicas inmunoquímicas de cribado como ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) y tiras de inmunocromatografía o de flujo lateral. Estas técnicas se caracterizan por ser rápidas, simples y con alta especificidad y sensibilidad (Pereira *et al.*, 2014).

En la actualidad, el uso de las columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a un detector de fluorescencia se considera una técnica fiable para la detección y cuantificación de AFs en diferentes matrices alimentarias y es una de las más usadas (Mushtaq *et al.*, 2012).

2 Justificación y objetivos

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos de la especie *Aspergillus* y se caracterizan por tener una alta toxicidad, debido, entre otros efectos, a su conocida actividad carcinogénica.

Pueden encontrarse en diferentes productos, entre ellos los alimentos infantiles elaborados a base de cereales, alimento principal en la dieta de los más pequeños (alimento básico durante la introducción del bebé a la dieta sólida).

La población infantil tiene una mayor susceptibilidad, en comparación con los adultos, a padecer los efectos adversos provocados por el consumo de alimentos contaminados debido a la cantidad de comida consumida en relación a su peso corporal, estando la población infantil, más expuesta a los compuestos tóxicos. Aun así, la legislación vigente sólo aplica límites máximos para una aflatoxina (AFB₁) en este tipo de productos.

Por todo ello, en este trabajo se plantea llevar a cabo una evaluación de las tasas de contaminación por micotoxinas en alimentos infantiles comerciales a base de cereales. Para ello se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Optimizar un método analítico para el análisis de aflatoxinas en muestras de cereales infantiles, basado en la extracción con disolventes orgánicos, purificación por columna de inmunoafinidad y determinación con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detectores de fluorescencia (FLD) y fotoquímico (PHRED).
- Estudiar las tasas de contaminación con aflatoxinas totales (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) en alimentos infantiles a base de cereales para niños inferiores a 1 año.
- Identificar el origen de la contaminación investigando la formulación de alimentos infantiles compuesta a partir de diferentes cereales

3 Material y métodos

3.1 Muestras

El estudio se ha llevado a cabo con muestras de cereales infantiles destinadas a la alimentación de los niños entre los 4 y los 12 meses de edad. Se analizaron un total de 60 muestras de cereales infantiles, procedentes tanto de cultivo ecológico (n=23) como convencional (n=37) que se adquirieron en farmacias, supermercados y tiendas ecológicas de las Comunidades Autónomas de Aragón y Cantabria, durante los meses de marzo a abril de 2016. Todas ellas se almacenaron en un lugar fresco y seco antes de ser analizadas.

La composición de las mismas consistía en una mezcla de cereales como el trigo, el maíz, la avena y el arroz entre otros, con o sin adición de otros ingredientes. Así, según su composición las muestras se clasificaron en productos denominados “Monocereales” (n=13), “Bicereales” (n=16) y “Multicereales (n=31) (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación del total de muestras analizadas (n).

	Convencionales (37)	Ecológicos (23)
Monocereales (13)	3	10
Arroz (10)	3	7
Trigo (1)	0	1
Espelta (1)	0	1
Avena (1)	0	1
Bicereales (16)	7	9
Arroz + Otros (14)	6	8
Trigo + Otros (2)	1	1
Multicereales (31)	27	4
3 cereales (3)	1	2
5 cereales (4)	3	1
> 5 cereales (24)	23	1

La mayoría de los productos analizados constituidos por un único tipo de cereal se elaboraron en su mayoría con arroz (10/13) como ingrediente único. También se analizaron, pero en menor número, productos con formulaciones con espelta (n=1) avena (n=1) y trigo (n=1). La mayoría de los productos adquiridos constituidos por un único tipo de cereal, fueron de tipo ecológico (n=10).

La mitad de los productos analizados elaborados con dos tipos de cereales estaban elaborados con arroz y maíz (8/16) y se analizó un menor número de productos a base de mezclas de cereales de arroz con otro tipo de cereales como la quinoa (n=3), el mijo (n=1), la avena (n=1), o el trigo sarraceno (n=1). También se incluyeron en este tipo de producto mezclas de trigo con maíz (n=1) o con avena (n=1). En cuanto al establecimiento de origen, la mayoría correspondían al igual que en el caso anterior a marcas procedentes de agricultura ecológica (n=9).

El mayor número de muestras de alimentos infantiles analizadas correspondía a papillas multicereales (31/60). Es importante destacar que el mayor porcentaje de éstas correspondía a alimentos infantiles compuestos por más de 5 cereales (n=24). En menor proporción se encontraban productos con una formulación de 3 o 5 cereales (n=3 y 4, respectivamente). La mayoría de estos productos fueron adquiridos en supermercados y farmacias (n=27) y el resto en establecimientos dedicados a la venta de productos ecológicos.

En relación a su formulación, puede destacarse que más de la mitad de los cereales infantiles estaba compuesto únicamente por cereales. En cambio, el resto de productos (29/60) tenían ingredientes complementarios, como la miel (n=9), las galletas (n=4), el cacao (n=5), fruta (n=7), y otros como el yogur (n=1), algas (n=2) o frutos secos (n=1).

3.2 Material

El material utilizado para llevar a cabo los análisis fue el siguiente:

- Material de laboratorio estándar
 - Material de vidrio: Viales de color ámbar de 4 mL, embudos, pipetas de vidrio de 10 mL, 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.
- Papel de filtro Whatman nº1 (Symta, Madrid, España)
- Columnas de inmunoafinidad AflaTest WB SR (Vicom, Milford, Massachusetts, EEUU)
- Micropipetas de volumen variable (10-100 µL y 100 - 1000 µL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU)
- Microjeringa de vidrio de 250 µL SGE para HPLC (Symta, Madrid, España)

3.3 Equipos

Para la realización del análisis de micotoxinas en los alimentos infantiles adquiridos se utilizaron los siguientes equipos:

- Balanza analítica monoplato (Sartorius, Goettingen, Alemania)
- Baño de ultrasonidos Branson 3510 (Selecta, Barcelona, España)
- Bomba de vacío XX5522050 (de 0 a 100 kPa) (Millipore, Massachusetts, EEUU)
- Concentrador de muestras SBHCONC/1 bajo corriente de nitrógeno (Stuart Equipment, Stone, Staffordshire, UK)
- Congelador Templow -20°C (Selecta, Barcelona, España)
- Rotatubos TK3S (Techno Kartell, Noviglio, Milán, Italia)
- Cromatógrafo de líquidos HPLC Serie 1100 (Agilent Technologies, Minneapolis, MN; EEUU) equipado con:

- Bomba binaria isocrática con inyector manual,
- Detector de fluorescencia (FLD, *fluorescence detector*)
- Derivatizador fotoquímico (PHRED, *photochemical reactor for enhanced detection*)
- Sistema de bombeo binario
- Horno de columna
- Columna cromatográfica de fase reversa octadecil RP C18 pK5 de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5µm de tamaño de partícula (Symta, Madrid, España).

3.4 Reactivos

Para la realización del análisis de micotoxinas en los alimentos infantiles adquiridos se utilizaron los siguientes reactivos:

- Acetonitrilo (CH₃CN) grado HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU)
- Agua desionizada calidad milli-Q. Resistividad 18,2 mΩ/cm (Millipore, Milford, Massachusetts, EEUU)
- Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Tampón fosfato buffer salino en polvo (PBS) para la preparación de la disolución salina con 1 litro de agua mili-Q a pH 7,4 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Gas Nitrógeno (N₂) C55 (Carbueros Metálicos, Barcelona, España)
- Metanol (CH₃OH) grado HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU)
- Metanol de grado HPLC (CH₃OH) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU)
- Patrón mix de aflatoxinas (Patrón commercial) con concentraciones de 1 µg/mL de AFB₁ y AFG₁ y de 0,3 µg/mL de AFB₂ y AFG₂ en metanol (Pureza 99,5%) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania).

3.4.1 Preparación y mantenimiento de los patrones de calibración

Cada día de trabajo se ha realizado una recta de calibrado de los compuestos a determinar, siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE-EN 15851: “Determinación de aflatoxina B₁ en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método por HPLC con purificación en columna de inmunoafinidad y detección por fluorescencia”.

Para la elaboración de las rectas de calibrado se partió de la solución patrón de aflatoxinas a partir de la cual se elaboró una solución intermedia de concentración 10 ng/mL de B₁ y G₁ y 3 ng/mL de B₂ y G₂ en MeOH. A partir de esta solución intermedia, se prepararon el resto de soluciones patrón de calibración en la fase móvil de elección (Agua:Metanol:Acetonitrilo en una proporción de 50:40:10). Las concentraciones utilizadas para las rectas de calibración fueron: 80, 90, 100 y 150 pg/mL para B₁ y G₁ y 24, 27, 30 y 45 pg/mL para B₂ y G₂.

El patrón comercial y las soluciones intermedias preparadas a partir de éste, se mantuvieron en viales ámbar en congelación a -20°C, garantizando así su estabilidad a largo plazo. Las soluciones de calibración se mantuvieron en viales ámbar en refrigeración (8°C). Antes de su uso, patrones y soluciones se atemperaron a temperatura ambiente.

3.5 Método analítico para la determinación de aflatoxinas en alimentos infantiles

Para la determinación de aflatoxinas en productos elaborados a base de cereales para bebés y niños, nos basamos en la norma UNE-EN 15851:2010: “Determinación de aflatoxina B₁ en alimentos a base de cereales para bebés y niños”. Esta metodología consiste en una extracción de las aflatoxinas presentes en las muestras por agitación en rotatubos con una disolución metanólica, seguido de una filtración y purificación del extracto orgánico obtenido mediante columnas de inmunoafinidad y determinación final de las toxinas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (FLD) previa derivatización fotoquímica postcolumna (PHRED).

A partir del método descrito en la norma, se realizaron una serie de modificaciones con la finalidad de incrementar la sensibilidad de la técnica, ya que las concentraciones de AFs que pueden estar presentes en este tipo de matrices suelen ser bajas.

3.5.1 Optimización del método analítico

Etapas de extracción

En primer lugar y teniendo en cuenta lo descrito en otros trabajos (Ariño *et al.*, 2009 y Mushtaq *et al.*, 2012) se hicieron ensayos en los que se optimizaron algunos parámetros de la etapa de extracción como el tamaño de muestra de partida, el volumen de los disolventes los cuales se miniaturizaron y el tiempo de agitación empleados para la extracción de los analitos.

Tanto la cantidad de las muestras como el volumen de reactivos utilizados en la etapa de extracción fue miniaturizada una décima parte con la finalidad de reducir la cantidad, tanto de muestra como de los disolventes, utilizada. Así, el peso total de muestra analizada fue de 5g, los cuales se mezclaron con 20 mL de MeOH al 80%. Las mismas proporciones se utilizaron en otros artículos (Ariño *et al.*, 2009).

Con la finalidad de reducir el tiempo de análisis, se sustituyó la agitación manual y con agitador durante más de 30 minutos por una agitación por rotatubos, mucho más intenso y, por lo tanto, con una reducción del tiempo hasta los 3 minutos.

Optimización de las condiciones del HPLC

Además, con la finalidad de conseguir una máxima resolución de los picos cromatográficos y una mejora de la sensibilidad, se modificaron algunos parámetros del análisis cromatográfico.

Elección de la fase móvil y definición de los tiempos de retención

En primer lugar se prepararon diferentes fases móviles con proporciones variables de H₂O: ACN: MeOH (60:15:30; 60:20:20 y 50:10:40) tal y como se describe en los estudios de Amin *et al.* (2010), Aidoo (2011) y Blankson y Mill-Robertson (2016). Éstas se utilizaron para inyectar un mismo patrón de 500 pg/mL para AFG₁ y AFB₁ y de 150 pg/mL para AFG₂ y AFB₂. A continuación se valoró la separación de los picos para cada una de las 4 aflatoxinas estudiadas.

Longitudes de onda de excitación y de emisión

Otro parámetro evaluado fue las diferentes longitudes de onda tanto de excitación (λ_{ex}) como de emisión (λ_{em}) teniendo en cuenta la bibliografía consultada (Alvito *et al.*, 2010, Kabak, 2012 y G. Cano-Sancho *et al.*, 2013). Para ello, se inyectó un mismo patrón de 500 pg/mL para AFG₁ y AFB₁ y de 150 pg/mL para AFG₂ y AFB₂ y se analizó la intensidad los picos combinando dos longitudes de onda de excitación de 360 y 365 nm con diferentes valores de longitudes de onda de emisión: 435, 440, 442, 460 y 465 nm.

Temperatura de la columna

Por último se evaluó la temperatura del horno de columna del HPLC. A partir del resultado obtenido utilizando la temperatura descrita en la norma (25°C), se decidió variar ésta para mejorar la separación de los picos cromatográficos. Teniendo en cuenta la literatura científica (Afsah-Hejri *et al.*, 2011) las temperaturas estudiadas (30, 40 y 50°C) se fijaron por encima de la temperatura ambiente recomendada por Zhang *et al.* (2014).

3.5.2 Método analítico

Una vez puesta a punto la metodología de extracción, purificación y determinación de aflatoxinas en alimentos infantiles, se procedió al análisis de las muestras de acuerdo a las siguientes etapas:

Extracción

Tras la homogeneización de las muestras de alimentos infantiles, se pesaron 5 g en tubos de centrifuga. Posteriormente se añadieron 0,5 g de cloruro sódico y 20 mL de una mezcla de metanol:agua (80:20). Seguidamente se agitó intensamente el tubo mediante un rotatubos durante 1 minuto, para favorecer la extracción de las aflatoxinas de la matriz. La disolución se filtró a través de un papel de filtro (Whatman 1) y, con una pipeta de vidrio, se recogieron 4 mL del filtrado que, se mezclaron con 16 mL de PBS y posteriormente se sometieron a una etapa de purificación.

Purificación

La purificación se llevó a cabo usando columnas de inmunoafinidad específicas para las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, que se acondicionaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se pasaron 20 mL del extracto filtrado a una velocidad de flujo de 1 gota/segundo con la ayuda de una jeringuilla de 20 mL ejerciendo presión positiva sobre la columna. A continuación, se lavó la columna con 10 mL de agua mili Q para eliminar las posibles interferencias que puedan afectar al análisis y, posteriormente, se llevó a cabo la elución de las aflatoxinas con 1 mL de metanol que se recoge en un vial ámbar para posteriormente llevarlo a evaporar bajo corriente de N₂ en un bloque calefactor a 50°C. Previamente, al análisis cromatográfico, el eluato obtenido se reconstituyó en 250 µL de fase móvil, de los cuales se inyectaron 100 µL en el cromatógrafo de líquidos.

Determinación con HPLC

Para la determinación cuantitativa de las aflatoxinas, se llevaron a cabo los análisis mediante el sistema HPLC compuesto por una fase móvil a base de H₂O: ACN: MeOH en unas proporciones de 50:10:40, que discurría por la columna cromatográfica (fase estacionaria), dispuesta en un horno termostático a una velocidad de flujo de 0,7 mL/min. El volumen inyectado fue de 100 µL. Las aflatoxinas fueron detectadas mediante un derivatizador fotoquímico postcolumna (PHRED) y un detector de fluorescencia (FLD).

3.6 Control de calidad analítica de los resultados

Con la finalidad de garantizar la calidad analítica de los resultados obtenidos durante el estudio, se han analizado los siguientes parámetros de validación del método: especificidad, precisión, veracidad, linealidad y los límites de detección y cuantificación.

3.6.1 Especificidad

La especificidad se determinó con la finalidad de verificar que ninguna interferencia coincide en la región de elución de los analitos de interés, además de comprobar que no existen solapamientos en los picos y que la cuantificación sea correcta. Por ello, se inyectaron muestras blanco de proceso (realizando todo el proceso de extracción sin utilizar muestra), para comprobar que durante el mismo no se genera ninguna interferencia. Del mismo modo, se analizó una muestra blanco (con concentración de analito por debajo del límite de detección) de cereales infantiles, la cual también fue utilizada para la enriquecer con aflatoxinas a diferentes concentraciones.

3.6.2 Precisión de la inyección

Con la precisión de la inyección pudimos observar las posibles fluctuaciones debido a las bombas y detectores durante un mismo día, así como el efecto de las condiciones ambientales, midiendo como éstos influyen en los tiempos de retención de los analitos y a las áreas para el patrón inyectado.

La precisión se determinó mediante el estudio de la repetibilidad, inyectando 10 veces un patrón de 100 pg/mL (para AFB₁ y AFG₁) y 30 pg/mL (para AFB₂ y AFG₂) bajo las mismas condiciones analíticas. Con los resultados obtenidos se calcularon los coeficientes de variación para el tiempo y las áreas de cada micotoxina analizada.

3.6.3 Veracidad

La veracidad se calculó en términos de recuperación. Debido a que no se dispone de Material Certificado de Referencia (MRC), es decir, material que tiene certificados uno o varios de sus valores o una o más de sus propiedades, por procedimientos técnicamente válidos llevados a cabo por un organismo competente, se utilizaron muestras blanco de la matriz estudiada, enriquecida a diferentes concentraciones de analito. Según el Reglamento (CE) n° 401/2006, una muestra blanco se define como una muestra exenta de micotoxinas y que se utiliza, por ejemplo, para determinaciones previas de un método de confirmación de precisión. Después de identificar la muestra blanco, ésta se enriqueció a 2 concentraciones diferentes (500 y 80 ng/kg para AFB₁ y AFG₁ y 150 y 24 ng/kg para AFB₂ y AFG₂) y se calculó la recuperación. Estas concentraciones fueron elegidas teniendo en cuenta valores de enriquecimiento que estuvieran por encima y por debajo del valor máximo permitido para AFB₁ en cereales infantiles (100 ng/kg).

La recuperación se define como el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico. Este factor se determina durante la validación si no se dispone de material certificado de referencia. Mediante los resultados obtenidos en las muestras enriquecidas y con las ecuaciones de la recta de calibración, se obtuvieron los porcentajes de recuperación para cada nivel de enriquecimiento y se compararon con los establecidos en la legislación, para el análisis de estos contaminantes (Reglamento (CE) n° 401/2006).

3.6.4 Linealidad

Este parámetro se define como la capacidad de un método de dar una respuesta proporcional a la cantidad del analito que se va a determinar. 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 $R^2 > 0,99$ en cada una de las rectas de calibrado elaboradas diariamente.

3.6.5 Sensibilidad del método

Para el estudio de la sensibilidad del método, se determinaron los valores de límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC). Hay que señalar, que en este estudio se consideraron muestras positivas a aflatoxinas aquellas que presentaron niveles de contaminación por alguna de las aflatoxinas estudiadas, en cantidades que estuvieran por encima del límite de cuantificación.

Para ello se enriqueció una muestra blanco a distintas concentraciones en sentido decreciente hasta que la señal pudiera distinguirse del ruido de fondo.

El LD se fijó en la mínima concentración del analito presente en las muestras, con una relación señal/ruido (S/N) de 3. Por otra parte, el LC se define como la menor cantidad de analito presente en las muestras con una relación señal/ruido de 10. Otros autores como Alvito *et al.* (2010) y Juan *et al.* (2014) también obtuvieron sus límites de detección y cuantificación mediante este procedimiento.

3.7 Análisis estadístico

Los resultados de los análisis de aflatoxinas obtenidos mediante HPLC fueron sometidos a un análisis estadístico descriptivo y comparativo. La presencia de muestras positivas (% positivos) se expresó como el porcentaje de muestras que tenían valores por encima de los límites de cuantificación. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza (ANOVA) (PSPP, Versión 0.10.1) para establecer diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas mediante el valor-F ($p < 0,05$).

4 Resultados y discusión

4.1 Optimización de las condiciones del HPLC del método analítico de determinación de aflatoxinas en alimentos infantiles

Para comprobar los tiempos de retención correspondientes a cada uno de los picos de las diferentes aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 y G_2) se inyectó al comienzo de la optimización del método, el patrón de 100 pg/mL para AFG₁ y AFB₁ y de 30 pg/mL para AFG₂ y AFB₂.

4.1.1 Elección de la fase móvil y definición de los tiempos de retención

Con el fin de obtener una adecuada resolución de los picos, se partió de la inyección de un patrón de aflatoxina B_1 y G_1 de 500 pg/mL y de 150 pg/mL para AFG₂ y AFB₂ en distintas fases móviles. La fase móvil con la proporción de H₂O: ACN: MeOH de 60:15:30 (Figura 2) presentó un solapamiento de los picos cromatográficos que no permitía identificar correctamente los analitos objeto de estudio. Al aumentar la cantidad de acetonitrilo y reducir la de metanol (60:20:20) se pudieron observar los 4 picos (Figura 3) correspondientes a cada una de las aflatoxinas, aunque los picos AFG₁ y AFB₂ no quedaban totalmente separados, por lo que dificultaba una correcta cuantificación. Por último, en la fase móvil de elección (50:10:40) se disminuyó la proporción de agua y acetonitrilo, aumentándose la proporción de MeOH, con lo que se consiguió la máxima resolución de los picos y un óptimo resultado cromatográfico, con ausencia de interferencias en la región de interés del analito (Figura 4).

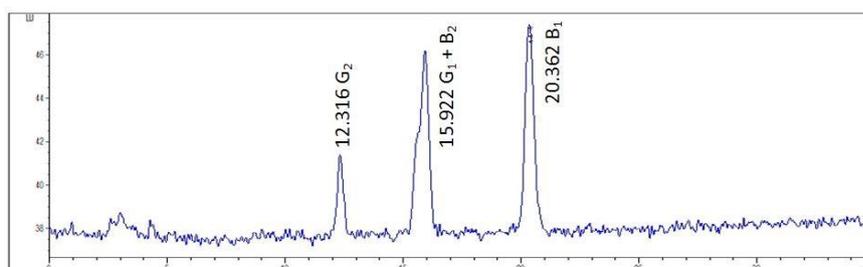


Figura 2. Cromatograma de aflatoxinas obtenido con la fase móvil H₂O: ACN: MeOH (60:15:30)

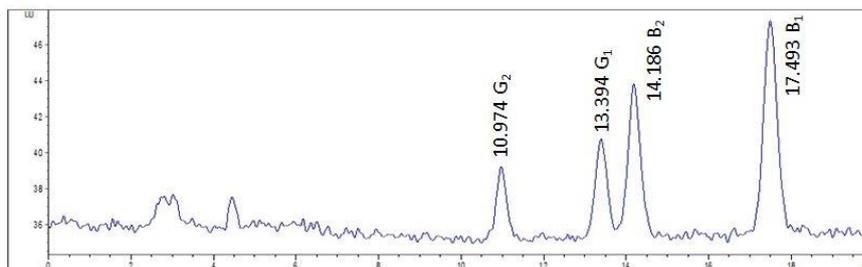


Figura 3. Cromatograma de aflatoxinas obtenido con la fase móvil H₂O: ACN: MeOH (60:20:20)

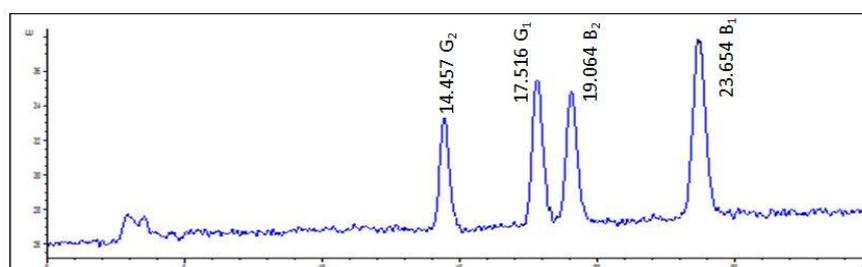


Figura 4. Cromatograma de aflatoxinas obtenido con la fase móvil de elección H₂O: ACN: MeOH (50:10:40)

En los cromatogramas obtenidos con la fase móvil optimizada, pudimos ver los picos de las cuatro aflatoxinas con sus tiempos de retención fijados. El orden de elución de los picos fue G₂, G₁, B₂ y B₁, y los tiempos de retención 11,537; 13,389; 14,299 y 16,803 minutos respectivamente tal y como se observa en la Figura 5.

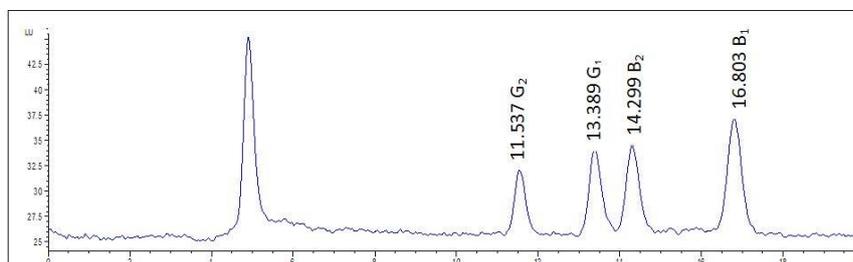


Figura 5. Tiempos de retención para las 4 aflatoxinas (AFG₂, AFG₁, AFB₂ y AFB₁) utilizando la fase móvil H₂O: ACN: MeOH (50:10:40).

4.1.2 Longitudes de onda de excitación y de emisión

A continuación se realizaron inyecciones del patrón de 500 pg/mL para AFG₁ y AFB₁ y de 150 pg/mL para AFG₂ y AFB₁ y se representaron los cromatogramas con las diferentes longitudes de onda de excitación y emisión ensayadas.

Se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y de emisión que nos proporcionaran un área de pico mayor para cada una de las aflatoxinas estudiadas. Así, se fijó una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm valores que coinciden con lo descrito por otros autores (Alvito *et al.*, 2010; Ariño *et al.*, 2009 y G. Cano-Sancho *et al.*, 2013).

A continuación se muestra un cromatograma con unos valores de longitudes de onda descartados (Figura 6) y un cromatograma con las longitudes de onda seleccionadas (Figura 7):

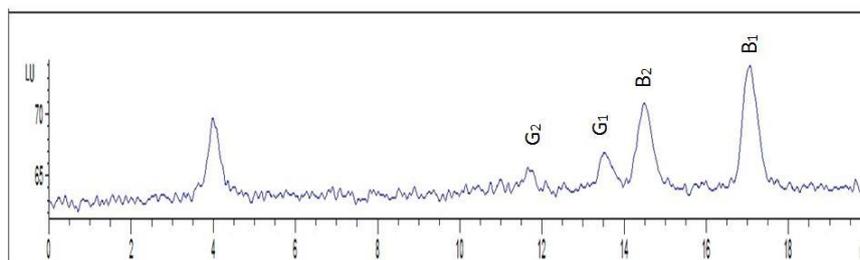


Figura 6. Cromatograma de las aflatoxinas analizadas con una λ_{ex} de 360 nm y una λ_{em} de 420 nm

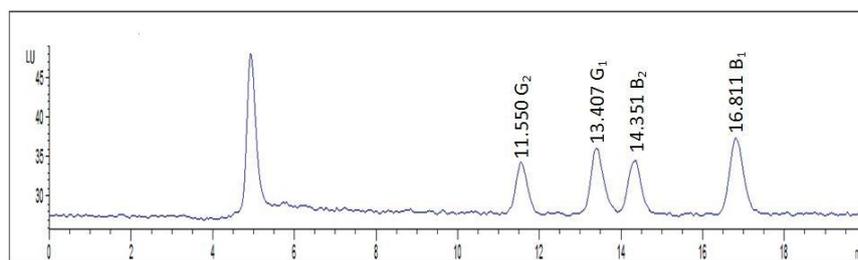


Figura 7. Cromatograma de las aflatoxinas analizadas con una λ_{ex} 365 nm y una λ_{em} de 455 nm

4.1.3 Temperatura de la columna

Una vez se optimizó la fase móvil y se eligieron las longitudes de onda que nos permitían obtener unos mejores resultados cromatográficos, se realizaron modificaciones en la temperatura de la columna del HPLC ya que, al inyectar un patrón de 100 pg/mL (para AFB₁ y AFG₁) y 30 pg/mL (para AFB₂ y AFG₂) a temperatura ambiente (25°C), tal y como lo especifica la norma, se observó una mala separación entre dos picos (AFG₁ y AFB₂) dificultando así la correcta cuantificación (Figura 8).

A continuación se probaron otras temperaturas (30, 40 y 50°C) hasta que se observó un cromatograma con una mejor separación de los picos a una temperatura de 50°C (Figura 9).

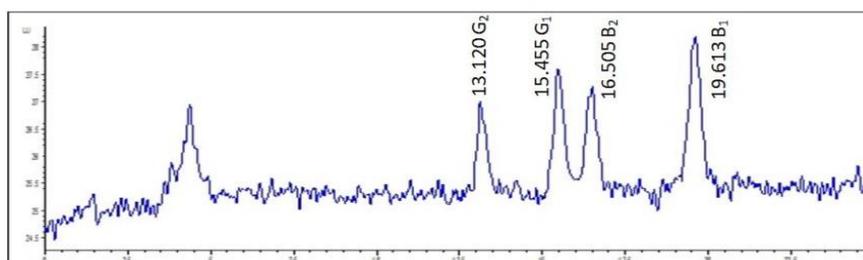


Figura 8. Cromatograma de muestra enriquecida a 100 pg/mL (AFB₁ y AFG₁) y 30 pg/mL (AFB₂ y AFG₂) y a una temperatura de la columna del HPLC de 25°C

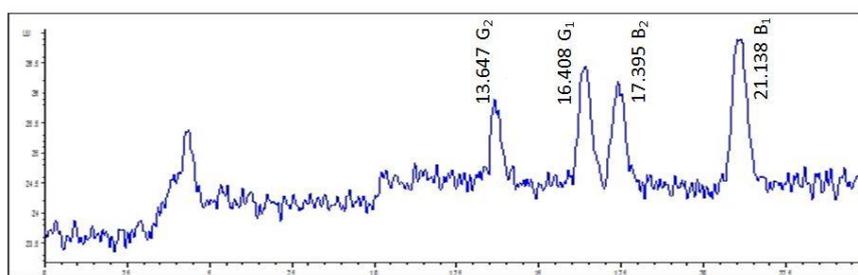


Figura 9. Cromatograma de muestra enriquecida a 100 pg/mL (AFB₁ y AFG₁) y 30 pg/mL (AFB₂ y AFG₂) y a una temperatura de la columna del HPLC de 50°C

4.2 Control de calidad analítica de los resultados

Una vez optimizado el método se estudiaron los siguientes parámetros que demostraron que los resultados analíticos son fiables y reproducibles y que el método se ajusta al propósito para el cual fue desarrollado

4.2.1 Especificidad

Como puede observarse en el cromatograma de blanco de proceso (Figura 10) y en el cromatograma de una muestra blanco (Figura 11). Se observó que tanto los disolventes de extracción y purificación como la fase móvil, no aportaban ninguna interferencia al cromatograma en los tiempos de retención de las aflatoxinas estudiadas.

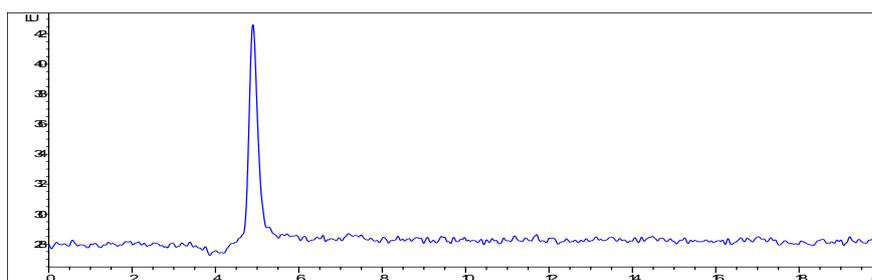


Figura 10. Cromatograma del blanco de proceso

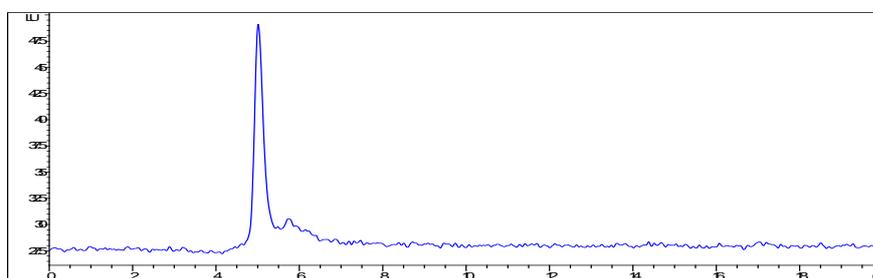


Figura 11. Cromatograma del blanco de muestra

4.2.2 Precisión de la inyección

Para evaluar la precisión de la inyección se calcularon los coeficientes de variación de 10 inyecciones en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Tabla 6, indicaron una buena precisión con unos coeficientes de variación inferiores al 5% en todos los casos.

Tabla 6. Coeficientes de variación para los tiempos de retención y las áreas de los picos para cada aflatoxina

	AFG₂	AFG₁	AFB₂	AFB₁
Tiempo de retención (%)	1,5	1,4	1,5	1,6
Área de pico (%)	3,2	2,1	3,9	4,2

4.2.3 Veracidad

En la Tabla 7 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos en cada uno de los casos. Estos valores se encuentran dentro del rango fijado (50,0 – 120,0%) en el Reglamento (CE) nº 401/2006, demostrando así que la veracidad del método analítico cumple con los criterios establecidos por la legislación.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación de cada AF en 3 niveles diferentes de concentración

	AFG₂ (%)	AFG₁ (%)	AFB₂ (%)	AFB₁ (%)
E1	78,7	83,0	110,8	81,8
E2	90,4	117,4	88,7	79,0

E1: 500 ng/kg para AFG₁ y AFB₁ y 150 ng/kg para AFG₂ y AFB₂; E2: 80 ng/kg para AFG₁ y AFB₁ y 24 ng/kg para AFG₂ y AFB₂.

4.2.4 Linealidad

Los resultados del análisis de las rectas de calibrado para cada una de las aflatoxinas estudiadas, mostraron unos valores medios de R² superiores a 0,99 (Tabla 8), demostrando así la linealidad de las rectas de calibración.

Tabla 8. Valores de R^2 de las curvas patrón de AFG₂, AFG₁, AFB₂ y AFB₁.

	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁
R^2	0,996	0,992	0,999	0,994

En las Figuras 12 a 15 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 1 para las micotoxinas, se expresaron los resultados analíticos en ng/kg. Como puede observarse, la linealidad viene representada en un gráfico con la recta de regresión con la fórmula del gráfico, la cual se utiliza para conocer la concentración del analito, y con el valor de R^2 para cada aflatoxina.

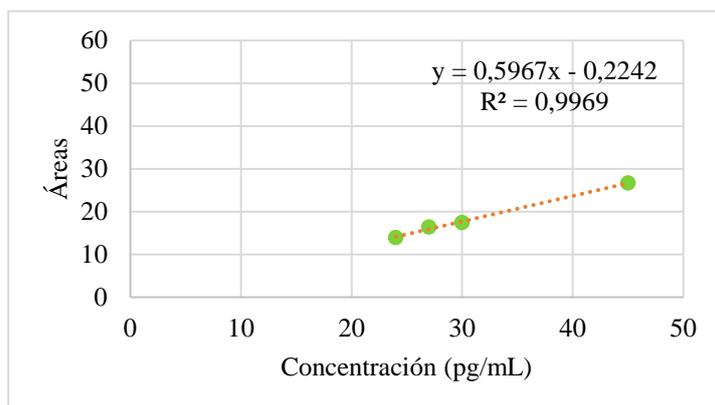


Figura 12. Recta de calibración para AFG₂

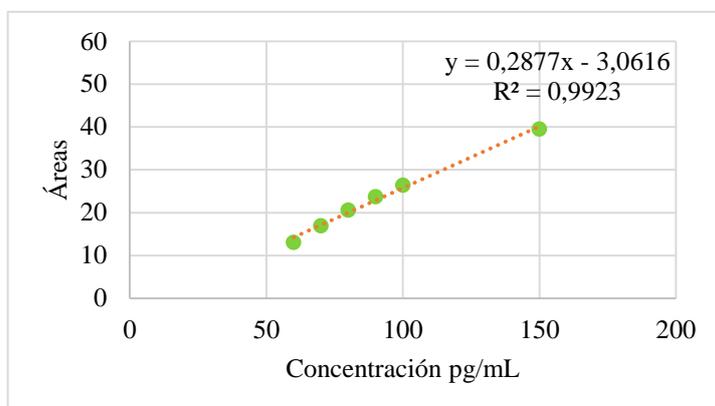


Figura 13. Recta de calibración para AFG₁

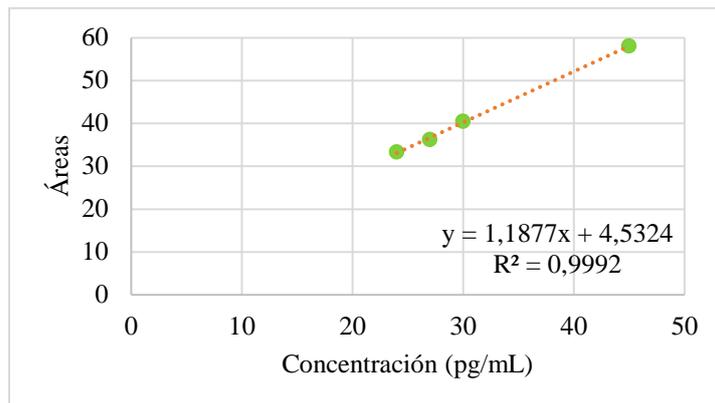


Figura 14. Recta de calibración para AFB₂

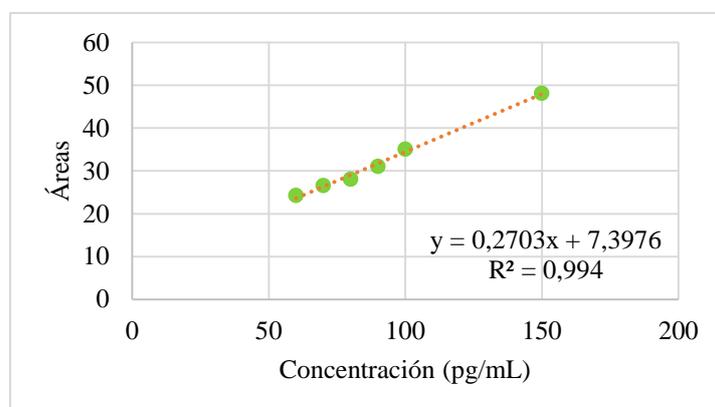


Figura 15. Recta de calibración para AFB₁

4.2.5 Sensibilidad del método

Se calcularon los límites de detección y de cuantificación para cada una de las 4 aflatoxinas, obteniéndose unos límites de detección de 50 ng/kg para AFG₁, y 24 ng/kg para AFG₂, AFB₂ y AFB₁ y un límite de cuantificación de 83 ng/kg para las 4 aflatoxinas.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores (Tabla 9) podemos concluir que nuestro equipo tiene una gran sensibilidad para detectar aflatoxinas, ya que los límites de detección son mucho más bajos que los obtenidos por Blankson y Mill-Robertson (2016). Sin embargo, hay estudios que fijan límites de detección y cuantificación aún más bajos (Hernández y Navarro, 2010 y Cano-Sancho *et al.*, 2013;), aumentando así, la sensibilidad de detección y cuantificación de su método.

Tabla 9. Límites de detección y cuantificación obtenidos por otros autores

	AFs	(Blankson y Mill-Robertson, 2016)	(Cano-Sancho <i>et al.</i> , 2013)	(Hernández y Navarro, 2010)
LD (ng/kg)	AFG ₂	100	8	2
	AFG ₁	100	33	2
	AFB ₂	100	8	2
	AFB ₁	100	33	3
LC (ng/kg)	AFG ₂	500	25	10
	AFG ₁	500	100	11
	AFB ₂	500	25	9
	AFB ₁	500	100	12

4.3 Análisis de aflatoxinas en las muestras totales

Una vez optimizada y validada la metodología para determinar aflatoxinas en muestras de cereales infantiles, se procedió al análisis de las muestras recibidas. Para ello, se sometieron al proceso completo de extracción, purificación y determinación cromatográfica optimizado. Así, se obtuvieron los cromatogramas de todas las muestras analizadas, identificándose los picos de las aflatoxinas presentes en ellas por comparación de sus tiempos de retención con los de las soluciones patrón de calibración inyectadas en el mismo día. Finalmente, tras la cuantificación de los analitos mediante el método del patrón externo y tras aplicar el factor de multiplicación de la técnica de 1, se determinaron las tasas de contaminación de aflatoxinas en las muestras (ng/kg). En la Figura 16, puede observarse un cromatograma de una muestra en la que se encontraron las aflatoxinas objeto de interés.

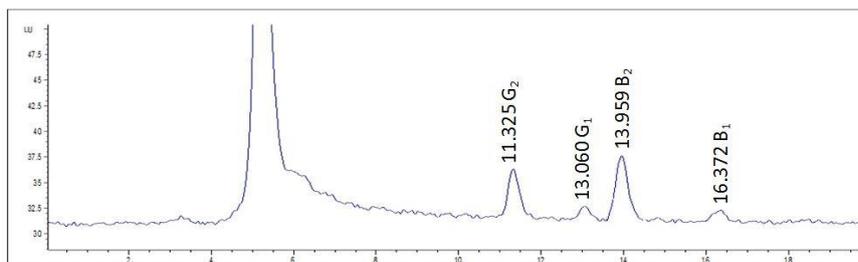
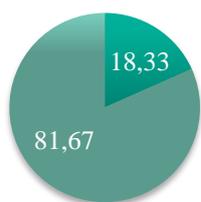


Figura 16. Cromatograma de una muestra positiva (MCI 27)

Se analizaron un total de 60 muestras de cereales infantiles en las que se evaluó la presencia de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. En total se obtuvieron 18,3% muestras positivas, es decir, contaminadas por algunas de las 4 aflatoxinas. El 81,6% restante fueron muestras donde no se identificó el analito de interés o se detectó en concentraciones por debajo de los límites de cuantificación (Figura 17).



■ Positivas ■ Negativas

Figura 17. Porcentaje de muestras de cereales infantiles positivas sobre el total de muestras

De una forma más detallada, en la Tabla 10 se muestran los resultados de las muestras de cereales infantiles contaminadas con aflatoxinas y la composición de cada una de ellas. El 90,9% de las muestras positivas, correspondían a una contaminación de AFB₁ mientras que en un 54,5% de las muestras contaminadas se detectó contaminación por AFG₁. Estas fueron las dos aflatoxinas con una mayor incidencia en las muestras analizadas. Las AFG₂ Y AFB₂ se encontraron presentes en una sola muestra, representando un total de un 9,0% sobre el total de muestras contaminadas con alguna aflatoxina.

Tabla 10. Contenido en AFs (ng/kg) en las muestras positivas

Muestra	Composición	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁
MCI 5	Arroz	nd	146,4	nd	101,1
MCI 13	Trigo, maíz, cacao, galleta	nd	nd	nd	226,8
MCI 23	Arroz ¹ , avena ¹ , cebada ¹ , centeno ¹ , mijo, trigo ¹ , miel	nd	nd	nd	181,2
MCI 27	Arroz, quinoa, frutas	114,1	120,4	196,2	nd
MCI 32	Arroz ¹ , maíz	nd	136,0	nd	200,8
MCI 33	Trigo ¹ , arroz ¹ , cebada, centeno, maíz, mijo, sorgo, avena	nd	164,7	nd	101,1
MCI 35	Trigo, arroz, avena, cebada, centeno, cacao	nd	149,6	nd	139,6
MCI 36	Trigo, arroz, maíz, avena, cebada, centeno, sorgo, mijo, miel	nd	127,6	nd	110,0
MCI 37	Trigo, Maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo, mijo, cacao	nd	nd	nd	104,4
MCI 42	Arroz hidrolizada de arroz	nd	nd	nd	87,3
MCI 43	Trigo ¹ , arroz, avena, maíz, cebada, centeno	nd	nd	nd	126,4
Rango concentración		nd - 114,1	nd - 164,7	nd - 196,2	nd - 226,8
% Positivas		9,0	54,5	9,0	90,9

nd: No Detectado o por debajo del LC (83 ng/kg para AFG₁, AFB₁, AFG₂ y AFB₂). ¹Producto integral

Del total de las muestras positivas analizadas, un 81,8% superaron el contenido máximo establecido por la legislación en 100 ng/kg para la aflatoxina B₁. La mitad de éstas, presentaron en su composición algún tipo de cereal integral como el trigo, la avena o el centeno. Además, la mayoría de estas muestras contaminadas por AFB₁, tiene cebada en su composición. Duarte *et al.* (2010) obtuvo resultados similares en cereales integrales. Esta mayor incidencia de contaminación por aflatoxinas en cereales integrales se debe a que la mayoría de los hongos se encuentran en la superficie exterior de los granos de cereal. Debido a que los cereales integrales no son sometidos a un proceso de eliminación de su parte externa, son más susceptibles a la contaminación. Por otra parte, Oueslati *et al.* (2012) y Soleimany *et al.* (2012) detectaron altos porcentajes de contaminación en muestras de cebada, destacando los altos valores en AFG₂.

En un estudio realizado por Contreras *et al.* (2009), en el que se analizaron 30 muestras de cereales infantiles obtuvieron resultados en concordancia con los obtenidos en este estudio. Después de analizar diferentes productos infantiles, en esta investigación se obtuvo un 10,0% de productos contaminados con AFB₁, si bien hay que tener en cuenta que el número de muestras analizadas fue la mitad que las analizadas en nuestro estudio.

Sin embargo, en otros trabajos, se han identificado mayores cantidades de cereales infantiles contaminados con dicha aflatoxina, como es el caso del estudio de Hernández y Navarro (2010), los cuales analizaron un total de 91 productos infantiles a base de cereales (tanto convencionales como ecológicos) y obtuvieron un 46,0% de muestras positivas, o Tam *et al.*, (2006), que analizaron 177 productos infantiles a base de cereales como el maíz, el arroz o la avena. En sus resultados se muestra un 50,0% de muestras contaminadas. Esta gran incidencia de aflatoxinas en las muestras de cereales puede atribuirse a la gran sensibilidad del método analítico, el cual tiene unos límites de detección de 2 ng/kg (para las aflatoxinas B₁ y B₂) y de 4 ng/kg (para G₁ y G₂).

Es importante señalar que también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el tipo de producto según su procedencia (convencional o ecológico) con la contaminación con AFB₁. Se observó que un mayor número de muestras contaminadas por alguna de las 4 AFs procedían de cultivos convencionales (81,8%) y el resto (18,1%) las formaban las muestras elaboradas con cereales procedentes de cultivos ecológicos.

Esto puede ser debido a que el número de muestras analizadas procedentes de cultivos convencionales fue mucho mayor que el de muestras con cereales ecológicos. Es por ese motivo, por el cual los resultados obtenidos son contradictorios con otra bibliografía estudiada, como la de Alvito *et al.* (2010), el cual muestra un mayor porcentaje de contaminación en productos ecológicos (66,7%) en comparación con cereales convencionales (33,3%).

Algunos trabajos (Magkos *et al.*, 2006), justifican la mayor susceptibilidad de los cereales ecológicos a ser contaminados con AFs por la relación inversa que establece entre la aplicación de N₂ en los cultivos y el contenido de azúcar (Poulsen *et al.*, 1995). Este contenido en azúcar contribuye a aumentar la susceptibilidad de los cereales a ser contaminados. Por el contrario, Heaton (2001) afirma que el uso de N₂ sobre los cultivos convencionales, implica una reducción del grosor de las paredes, aumentando así su exposición a una contaminación por micotoxinas.

En relación al contenido de aflatoxinas según la composición de cereales, en primer lugar destacar que, en los productos elaborados con un único tipo de cereal, se obtuvieron resultados similares que los obtenidos en otros estudios.

Así, Blankson y Mill-Robertson (2016), en un estudio realizado en la región Gran Accra, obtuvieron valores de aflatoxina B₁ semejantes a los analizados en este estudio en muestras con arroz como único cereal. La región Gran Accra presenta altas temperaturas durante todo el año, motivo por el cual las tasas de contaminación que obtuvieron fueron semejantes y ligeramente superiores (180 a 340 ng/kg) a nuestros resultados.

Amin *et al.* (2010), analizó diferentes productos monocereal de arroz exclusivamente obteniendo unos valores de contaminación de 1,2 µg/kg de AFB₁. Estos valores son mucho más elevados que los obtenidos en nuestro estudio para productos compuestos únicamente de arroz (94,2 ng/kg). La diferencia entre resultados puede deberse a que el estudio se realizó con muestras tomadas de Egipto, un país con una alta humedad y temperaturas extremas, es decir, óptimas para la contaminación por micotoxinas. En esta zona y en el resto del mundo, el arroz es un cereal que se recolecta con unos niveles de humedad muy elevados (35,0 – 50,0%). Los tiempos prolongados de almacenamiento en un ambiente con humedades elevadas, permite a los mohos formadores de toxinas crecer provocando un aumento del contenido en AFs (Buyukunal *et al.*, 2010 y Huong *et al.*, 2016).

Por otra parte, el 27,2% de las muestras positivas eran productos a base de una mezcla de 2 cereales combinando el arroz con la quinoa o el maíz y el trigo con el maíz. Los rangos de contaminación para la aflatoxina B₁ se encontraron entre 200,8 y 226,8 ng/kg en dos de las tres muestras compuestas por dos cereales (arroz más maíz

y trigo más maíz). Estos datos confirman lo publicado por la EFSA en el año 2012 cuando advertía de las altas tasas de contaminación de aflatoxinas en maíz debido al cambio climático (EFSA, 2012).

El mayor porcentaje respecto del total de muestras analizadas correspondió a aquellas que presentaban más de dos cereales en su composición. Un 54,5% de las muestras contaminadas por AFs se incluían dentro del grupo de productos denominados como multicereales. Los ingredientes principales en estos productos eran el trigo y el arroz (presentes en el 54,5 y 45,4% de las muestras positivas respectivamente). El hecho de tener una mayor variedad de cereales en su composición resultó ser estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en relación a la contaminación por AFB₁. De forma similar Blankson y Mill-Robertson (2016) mostraron porcentajes de muestras positivas por AFB₁ en las formulaciones multicereal del 88%. Estos productos estaban formados por mezclas de cereales como el maíz, el trigo y el arroz. Otros estudios (Tam *et al.*, 2006) también reportaron contenidos similares en AFB₁ en productos multicereales con concentraciones de hasta 80 ng/kg.

En relación a los ingredientes añadidos a los diferentes productos, se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en aquellos productos que contenían cacao. El 30,0% de las muestras contaminadas por AFB₁ llevaban cacao incorporado en su composición. En estas muestras, los niveles medios de contaminación por AFB₁ son de 156,9 ng/kg y de 149,6 ng/kg para AFG₁. Las muestras con cacao presentan mayores tasas de contaminación que las constituidas únicamente por cereales y esto puede ser explicado por la posible contaminación por micotoxinas en los granos de cacao.

Otros estudios (Hernández y Navarro, 2010) obtuvieron los niveles más altos de contaminación por AFs en productos elaborados a base de cereales infantiles con cacao, con una media para AFB₁ de 1,5 µg/kg y de 220,0 µg/kg para AFG₁.

La presencia de AFB₁ en cereales con cacao puede ser debido a la misma contaminación de las semillas del cacao. Durante mucho tiempo se ha ignorado la posible contaminación del cacao por aflatoxinas debido a que se tenía la teoría que la cafeína presente en los granos inhibía la producción de estas micotoxinas.

Sin embargo algunos estudios (Copetti *et al.*, 2012) sugieren que la contaminación del cacao por AFs puede darse durante la etapa de secado, ya que, durante esta fase, además de la presencia de especies potencialmente toxigénicas, aún hay agua libre para sostener el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas. Por lo tanto, el cacao representa una importante fuente de contaminación, más que el contenido del cereal en sí (Hernández y Navarro, 2010).

Los productos que contenían fruta en su composición, mostraron resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en relación a la contaminación por AFG₂ y AFB₂, con unos valores medios de 114,1 ng/kg y 196,2 ng/kg respectivamente. Aidoo (2011) también obtuvo resultados positivos en muestras de cereales con vegetales y frutas obteniendo un 4,1% de estas muestras positivas para aflatoxinas totales con unos niveles de contaminación mayores (70,1 µg/kg) a los obtenidos en este estudio debido al gran número de muestras de cereales con frutas analizados.

Amin et al. (2010), investigaron los niveles de contaminación en productos infantiles a base de arroz y fruta (naranja y plátano) de países de clima húmedo y cálido como Egipto. En esta investigación obtuvieron resultados positivos para AFB₁ con unos niveles de contaminación de 0,8 µg/kg. Estos valores de contaminación son mucho mayores a los analizados en nuestro estudio, al igual que el número de muestras positivas con fruta en relación al número total de muestras analizadas. Aunque hay trabajos que estudian la presencia de micotoxinas en frutas cítricas, como la naranja, la mayoría de estudios trabajan con frutas secas como higos, dátiles o albaricoques debido a que la contaminación por micotoxinas como las aflatoxinas, la ocratoxina A, la patulina y las toxinas de *Alternaria*, son más frecuentes este tipo de productos (Barkai y Paster, 2008).

5 Conclusiones

Primera

La metodología analítica optimizada en este estudio, garantiza la extracción selectiva de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, en muestras de cereales infantiles, la separación del resto de sustancias interferentes que puedan aparecer durante el proceso mediante el uso de columnas de inmovilización y la detección y cuantificación sensible y selectiva mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia (FLD) y fotoquímico (PHRED).

Segunda

La frecuencia de presentación de aflatoxinas en las muestras de cereales infantiles es baja (18,3%), detectándose una presencia mayoritaria de aflatoxina B₁ (90,9%) y en menor medida, una combinación de B₁ y G₁ (36,4%). No se detectó en ninguna muestra la presencia de las cuatro aflatoxinas estudiadas.

Tercera

A pesar de la baja frecuencia de aparición de las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ en las muestras analizadas, su detección en las muestras de cereales infantiles pone en evidencia la necesidad de establecer una normativa legal que establezca límites máximos para la suma de aflatoxinas en este tipo de productos alimenticios, dirigidos a una población de riesgo.

Cuarta

Del total de las muestras positivas analizadas, un 81,8%, (9 de 11 muestras positivas), superaron el contenido máximo de 100 ng/kg de aflatoxina B₁ establecido por la legislación. Cabe destacar, que la mitad de las muestras que superaron los contenidos máximos establecidos para la aflatoxina B₁, presentaron en su composición algún tipo de cereal integral como el trigo, la avena o el centeno.

Quinta

La mayor tasa de contaminación por aflatoxina B₁ (226,7 ng/kg) correspondía a una muestra de papilla multicereal con cacao. Igualmente, las tasas de contaminación de tres de las cinco muestras enriquecidas con cacao superaron los contenidos máximos para la aflatoxina B₁. Estos resultados, están en consonancia con los hallados por otros autores en trabajos previos, que afirmaron que el cacao y otros ingredientes como la lecitina de soja o la vainillina podrían aportar la contaminación por aflatoxinas en este tipo de productos.

Sexta

Del mismo modo que se ha reflejado con anterioridad en otros trabajos que demuestran cómo los patrones de distribución de las aflatoxinas están cambiando y aparecen en otras materias primas diferentes a los frutos secos, en este trabajo es importante destacar que se ha verificado que los alimentos infantiles a base de cereales como el arroz, el maíz, el trigo o la quinoa son susceptibles de estar contaminados con estas toxinas.

Séptima

Con los resultados obtenidos en este estudio se pretende dar respuesta a la demanda de la OCU (Organización de Consumidores y Usuarios) de aportar datos de tasas de contaminación por aflatoxinas en este tipo de alimentos con el fin de establecer límites máximos para la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ ya que actualmente existe una laguna legal al respecto.

6 Bibliografía

- Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A. A., Al-Kildi, A. M., & Al-Jedah, J. H. (2004).
Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, *15*(7), 543–548.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.08.008>
- Abia, W. A., Warth, B., Sulyok, M., Krska, R., Tchana, A. N., Njobeh, P. B., ...
Moundipa, P. F. (2013). Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals,
nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass
spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control*, *31*(2), 438–453.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.006>
- Afsah-Hejri, L., Jinap, S., Arzandeh, S., & Mirhosseini, H. (2011). Optimization of
HPLC conditions for quantitative analysis of aflatoxins in contaminated peanut.
Food Control, *22*(3-4), 381–388. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.007>
- Aidoo, K. E. (2011). Occurrence of Fungi and Mycotoxins in Some Commercial Baby
Foods in North Africa. *Food and Nutrition Sciences*, *02*(07), 751–758.
<http://doi.org/10.4236/fns.2011.27103>
- Alvito, P. C., Sizoo, E. A., Almeida, C. M. M., & van Egmond, H. P. (2010).
Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food
Analytical Methods*, *3*(1), 22–30. <http://doi.org/10.1007/s12161-008-9064-x>
- Amin, A., Abo-Ghaila, H., & Hamed, A. (2010). Aflatoxin B1 and B2 in cereal-based
baby foods and corn based snacks from egypt markets: Occurrence and estimation
of the daily intake of AFB1. *The African Journal of Mycology and Biotechnology*,
15, 1–11. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ariño, A., Herrera, M., Estopañan, G., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Juan, T., &
Herrera, A. (2009). Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and
effect of roasting. *Food Control*, *20*(9), 811–814.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.013>
- Arroyo-manzanares, N., Huertas-pérez, J. F., Gámiz-gracia, L., & García-campaña, a
N. a M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos.

- Ashiq, S. (2015). Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 159–175. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12122>
- Barkai, R., & Paster, N. (2008). *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374126-4.00004-8>
- Barlow, S., Carere, A., Ferro-Luzzi, A., Gibney, M., Gomez Candela, C., Hammes, W., ... Noirfalise, A. (1993). Reports of the Scientific Committee for Food.
- Baydar, T., Erkekoglu, P., Sipahi, H., & Sahin, G. (2007). Aflatoxin B1, M1 and ochratoxin A levels in infant formulae and baby foods marketed in Ankara, Turkey. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(1), 89–92.
- Blankson, G. K., & Mill-Robertson, F. C. (2016). Aflatoxin contamination and exposure in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in greater Accra, Ghana. *Food Control*, 64, 212–217. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.032>
- Buyukunal, S. K., Kahraman, T., & Ciftcioglu, G. R. (2010). Occurrence of AF, AFB1, OTA in rice commercialized in eastern Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(5), 907–912.
- Cano-Sancho, G., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2009). Micotoxinas Estudi de dieta total a Catalunya 2008-2009.
- Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S., & Ramos, A. J. (2013). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 188–193. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.032>
- Cepeda, A., Cameán, A. M., Herrera, A., Martínez, M. R., Paseiro, P., & Biesa, P. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B1.

- Contreras, R., Liliana, O., Flórez, W., María, A., Aflatoxinas, D. D. E., Alimentos, E. N., & Consumo, D. E. M. (2009). Determinación de Aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, norte de Santander. *Revista Bistua*.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012). Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, 26(1), 36–41.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.023>
- Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27(2), 187–198. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.016>
- EFSA. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds hazelnuts and pista. *The EFSA Journal*, 446, 1–127.
- EFSA. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *Petria*, 20(178), 453–454. Retrieved from <http://publicatt.unicatt.it/handle/10807/12814>
- Erkekoğlu, P., Şahin, G., & Baydar, T. (2008). A special focus on mycotoxin contamination in baby foods: Their presence and regulations. *Fabard Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(1), 51–66.
- Heaton, S. (2001). Nutritionl Quality of Organic foods: A systematic Review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 680 – 685. Retrieved from <http://library.wur.nl/WebQuery/biola/lang/1661450>
- Hernández, R., & Navarro, I. (2010). Aflatoxin levels and exposure assessment of Spanish infant cereals. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 3(4), 275–288.
<http://doi.org/10.1080/19393210.2010.531402>

- Huong, B. T. M., Tuyen, L. D., Do, T. T., Madsen, H., Brimer, L., & Dalsgaard, A. (2016). Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. *Food Control*, *70*, 191–200. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.052>
- IARC. (2002a). Aflatoxins. *Chemical Carcinogens*, 945–1136.
- IARC. (2002b). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, *82*, 1–556. <http://doi.org/10.1002/food.19940380335>
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2012). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chemical Agents and Related Occupations, *100*.
- Juan, C., Raiola, A., Mañes, J., & Ritieni, A. (2014). Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control*, *39*(1), 227–236. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.036>
- Kabak, B. (2012). Aflatoxin M 1 and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: Occurrence and safety evaluation. *Food Control*, *26*(1), 182–187. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.032>
- Li, R., Wang, X., Zhou, T., Yang, D., Wang, Q., & Zhou, Y. (2014). Occurrence of four mycotoxins in cereal and oil products in Yangtze Delta region of China and their food safety risks. *Food Control*, *35*(1), 117–122. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.042>
- Magkos, F., Arvaniti, F., & Zampelas, A. (2006). Organic Food: Buying More Safety or Just Peace of Mind? A Critical Review of the Literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *46*(1), 23–56. <http://doi.org/10.1080/10408690490911846>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, *60*, 218–237. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>

- Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Khan, M. Z., & Ashrafuzzaman, M. (2012). Occurrence of aflatoxins in selected processed foods from Pakistan. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8324–8337.
<http://doi.org/10.3390/ijms13078324>
- Nguyen, M. T., Tozlovanu, M., Tran, T. L., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, *105*(1), 42–47.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.040>
- OCU. (2013). Micotoxinas en papillas infantiles. Retrieved from
<http://www.ocu.org/alimentacion/seguridad-alimentaria/noticias/micotoxinas-papillas-infantiles>
- OMS. (2000). Complementary Feeding: Family foods for breastfed children. *Health (San Francisco)*, 1–56.
- Oueslati, S., Romero-González, R., Lasram, S., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2012). Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(7), 2376–2381.
<http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.036>
- Peraica, M., & Domijan, a M. (2001). Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, *52*(1), 23–35.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*, *36*(2), 96–136.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>
- Poulsen, N., Johansen, A. ., & Sorensen, J. . (1995). Influence of growth conditions on the value of crisphead lettuce. 4. Quality changes during storage. *Plant Foods Hum. Nutr.*, *47*, 157–162.

- Raiola, A., Tenore, G. C., Manyes, L., Meca, G., & Ritieni, A. (2015). Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, *84*, 169–180. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.023>
- RASFF. (2015). Annual Report 2015, 1–8.
- Soleimany, F., Jinap, S., & Abas, F. (2012). Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *130*(4), 1055–1060. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.131>
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos* (Diaz de Sa). Retrieved from https://books.google.es/books?id=wuZvCQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Tam, J., Mankotia, M., Mably, M., Pantazopoulos, P., Neil, R. J., Calway, P., & Scott, P. M. (2006). Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B1, B2, G1 and G2. *Food Additives and Contaminants*, *23*(July), 693–699. <http://doi.org/10.1080/02652030600627230>
- Zhang, K., Wong, J. W., Krynitsky, A. J., & Trucksess, M. W. (2014). Determining Mycotoxins in Baby Foods and Animal Feeds Using Stable Isotope Dilution and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, *62*, 8935–8943.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., ... Miraglia, M. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, *17*(11), 868–874. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.06.001>

Anexo

Anexo 1: Características y resultados de las muestras analizadas

Muestra	Tipo	Nº Cereales	Composición de los cereales	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1
MCI 1	C	8	Trigo, maíz, arroz, mijo, avena, cebada, centeno, alforfón, miel	nd	nd	nd	nd
MCI 2	C	8	Trigo, trigo de grano entero, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo	nd	nd	nd	nd
MCI 3	C	2	Arroz y maíz	nd	nd	nd	nd
MCI 4	C	8	Harina de trigo, almidón de maíz, harina de cebada, harina de arroz, harina de avena, harina de centeno, harina de mijo y harina de sorgo, galleta	nd	nd	nd	nd
MCI 5	C	1	Harinas (arroz y arroz hidrolizada)	nd	146,454	nd	96,567
MCI 6	C	8	Harina de trigo hidrolizada, trigo, cebada, centeno, maíz, sorgo, arroz, avena y mijo	nd	nd	nd	nd
MCI 7	C	2	Harina de arroz hidrolizada, maíz y arroz, almidón de maíz	nd	nd	nd	nd
MCI 8	C	2	Harina hidrolizada de cereales sin gluten (maíz y arroz)	nd	nd	nd	nd
MCI 9	C	2	Harina de arroz y harina de maíz	nd	nd	nd	nd
MCI 10	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, trigo de grano entero, espelta, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo, miel)	nd	nd	nd	nd
MCI 11	C	8	Harinas de trigo hidrolizada, trigo, maíz, centeno, cebada, mijo, sorgo, avena y arroz, yogur	nd	nd	nd	nd
MCI 12	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, trigo de grano entero, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo, galleta)	nd	nd	nd	nd
MCI 13	C	2	Harina de trigo, maíz, galleta	nd	nd	nd	226,814
MCI 14	C	8	Harina de trigo, harina de cebada, almidón de maíz, harina de arroz, harina de avena, harina de centeno, harina de mijo y harina de sorgo, miel	nd	nd	nd	nd

MCI 15	E	1	Harina de arroz integral	nd	nd	nd	nd
MCI 16	E	1	Harina de espelta integral	nd	nd	nd	nd
MCI 17	E	3	Arroz, maíz, mijo	nd	nd	nd	nd
MCI 18	E	2	Harina de mijo integral, harina de arroz integral	nd	nd	nd	nd
MCI 19	E	2	Trigo integral, avena integral, fruta	nd	nd	nd	nd
MCI 20	E	2	Arroz integral malteado ecológico, Avena ecológica	nd	nd	nd	nd
MCI 21	E	6	Arroz integral ecológico, avena ecológica, cebada ecológica, centeno integral ecológicos, maíz ecológico, trigo integral ecológico, algas	nd	nd	nd	nd
MCI 22	E	2	Arroz integral malteado ecológico, maíz ecológico	nd	nd	nd	nd
MCI 23	E	6	Arroz integral malteado de cultivo ecológico, avena integral de cultivo ecológico, cebada integral de cultivo ecológico, centeno integral de cultivo ecológico, mijo de cultivo ecológico, trigo integral de cultivo ecológico, miel	nd	nd	nd	181,225
MCI 24	E	2	Arroz integral malteado ecológico, quinoa ecológica, algas	nd	nd	nd	nd
MCI 25	E	2	Arroz integral ecológico, sarreceno (alforfón) integral ecológico	nd	nd	nd	nd
MCI 26	E	2	Harina de arroz, harina de quinoa	nd	nd	nd	nd
MCI 27	E	2	Harina de arroz, harina de quinoa, fruta	114,123	120,48	196,266	nd
MCI 28	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, trigo de grano completo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo), fruta	nd	nd	nd	nd
MCI 29	C	3	Cereales hidrolizados sin gluten (arroz, maíz, y tapioca)	nd	nd	nd	nd
MCI 30	C	1	Harinas de cereal dextrinado (arroz)	nd	nd	nd	nd

MCI 31	C	2	Cereales (harinas de arroz y maíz parcialmente dextrinadas, almidón de maíz)	nd	nd	nd	nd
MCI 32	C	2	Harinas de cereales dextrinados (arroz integral y maíz)	nd	136,078	nd	200,875
MCI 33	C	8	Harinas de cereales dextrinados (trigo integral, arroz integral, cebada, centeno, maíz, mijo, sorgo, avena)	nd	164,739	nd	101,194
MCI 34	C	6	Harinas de cereales dextrinados (trigo, trigo integral, arroz, cebada, centeno, maíz, avena), frutos secos, miel, fruta	nd	nd	nd	nd
MCI 35	C	5	Harinas de cereales dextrinados (trigo, arroz, avena, cebada, centeno), cacao	nd	149,641	nd	139,646
MCI 36	C	8	Harinas de cereales dextrinados (trigo, arroz, cebada, centeno, maíz, mijo, sorgo, avena), miel	nd	127,643	nd	110,05
MCI 37	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, trigo de grano completo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo), cacao	nd	nd	nd	104,466
MCI 38	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, trigo de grano entero, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo), miel	nd	nd	nd	nd
MCI 39	C	5	Harinas (trigo hidrolizada, trigo, cebada, centeno, maíz y avena)	nd	nd	nd	nd
MCI 40	C	8	Cereales (harinas de trigo hidrolizado, trigo, arroz, maíz, centeno, mijo integral, espelta integral, avena integral, cebada), miel	nd	nd	nd	nd
MCI 41	C	5	Cereales (harinas de: trigo hidrolizado, trigo, arroz, centeno integral, maíz y cebada)	nd	nd	nd	nd
MCI 42	C	1	Harina hidrolizada de arroz	nd	nd	nd	87,314
MCI 43	C	6	Harina hidrolizada de 6 cereales (trigo, trigo integral, arroz, avena, maíz, cebada, centeno)	nd	nd	nd	126,431
MCI 44	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo, mijo), galleta	nd	nd	nd	nd

MCI 45	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo, mijo), miel	nd	nd	nd	nd
MCI 46	C	8	Harina hidrolizada de 8 cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo, mijo)	nd	nd	nd	nd
MCI 47	C	8	Harina parcialmente hidrolizada de cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, alforfón, mijo), cacao	nd	nd	nd	nd
MCI 48	C	8	Harina parcialmente hidrolizada de cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, alforfón, mijo)	nd	nd	nd	nd
MCI 49	C	8	Cereales hidrolizados (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo)	nd	nd	nd	nd
MCI 50	C	3	Harina parcialmente hidrolizada de cereales (arroz, maíz, almidón de yuca)	nd	nd	nd	nd
MCI 51	E	1	Arroz integral	nd	nd	nd	nd
MCI 52	E	2	Harina de arroz, harina de maíz	nd	nd	nd	nd
MCI 53	E	1	Harina de avena	nd	nd	nd	nd
MCI 54	E	1	Sémola de trigo duro, fruta	nd	nd	nd	nd
MCI 55	E	1	Sémola de arroz integral	nd	nd	nd	nd
MCI 56	E	1	Harina de arroz, fruta	nd	nd	nd	nd
MCI 57	E	1	Harina de arroz, cacao	nd	nd	nd	nd
MCI 58	E	1	Harina de arroz	nd	nd	nd	nd
MCI 59	E	1	Harina de arroz, fruta	nd	nd	nd	nd
MCI 60	E	3	Harina (arroz, maíz y tapioca)	nd	nd	nd	nd