



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

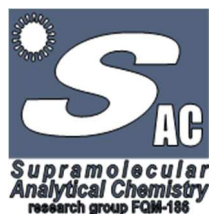


Departamento de
Química Analítica

TESIS DOCTORAL

**Química supramolecular del estado líquido:
disolventes nanoestructurados para la
extracción de micotoxinas en productos
agroalimentarios**

SERGIO GARCÍA FONSECA



TITULO: QUÍMICA SUPRAMOLECULAR DEL ESTADO LÍQUIDO:
DISOLVENTES NANOESTRUCTURADOS PARA LA EXTRACCIÓN
DE MICOTOXINAS EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

AUTOR: *Sergio García Fonseca*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Tesis Doctoral:

Química supramolecular del estado líquido: disolventes nanoestructurados para la extracción de micotoxinas en productos agroalimentarios

Trabajo presentado, para optar al grado de Doctor, por

Sergio García Fonseca

que lo firma en Córdoba, a 28 de marzo de 2016



Firmado:

Sergio García Fonseca

Licenciada en Química

con el VºBº de la directora

Soledad Rubio Bravo



Firmado:

Soledad Rubio Bravo

Catedrática del Departamento de Química Analítica

de la Universidad de Córdoba

D^a Soledad Rubio Bravo, catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, en calidad de directora de la Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Química, D. Sergio García Fonseca,

CERTIFICA: Que la citada Tesis Doctoral "*Química supramolecular del estado líquido: disolventes nanoestructurados para la extracción de micotoxinas en productos agroalimentarios*" se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y que, a mi juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajos.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expide el presente certificado en Córdoba a 28 de marzo de 2016.



Firmado:

Dra. Soledad Rubio Bravo

Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad
de Córdoba



TÍTULO DE LA TESIS: QUÍMICA SUPRAMOLECULAR DEL ESTADO LÍQUIDO: DISOLVENTES NANOESTRUCTURADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE MICOTOXINAS EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

DOCTORANDO/A: SERGIO GARCÍA FONSECA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Las investigaciones desarrolladas durante la realización de Tesis Doctoral han tenido como objetivo la síntesis y/o aplicación de disolventes supramoleculares (SUPRASs) cuyas nanoestructuras y propiedades se han diseñado para que cumplan funciones específicas en dos áreas de interés; tratamiento de muestras para el análisis químico de micotoxinas en matrices agroalimentarias y purificación de aguas residuales industriales.

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos presentes en productos agrícolas con importantes efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. El cumplimiento de la legislación vigente requiere disponer de métodos analíticos simples, rápidos y fiables para el control de micotoxinas en alimentos. En las investigaciones realizadas se han desarrollado tratamientos de muestras eficaces, generales, simples y de bajo coste

para este fin. Para ello se ha utilizado disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido (SUPRAS-RAM), sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación, a partir de ácidos carboxílicos en mezclas de tetrahidrofurano y agua. Estos disolventes tienen el potencial de extraer eficientemente los contaminantes y excluir las macromoléculas presentes en la matriz de la muestra mediante mecanismos químicos y físicos, así integrando las etapas de extracción y purificación. Las investigaciones desarrolladas por D. Sergio García Fonseca han permitido eliminar las columnas de inmunoafinidad para la purificación de muestras, tanto en métodos instrumentales como inmunoquímicos, reducir el consumo de disolvente orgánico, y extraer micotoxinas en un amplio intervalo de polaridad en una única etapa. Se han desarrollado metodologías innovadoras para la determinación de ocratoxina en vinos y cereales combinando SUPRAS-RAM con cromatografía de líquidos y detección fluorescente, zearalenona, desoxinivalenol, fumonisina B1 y fumonisina B2 en cereales mediante la combinación de SUPRAS-RAM con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas y ocratoxina A en vinos y especias y aflatoxina B1 en cereales combinando SUPRAS-RAM con métodos inmunoquímicos.

El tratamiento de aguas residuales industriales es esencial no sólo para evitar la contaminación de los recursos hídricos sino también para la reutilización de las mismas, aspecto fundamental para los países con déficit hídrico. En las investigaciones incluidas en la Memoria de esta Tesis Doctoral se han sintetizado nuevos SUPRAS a partir de moléculas anfifílicas naturales, estables cinéticamente, con baja capacidad de respuesta a las condiciones ambientales, y elevada eficacia de extracción para compuestos iónicos, polares e hidrófobos. Estos SUPRASs han permitido el desarrollo de una tecnología innovadora no destructiva para la concentración de contaminantes orgánicos de diferente naturaleza química en aguas residuales industriales para su posterior reciclado o destrucción.

Los principales resultados de estas investigaciones se han presentado en 3 artículos publicados en prestigiosas revistas internacionales (situadas en el primer cuartil del Journal Citation Report, JCR) y 2 artículos enviados para su publicación. Además de las publicaciones científicas, el doctorando ha presentado los resultados obtenidos en 2 contribuciones orales a congresos (1 nacional y 1 internacional), 4 carteles (2 nacionales y 2 internacionales)

Autorizo por tanto la presentación de esta Tesis Doctoral sobre la base de la originalidad, impacto y extensión del trabajo realizado y la formación en tareas de investigación adquirida por el doctorando.

Córdoba, 28 de Marzo de 2016

Firma de la directora

A handwritten signature in blue ink that reads "Soledad Rubio". The signature is written in a cursive style with a long horizontal flourish underneath.

Fdo.: SOLEDAD RUBIO BRAVO



INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS

TÍTULO DE LA TESIS: QUÍMICA SUPRAMOLECULAR DEL ESTADO LÍQUIDO: DISOLVENTES NANOESTRUCTURADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE MICOTOXINAS EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

DOCTORANDO/A: Sergio García Fonseca

PUBLICACIÓN	FACTOR DE IMPACTO (JCR 2014)	CUARTIL (<i>Ranking</i>)
Coacervative extraction of Ochratoxin A in wines prior to liquid chromatography/fluorescence determination Analytica Chimica Acta 617(2008) 3-10	4.513	1º (5/74) Analytical Chemistry
Supramolecular solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat prior to liquid chromatography-fluorescence determination Journal of Chromatography A 1217 (2010) 2376–2382	4.169	1º (6/74) Analytical Chemistry
Restricted access supramolecular solvents for removal of matrix-induced ionization effects in mass spectrometry: Application to the determination of Fusarium toxins in cereals Talanta 148 (2016) 370-379	3.545	1º (12/74) Analytical Chemistry

Quiero agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de la beca de Formación de Personal Investigador, con referencia BES-2006-12643, que me ha posibilitado mi dedicación a esta Tesis Doctoral durante cuatro años, así como el apoyo del grupo FQM-186 que ha cubierto el resto del tiempo necesario para concluir este trabajo.

A Elena,

A mis padres,

A mis compañeros y amigos del laboratorio,

A mi directora de Tesis, Soledad Rubio

INDICE

OBJETO	23
CONTENIDO	29
INTRODUCCIÓN	37
1.1. Preámbulo.....	39
1.2. Hongos: condiciones para su crecimiento y producción de micotoxinas.....	40
1.2.1. Condiciones para el crecimiento de los hongos.....	41
1.2.2. Producción de micotoxinas.....	43
1.3. Registros históricos de la contaminación por micotoxinas	44
1.4. Las micotoxinas y los riesgos para la salud: Micotoxicosis	47
1.5. Micotoxinas relevantes para la seguridad alimentaria	49
1.5.1. Aflatoxinas	53
1.5.2. Ocratoxinas.....	56
1.5.3. Tricotecenos	58
1.5.4. Zearalenona	61
1.5.5. Fumonisinias.....	62
1.6. Legislación vigente	64
1.7. Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en productos agroalimentarios.....	75
1.7.1. Muestreo	75
1.7.2. Preparación y tratamiento de muestra.....	77
1.7.3. Cuantificación de micotoxinas.....	81
1.7.3.1. Técnicas cromatográficas.....	82
1.7.3.2. Métodos de screening	85

1.8. Validación de métodos analíticos para determinación de micotoxinas	87
2.1. Introducción.....	90
2.2. Aspectos legislativos.....	91
2.3. Eliminación de compuestos orgánicos en aguas residuales.....	92
3.1. Aspectos generales	96
3.2. Síntesis de disolventes supramoleculares.....	100
3.3. Propiedades extractivas de los disolventes supramoleculares	103
3.3.1. Eficiencias de extracción y factores de preconcentración.....	104
3.4. Formatos de extracción	107
3.5. Compatibilidad con las técnicas de separación y detección	109
3.6. Aplicaciones analíticas.....	110
3.7. Aplicaciones al tratamiento de aguas residuales.....	114
PARTE I. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES CON PROPIEDADES DE ACCESO RESTRINGIDO (SUPRAS-RAM) PARA LA EXTRACCIÓN DE MICOTOXINAS EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS.....	117
CAPÍTULO 1. Coacervative extraction of ochratoxin A in wines prior to liquid chromatography/fluorescence determination	125
CAPÍTULO 2. Supramolecular Solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat prior to liquid chromatography-fluorescence determination.....	151
CAPÍTULO 3. Restricted access supramolecular solvents for removal of matrix-induced ionization effects in mass spectrometry: Application to the determination of <i>Fusarium</i> toxins in cereals	181

CAPÍTULO 4. Restricted access supramolecular solvents for interferences removal in enzyme-linked immunosorbent assays of mycotoxins in food.....	213
PARTE II. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES BASADOS VESÍCULAS DE ÁCIDOS ALQUILCARBOXÍLICOS PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN ACUOSA	239
CAPÍTULO 5. Green vesicular supramolecular solvents for simultaneous removal of ionic, polar and hydrophobic organic pollutants in wastewater	241
ANEXO 1: Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral ...	283
ANEXO 2: Comunicaciones realizadas en congresos nacionales e internacionales	287

OBJETO

El autoensamblaje de compuestos anfífilos constituye una estrategia simple y eficaz para la síntesis de disolventes con características programadas para que cumplan funciones específicas. Las fases líquidas nanoestructuradas producidas, denominadas disolventes supramoleculares (SUPRASs), presentan propiedades extractivas excepcionales comparadas con las que presentan los disolventes moleculares e iónicos.

El objeto de las investigaciones que se presentan en la Memoria de esta Tesis Doctoral ha sido la síntesis y/o aplicación de SUPRASs cuyas nanoestructuras y propiedades se han diseñado para que cumplan funciones específicas en dos áreas de interés; tratamiento de muestras para el análisis químico de micotoxinas en matrices agroalimentarias y purificación de aguas residuales industriales.

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por diferentes géneros de hongos. Se encuentran de modo natural en productos agrícolas utilizados como materias primas en la alimentación humana y animal o como residuos tóxicos en los productos de las explotaciones zootécnicas. Estos metabolitos provocan importantes pérdidas económicas derivadas de sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. Diferentes instituciones y organismos

nacionales e internacionales han fijado límites máximos permitidos y han desarrollado regulaciones al respecto. El cumplimiento de la legislación vigente requiere disponer de métodos analíticos simples, rápidos y fiables para la detección y cuantificación de micotoxinas. En los métodos disponibles, la etapa de extracción y purificación de las muestras es la más lenta y compleja, y su eficacia depende tanto de la estructura de la micotoxina como de la matriz de la muestra.

En las investigaciones propuestas se pretende desarrollar tratamientos de muestras eficaces, genéricos, simples y de bajo coste para la determinación de micotoxinas en muestras agroalimentarias. Para ello se utilizarán disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido (SUPRAS-RAM), sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación a partir de ácidos carboxílicos en mezclas de tetrahidrofurano y agua. Estos disolventes tienen el potencial de extraer eficientemente los analitos y excluir las macromoléculas presentes en la matriz de la muestra mediante mecanismos químicos y físicos, así integrando las etapas de extracción y purificación. Nuestras investigaciones estarán dirigidas a eliminar las columnas de inmunoafinidad para la purificación de muestras, tanto en métodos instrumentales como inmunoquímicos, reducir el consumo de disolvente orgánico, y extraer micotoxinas en un amplio intervalo de polaridad en una única etapa.

La actividad industrial en los países desarrollados consume alrededor del 60% del gasto total del agua. El tratamiento de aguas residuales industriales es esencial no sólo para evitar la contaminación de los recursos hídricos sino

también para la reutilización de las mismas, aspecto fundamental para los países con déficit hídrico. En las investigaciones incluidas en la Memoria de esta Tesis Doctoral proponemos el uso de disolventes supramoleculares como una tecnología no destructiva para la concentración de contaminantes orgánicos de diferente naturaleza química en aguas residuales industriales para su posterior reciclado o destrucción.

Con este objetivo se sintetizarán nuevos disolventes supramoleculares a partir de moléculas anfifílicas naturales, estables cinéticamente, con baja capacidad de respuesta a las condiciones ambientales, y elevada eficacia de extracción para compuestos iónicos, polares e hidrófobos. Para ello, se utilizarán disoluciones coloidales vesiculares de ácidos carboxílicos utilizando sales de amonio cuaternario para inducir la coacervación. Se estudiarán las características físico-químicas de los disolventes, sus propiedades extractivas y se investigará las nanoestructuras que los conforman. Asimismo, se establecerán los mecanismos de extracción y se evaluará su capacidad de purificación de aguas residuales.

Paralelamente, un objetivo fundamental en el desarrollo de esta Tesis ha sido la formación del doctorando a través de actividades complementarias a la labor investigadora, tales como la redacción de artículos científicos, la asistencia y presentación de comunicaciones en congresos internacionales, la discusión crítica de los resultados, etc.

CONTENIDO

El contenido de la Memoria de esta Tesis Doctoral se ha estructurado en dos Partes, precedidas de una Introducción en la que se discuten aspectos generales, antecedentes y necesidades de I+D de los tres tópicos implicados en las investigaciones realizadas; micotoxinas, aguas residuales industriales y disolventes supramoleculares. Los contenidos de las dos Partes se especifican a continuación.

Parte I: Disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido (SUPRAS-RAM) para la extracción de micotoxinas en productos agroalimentarios.

En esta parte se describen cuatro metodologías para la determinación de varias micotoxinas en diferentes productos agroalimentarios.

En el capítulo 1 se propone el uso de un SUPRAS-RAM, producido espontáneamente al disolver ácido decanoico (0.5%, w/v) en una mezcla de THF:vino (5:95, v/v), para la extracción de ocratoxina A (OTA) en vinos tinto, blanco y rosado, previo a su determinación mediante cromatografía de líquidos-detección fluorescente. El disolvente se forma *in situ* en el vino, se alcanza el equilibrio de extracción en 5 min y las recuperaciones para OTA oscilan entre el 85 y 100%, con factores de concentración comprendidos entre 105 y 125, utilizando 15 ml de muestra. Los límites de detección alcanzados (4.5-15 ng/L) son muy inferiores al valor límite establecido por la UE para OTA en vinos (2 µg/L). Las investigaciones

desarrolladas incluyen el estudio de los diagramas de fases y caracterización del SUPRAS-RAM formado en el vino, la optimización del proceso de extracción, la validación *in-house* del método analítico y la aplicación a muestras reales (concentraciones de OTA halladas en el intervalo 15-21 ng/L). La principal ventaja de este método con respecto a los previamente descritos es la integración de las etapas de extracción y purificación de muestra en una única etapa y, por tanto, la no necesidad de utilizar una columna de inmunoafinidad para eliminar las interferencias de la matriz de la muestra.

En el capítulo 2 se propone un SUPRAS-RAM, sintetizado espontáneamente al disolver ácido decanoico (3%, w/v) en una mezcla de THF:agua (8:92, v/v), para la extracción de OTA en trigo previa a su determinación mediante cromatografía de líquidos-detección fluorescente. La síntesis del SUPRAS-RAM se realiza en presencia de la matriz de la muestra. La extracción de OTA es prácticamente cuantitativa (recuperaciones en el intervalo 84-95%), el equilibrio de extracción se alcanza en 15 min y el extracto se analiza directamente. La extracción de la muestra (300 mg) requiere el uso de 350 μ L de SUPRAS-RAM. El límite de cuantificación (1.5 μ g/kg) es inferior al valor límite establecido por la UE para OTA en cereales (5 μ g/kg). Las investigaciones desarrolladas incluyen el estudio del diagrama de fases y caracterización del SUPRAS-RAM producido en presencia de la matriz del trigo, estudios de representatividad de la muestra y la influencia del tamaño de partícula en la distribución homogénea o heterogénea de la OTA en la matriz, la optimización de las variables que influyen en el proceso de extracción, la validación *in-house* y con el uso de materiales certificados de referencia del método analítico desarrollado y el análisis de muestras de trigo. La principal ventaja del método propuesto con respecto a los previamente descritos es la reducción del consumo de disolvente

orgánico (generalmente se requiere de 50-250 ml) y la integración de las etapas de extracción y purificación en una simple etapa.

En el capítulo 3 se propone el uso de un SUPRAS-RAM, sintetizado espontáneamente al disolver ácido oleico en una mezcla THF:10 mM HCl (67:33, v/v), para la extracción de toxinas *Fusarium* (Zearalenona, Desoxinivalenol, Fumonisina B1 y Fumonisina B2) en cereales (trigo y maíz) previo a su determinación mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem. La síntesis del SUPRAS-RAM se realiza en la disolución indicada y una vez formado, 600 µl se adicionan a 300 mg de cereal. El equilibrio de extracción se alcanza en 15 min, los porcentajes de recuperación oscilan entre el 87 y 105% y los límites de detección (8-15 µg/kg) son muy inferiores a los límites máximos permitidos por la UE. Las investigaciones realizadas incluyen el estudio de las propiedades RAM del SUPRAS sintetizado, la optimización del proceso de extracción, la validación *in-house* del método analítico y la aplicación al análisis de muestras de cereales. Las ventajas más importantes de este método son: su elevada eficiencia de extracción para analitos que varían en un amplio intervalo de polaridad (log Kow desde -0.7 hasta 3.6), la reducción del consumo de disolvente y la eliminación de la etapa de purificación de la muestra.

En el capítulo 4 se propone el uso de SUPRAS-RAM para la simultánea extracción de micotoxinas y purificación de la muestra, previo a su cuantificación mediante métodos inmunoquímicos, en aquellas aplicaciones en las que se recomienda el uso de columnas de inmunoafinidad para la eliminación de interferencias. Para ello se usa un SUPRAS-RAM sintetizado espontáneamente al disolver ácido tetradecanoico en mezclas de THF:agua, con 20% de THF y diferentes

condiciones de acidez. El disolvente se utiliza para la extracción de OTA en vinos (tinto, blanco y dulce) y especias (pimentón, nuez moscada y pimienta negra) y aflatoxina B1 en cereales. Una vez realizado el proceso de extracción se elimina el THF, lo que provoca la precipitación del ácido tetradecanoico. Las micotoxinas se disuelven en una disolución reguladora de fosfato (pH 8) y se determinan mediante la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Las investigaciones realizadas incluyen la selección del tensioactivo, la optimización del proceso de proceso de extracción y reextracción de las micotoxinas, la validación del método utilizando materiales certificados de referencia y la aplicación al análisis de muestras reales. La ventaja del método, especialmente para muestras sólidas, es la integración de la etapa de extracción y purificación en una única etapa, eliminando la necesidad de usar columnas de inmunoafinidad.

Parte II: Disolventes supramoleculares vesiculares para eliminación de contaminantes orgánicos en aguas residuales industriales.

En esta Parte se describe la síntesis y caracterización de nuevos SUPRAS, se evalúan sus propiedades extractantes para compuestos orgánicos iónicos, polares e hidrófobos y se discuten sus prestaciones para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales.

Los SUPRAS se sintetizan espontáneamente a partir de disoluciones acuosas de mezclas de ácidos carboxílicos-carboxilatos en presencia de sales de tetraalquilamonio. Las investigaciones realizadas incluyen el estudio del diagrama de fases, la determinación de las propiedades físico-químicas de los SUPRASs sintetizados y la función de la longitud de la cadena hidrocarbonada de las sales de tetraalquilamonio

en las características de los mismos, el estudio de la composición mediante cromatografía de líquidos y valoración de Karl Fisher y la caracterización de las nanoestructuras que los conforman mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido. Asimismo se estudia la eficiencia de extracción para PAHs y colorantes catiónicos y aniónicos y se sugieren diferentes mecanismos de extracción de acuerdo a la polaridad y carga de los contaminantes.

A continuación se incluye en la Memoria una sección que hemos denominado Resumen y Discusión de Resultados en la que se ofrece una visión general de los principales resultados obtenidos y finalmente, se incluyen las conclusiones generales derivadas de las investigaciones realizadas y los siguientes anexos:

- o Anexo 1: Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral.
- o Anexo 2: Comunicaciones realizadas en Congresos internacionales.

INTRODUCCIÓN

1. MICOTOXINAS

1.1.Preámbulo

El sector agroalimentario tiene una gran importancia en el conjunto de la economía mundial. En la Unión Europea (UE), la producción de alimentos y bebidas es uno de los sectores industriales más destacados, con una producción anual valorada en casi 600.000 millones de euros, es decir, cerca del 15% de la producción industrial total. A nivel global, la UE es el mayor productor mundial de productos alimentarios y bebidas y las exportaciones ascienden a unos 50.000 millones de euros anuales. Por otro lado, el sector agrícola genera anualmente alrededor de 220.000 millones de euros. Dada la importancia económica y la necesidad de alimentos en nuestras vidas, la seguridad alimentaria se ha convertido en una preocupación creciente para el conjunto de la sociedad y, especialmente, para los poderes públicos y productores del sector¹.

Las micotoxinas están incluidas dentro del grupo de contaminantes más importantes de los alimentos debido a su impacto negativo sobre la salud pública y

¹ European Commission (2000) "White Paper on Food Safety in the European Union" COM (99) 719, 12 January 2000; Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=URISERV:l32041&from=EN> o http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/library/pub/pub06_es.pdf en castellano.

la economía de muchos países. Afectan a un amplio intervalo de productos agrícolas, desde cereales, semillas oleaginosas, frutos secos o café a frutas y hortalizas, los cuales son la base de la economía de muchos países emergentes.

El peligro de las micotoxinas para la salud humana y animal se ha reconocido, desde hace años, por organismos e instituciones nacionales e internacionales tales como la Comisión Europea², la Agencia Americana para el control de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration; FDA)³, la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization; WHO)⁴ o la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)⁵. La FAO ha estimado que, aproximadamente, un 25% de los cultivos del mundo están contaminados por mohos y afectados por micotoxinas⁶ y las pérdidas económicas asociadas son del orden de varios miles de millones de euros.

1.2.Hongos: condiciones para su crecimiento y producción de micotoxinas

² Commission Regulation (EC) no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Off. J. Eur. Union L364 (2006) 5.

³ FDA - CAST, 2003. Mycotoxins - risks in plant, animal and human systems, Task Force Report, N° 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, pp. 1–191.

⁴ JECFA 2007. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 68th Meeting, Geneva 18-29 June 2007.

⁵ Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.html>.

⁶ CAST, 1989. Council for Agricultural Science and Technology. 1989. Mycotoxins: economic and health risks. Task force report nr 116. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology.

1.2.1. Condiciones para el crecimiento de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas unicelulares y heterótrofos, es decir, son incapaces de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas, así que se nutren de sustancias elaboradas por otros seres vivos. En la mayoría de los casos los hongos crecen en colonias multicelulares (agrupadas formando micelos) a diferencia de las levaduras, que son células individuales. Se han descrito casi 70000 especies fúngicas, pero se estima que podrían existir casi 1.5 millones de especies⁷. Los mohos colonizadores pueden vivir como parásitos, simbioses, o como saprófitos en un sustrato. Desde siempre, la mayoría de los mohos han jugado un papel significativo en la historia del ser humano, facilitándole la vida. Algunos ejemplos del rol que tienen los hongos como agentes beneficiosos para el hombre son: actúan como agentes biodegradantes en la naturaleza, están presentes en la preparación de ciertos alimentos y bebidas, poseen propiedades como antibióticos y son fuentes de compuestos químicos importantes para la industria como son los alcoholes, la acetona y las enzimas.

Los hongos pueden invadir, colonizar y producir micotoxinas, bien antes de la recogida de la cosecha, en el campo, o bien durante etapas posteriores a la recolección (almacenamiento, transporte y procesado). Sin embargo, sólo los hongos filamentosos que se adaptan al medioambiente terrestre son normalmente reconocidos como productores de micotoxinas. Estos hongos colonizan y utilizan los

⁷ Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. 2001. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 9th ed. Wallingford, U.K.: CAB Intl. 655 p.

sustratos sólidos, penetrando profundamente en sus matrices mediante la secreción de enzimas que descomponen los productos más complejos. En la mayoría de los casos, los hongos colonizadores producen y secretan compuestos de bajo peso molecular (con propiedades tóxicas), los cuales, normalmente, no son necesarios para el crecimiento normal y la supervivencia de los mismos. Estos metabolitos que enferman o matan a las personas o animales que los consumen se conocen como micotoxinas y la afección se llama micotoxicosis.

Las especies de hongos encontradas en el campo difieren según el vegetal, el clima y la región geográfica⁸. Su crecimiento generalmente requiere una humedad relativa entre el 90 y 100% y un contenido de agua en las semillas del 22 al 23%, y puede producirse en un amplio intervalo de temperaturas que oscila entre 0 y 30°C, aunque algunos pueden desarrollarse a temperaturas superiores a 35°C⁹. El crecimiento fúngico continúa en los productos frescos después de la cosecha y causa lesiones que desfiguran el aspecto de frutas y hortalizas. En los cereales, los hongos persisten si el grano está lo suficientemente seco como para soportar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente⁹.

Los factores que influyen en el desarrollo de los hongos presentes en los productos almacenados son el contenido de humedad del sustrato, la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento y la actividad de insectos y ácaros que faciliten la diseminación. Requieren menor humedad

⁸ Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Supplement 1989, pp. 11S-25S.

⁹ Christensen CM. 1987. Field and Storage Fungi. pp. 211-232 en: Beuchat LR, ed. *Food and Beverage Mycology*. New York, Van Nostrand Reinhold.

ambiental (70 - 90%) y menor contenido de agua en las semillas (15 - 20%), y el intervalo de temperatura es más amplio (0 - 45°C) que en el caso de la colonización en el campo. Además pueden crecer a menor concentración de oxígeno⁹. La competencia entre las poblaciones microbianas mixtas que se encuentran suele constituir una desventaja para la producción de las micotoxinas.

1.2.2. Producción de micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Actualmente se conocen unos 400 tipos de toxinas fúngicas. Además éstas son específicas, es decir, cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, más restringido es el número de especies de hongos productores. Por ejemplo, la aflatoxina B1 es generada por tres especies estrechamente relacionadas, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* y *Aspergillus parasiticus*¹⁰, mientras que la patulina es producida por unas once especies de *Penicillium*, tres de *Aspergillus* y dos más de *Byssochlamys*¹¹.

Otro aspecto importante en la producción de estos metabolitos secundarios es la enorme variabilidad observada para una especie dada. Por ejemplo la especie *Penicillium roqueforti* produce algunas micotoxinas en las condiciones de laboratorio pero no en los quesos madurados. Los rendimientos de la producción de toxina T-2 por parte de cepas de *Fusarium sporotrichioides* varían

¹⁰ Hocking AD. 1997. Toxigenic *Aspergillus* species. pp. 393-405 en: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington.

¹¹ Moss MO. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. pp. 37-56 en: Smith JF, Henderson RS, eds. Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Ratón.

considerablemente cuando crecen en el laboratorio, y no todas las cepas de *Aspergillus flavus* son aflatoxigénicas¹¹. Por otra parte, como ya se ha comentado previamente, la temperatura tiene una gran influencia sobre el crecimiento y la actividad de los mohos.

La producción de micotoxinas en el campo generalmente depende del tipo de producto agrícola. Así, los tricotecenos están asociados a cereales de zonas templadas, mientras que las aflatoxinas se encuentran con más frecuencia en semillas oleaginosas y cereales de zonas cálidas y tropicales, pero no suelen aparecer en cantidades significativas en soja probablemente debido a sustancias inhibidoras que pueda contener el grano¹². También influyen las prácticas agrícolas. La planta sana que crece de forma activa tiene muchas barreras a la infección.

1.3.Registros históricos de la contaminación por micotoxinas

Existen registros bastante antiguos que indican claramente las devastadoras consecuencias del consumo de productos contaminados por mohos. Se han descrito muertes por ergotismo en el Viejo Testamento¹³ y el declive de la civilización etrusca ha sido atribuido por algunos investigadores a toxinas de fusarium (toxina T-2 y zearalenona)¹⁴. Además, en algunas de las tumbas descubiertas en Egipto, se encontró

¹² Strange RN. 1991. Natural occurrence of mycotoxins in groundnuts, cottonseed, soya, and cassava. pp. 341-362 en: Smith JE, Henderson RS, eds. Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Ratón.

¹³ Schoental R. 1984. Mycotoxins and the bible. Persp Biol Med 28:117-20.

¹⁴ Schoental R. 1991. Mycotoxins, porphyrias and the decline of the Etruscans. J Appl Toxicol 11:453-4.

la presencia de ocratoxina A, a la cual se hizo responsable de la misteriosa muerte de varios arqueólogos.

Históricamente, la micotoxicosis más conocida es el ergotismo. Esta enfermedad fue conocida también como “Fuego de San Antonio”. Entre los siglos VIII y XVI aparecieron varios casos epidémicos y la razón posible se atribuyó a las pobres condiciones alimenticias de la población, particularmente al consumo de harina contaminada con alcaloides del ergotismo. Dichos alcaloides del ergotismo, que provocaban gangrena y convulsiones, a menudo también fueron relacionados con episodios de brujería o de posesión, como ocurrió en el caso de los Juicios de las Brujas de Salem en Massachusetts.

En el siglo pasado, el primer caso reconocido de intoxicación aguda por ergotismo ocurrió en Francia en 1954¹⁵. Durante los años 1977 y 1978 se produjo en Etiopía el último caso registrado de un brote de ergotismo gangrenoso el cual afectó a cerca de 140 individuos de los cuales, aproximadamente un tercio murió¹⁶. La causa de este desastre se atribuyó a una temporada húmeda muy larga que favoreció el crecimiento de avena salvaje contaminada con *Claviceps purpurea* uno de los principales hongos productores de alcaloides del ergotismo.

Un tipo de micotoxicosis muy frecuente en la Segunda Guerra Mundial en Rusia fue la Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA). Esta enfermedad, que afectaba al sistema nervioso central y a menudo terminaba con la muerte del enfermo, se

¹⁵ Van Dongen PWJ, De Groot ANJA. 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. Eur J Obst Gyn Rep Biol 60:109–16.

¹⁶ King B. 1979. Outbreak of ergotism in Wollo, Ethiopia. Lancet 8131:1411.

produjo por el consumo de cereales contaminados con hongos¹⁷. Posteriormente se ha demostrado que la toxina responsable de la enfermedad fue la T-2 producida por una variedad de hongo denominada *Fusarium sporotrichoides*. Se ha estimado que esta enfermedad fue responsable de la muerte de casi 100000 personas¹⁸. Simultáneamente, en Ucrania apareció la enfermedad denominada Stachybotryotoxicosis, que provocó la muerte de miles de caballos. El hongo causante fue el *Stachybotrys chartarum*, aunque inicialmente se creyó que la enfermedad era ATA debido a la similitud de los síntomas detectados. En la actualidad se sabe que ambas micotoxinas pertenecen al grupo de tricotecenos y tienen estructura similar.

La micotoxicología moderna empezó en la década de los 60 en el Reino Unido con la identificación de las aflatoxinas como las causantes de la muerte de aproximadamente 100.000 crías de pavo debido al consumo de piensos que contenían cacahuetes contaminados. Además miles de animales de granja y humanos se vieron también afectados¹⁹.

El conocimiento posterior de la carcinogenicidad de las aflatoxinas y su naturaleza inmunosupresora, así como el descubrimiento de que las aflatoxinas no sólo eran capaces de causar problemas en el grano almacenado sino que, además, contaminaban ciertas cosechas antes de su recogida, el problema de las micotoxinas

¹⁷ Richard, J.L., 2003. Mycotoxins and human disease. In: Anaissie, E.J., McGinnis, M.R., Pfaller, M.A. (Eds.), *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone, New York, pp. 589–598.

¹⁸ Joffe AZ. 1978. *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* as principal causal agents of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie TD, Moorhouse LG, editors. *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicosis: an encyclopedia handbook*, Vol. 3. New York: Marcel Dekker. p 21–86.

¹⁹ Rodricks JV, Stoloff L. 1977. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food-producing animals. In: Rodricks JVC, Hesseltine W, Mehlman MA, editors. *Mycotoxins in human and animal health*. Park Forest South, Ill.: Patholox Publishers. 3:67–9.

se convirtió en un tema multidisciplinar involucrando a químicos analíticos, microbiólogos, ingenieros agrónomos, entomólogos, fitopatólogos, genetistas, médicos y veterinarios y agricultores y granjeros. Los esfuerzos conjuntos entre estos grupos llevaron al descubrimiento de muchas nuevas micotoxinas y al estudio de sus efectos tóxicos y enfermedades en animales.

1.4.Las micotoxinas y los riesgos para la salud: Micotoxicosis

El nombre micotoxina combina la palabra griega para hongo “mykes” y la latina “toxicum” que significa tóxico o veneno²⁰. La enfermedad causada por las micotoxinas se denomina de manera general micotoxicosis. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, y una secundaria al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes con micotoxinas. Por ejemplo, la presencia de aflatoxina M₁ en la leche materna es consecuencia de la ingesta de aflatoxina B₁ en los alimentos, pudiendo producir micotoxicosis en el bebé²¹. Las características de una micotoxicosis son las siguientes:

- no es una enfermedad transmisible,
- el tratamiento con fármacos o antibióticos tiene poco o ningún efecto,
- en los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del hongo,

²⁰ World Health Organization. 1978. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. Environmental health criteria 105. Geneva, Switzerland: WHO. p 13–6.

²¹ Jonsyn FE et al. 1995a. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. Mycopathologia 131: 121-126.

- el brote está comúnmente asociado a un alimento o forraje específico,
- el examen del alimento o forraje sospechoso revela signos de actividad fúngica.

La gravedad de una micotoxicosis depende de la toxicidad de la micotoxina, la dosis de la misma, la edad y las condiciones alimenticias del individuo afectado. De forma general, la población de los países desarrollados está menos expuesta a las micotoxinas que la de los países en vías de desarrollo debido a que en los primeros se aplican tecnologías modernas de manejo y preservación de alimentos y existen regulaciones estrictas sobre el contenido de las mismas en productos alimenticios.

Las micotoxinas de mayor preocupación para la salud humana son las aflatoxinas, la ocratoxina A, los tricotecenos, la zearalenona, las fumonisinas y la patulina. Varias de estas toxinas se pueden producir antes de la recogida de la cosecha (aflatoxinas, tricotecenos), mientras que otras se producen principalmente durante las etapas posteriores (fumonisinas, ocratoxina A). Los síntomas generales de las micotoxicosis en humanos son vómitos, diarrea y otros trastornos gastrointestinales. En general, las micotoxinas tienen carácter inmunosupresor, destacando los tricotecenos (tales como DON y las toxinas T-2 y HT-2), los cuales inhiben la síntesis de proteínas y la proliferación de células²².

En animales, las micotoxinas producen un amplio intervalo de efectos nocivos tales como reducción en la productividad animal, aumento del número de enfermedades y de sus efectos debido al carácter inmunosupresor, daños en órganos

²² Sharma RP. 1993. Immunotoxicity of mycotoxins. *J Dairy Sci* 76:892–897.

vitales, disminución de la capacidad reproductora; y, en algunos casos extremos, la muerte. Si el alimento contiene una mezcla de micotoxinas, estos efectos se agravan²³.

Generalmente, las micotoxinas que aparecen en los piensos y forrajes causan irritación del tracto digestivo y son capaces de reducir la absorción de nutrientes. Cuando un animal ingiere un alimento contaminado con micotoxinas, éstas, normalmente, interfieren con los sistemas endocrino y exocrino. Por ejemplo, la zearalenona afecta al sistema reproductor debido a su efecto estrogénico. Dicho efecto es el resultado de la afinidad que tienen la zearalenona y sus derivados a unirse con los receptores de estrógeno de los animales²⁴. Además, el crecimiento y la proliferación de mohos en los forrajes hacen que se reduzca el nivel de nutrientes disponible como vitaminas y aminoácidos²⁵.

1.5. Micotoxinas relevantes para la seguridad alimentaria

Como se ha mencionado anteriormente, se han descubierto unas 400 micotoxinas, la mayoría de ellas desde la década de los 60. Generalmente se

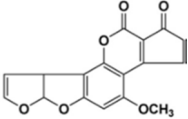
²³ Smith TK, Seddon IR. 1998. Toxicological synergism between Fusarium mycotoxins in feeds. In: Lyons TP, Jacques KA, editors. Biotechnology in the feed industry. Loughborough, U.K.: Nottingham Univ. Press. p 257–269.

²⁴ Klang DT, Kennedy BJ, Pathre SV, Mirocha CJ. 1978. Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Res* 38:3611.

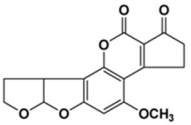
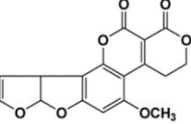
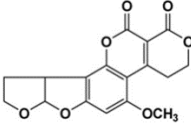
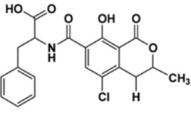
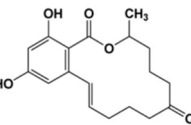
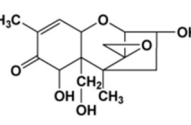
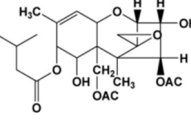
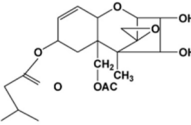
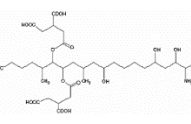
²⁵ Kao C, Robinson RJ. 1972. *Aspergillus flavus* deterioration of grain: its effect on amino acids and vitamins of whole wheat. *J Food Sci* 37:261–263.

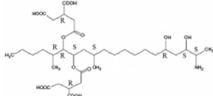
organizan en grupos basados en la similitud estructural y efectos tóxicos de las mismas²⁶. De acuerdo a su estructura, las micotoxinas se clasifican en ciclopéptidos, policetoácidos, terpenos y metabolitos nitrogenados. En la Tabla 1 se muestran la estructuras, constantes octanol-agua y de acidez de las micotoxinas de mayor relevancia en alimentos y forrajes.

Tabla 1: Estructura, constantes octanol:agua (Log Ko,w) y constantes de acidez (pKa) de las micotoxinas más relevantes en alimentos y forrajes

Micotoxina	Estructura	Log Ko,w	pKa
Aflatoxina B1		0.448	-

²⁶ Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 16:497–516.

Aflatoxina B2		0.369	-
Aflatoxina G1		-0.175	-
Aflatoxina G2		-0.254	-
Ocratoxina A		4.370	3.29
Zearalenona		3.827	7.41
Desoxinivalenol		-1.409	11.91
Toxina T-2		2.254	13.23
Toxina HT-2		2.266	13.26
Fumonisina B1		2.200	3.64

Fumonisina B2		4.389	3.64
---------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-------	------

A finales del siglo pasado se publicó un informe bastante completo en el que se mostraba la distribución de las micotoxinas a nivel mundial²⁷. Este informe reflejaba que, por ejemplo, en África y el subcontinente indio, representado por la India, Pakistán, Bangladesh, Nepal y Bután (también Afganistán), las aflatoxinas son las principales toxinas; en Australia, son las aflatoxinas y las fumonisinas; en Norteamérica, las aflatoxinas, la ocratoxina A, la zearalenona y el desoxinivalenol; en Sudamérica, las aflatoxinas, las fumonisinas, la ocratoxina A, el desoxinivalenol y la toxina T-2; en Europa del Este la zearalenona y el desoxinivalenol mientras que en las regiones occidentales son la ocratoxina A, la zearalenona y el desoxinivalenol las más frecuentes. Sin embargo, con la globalización se está favoreciendo la expansión de las micotoxinas a otras regiones en las que inicialmente no estaban presentes.

En las investigaciones que se incluyen en esta Tesis Doctoral, se han desarrollado metodologías para la determinación de micotoxinas pertenecientes a los grupos de aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos y fumonisinas así como la

²⁷ Devegowda G, Radu MVL, Nazar A, Swamy HVLM. 1998. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. In: Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium, Biotechnology in Feed industry. Passport of the year 2000. Nottingham, U.K.: Nottingham Univ. Press.

zearalenona, y por tanto, a continuación describiremos con más detalle algunas de las propiedades de estas familias de micotoxinas.

1.5.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas caracterizadas por elevada toxicidad, mutagenicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad y producidas por hongos pertenecientes a diferentes especies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*²⁸. Aunque las concentraciones más elevadas se encuentran en cultivos que crecen o son almacenados en regiones tropicales y subtropicales, la importancia de estos productos en el comercio internacional hace que las aflatoxinas no sean sólo un problema de los estados productores sino también de los países importadores.

Las aflatoxinas se encuentran en una gran variedad de productos alimentarios tan importantes como los cereales (maíz, arroz, trigo), especias (chili, pimienta negra, cilantro, cúrcuma, jengibre), semillas oleaginosas (soja, girasol), frutos secos (almendras, pistachos, nueces), leche (humana y animal) y mantequilla. En la mayoría de áreas del mundo, productos primarios como los cereales y los frutos secos o productos animales son examinados de manera rutinaria para controlar el nivel de aflatoxinas.

²⁸ O’Riordan MJ, Wilkinson MG. 2008. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chem* 107:1429–35.

Hasta ahora se han identificado 18 tipos diferentes de aflatoxinas siendo las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 y AFM2) las más importantes. Las aflatoxinas M1 y M2 son los metabolitos hidroxilados de las aflatoxinas B1 y B2 y se producen cuando las vacas u otros rumiantes ingieren forrajes o piensos contaminados con estas micotoxinas. Dichos metabolitos son excretados en la leche y pueden, posteriormente, contaminar otros productos lácteos.

Las aflatoxinas son sustancias cristalinas, muy solubles en disolventes moderadamente polares tales como cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido. Su solubilidad en agua está comprendida en el intervalo 10-20 mg L⁻¹. Una disolución preparada en cloroformo o benceno es estable durante años si se mantiene refrigerada y en la oscuridad. El anillo lactona hace que sean susceptibles a la hidrólisis alcalina por lo que se ha investigado la posibilidad de eliminarlos en los alimentos mediante tratamiento con amoníaco o lejía. Sin embargo, estos procesos están restringidos por la posible toxicidad de los productos de descomposición que se originan. Las cuatro aflatoxinas principales (B1, B2, G1 y G2) emiten fluorescencia azul o verde cuando se irradian con luz UV²⁹.

Las aflatoxinas poseen toxicidad aguda y crónica. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) ha clasificado 4 de ellas (AFB1, AFG1, AFB2, AFG2) dentro del Grupo 1, que

²⁹ Stroka J, Anklam E. 2000. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* 904:263-8.

corresponde a los carcinógenos³⁰. De hecho, la aflatoxina B1 es uno de los hepatocarcinógenos más potentes, y por tanto, la exposición crónica a largo plazo a niveles sumamente bajos de aflatoxinas en la dieta es un factor de preocupación por sus implicaciones en la salud humana. La carcinogenicidad de esta toxina ha sido estudiada en, al menos, 12 especies animales diferentes. Además, la AFB1 es un agente mutagénico que causa aberraciones cromosómicas en una amplia variedad de plantas, animales y células humanas. Se considera que la carcinogenicidad y la mutagenicidad de las aflatoxinas B1, G1 y M1 se deben a la formación de un epóxido reactivo en la posición 8, 9 del anillo furano terminal que se une covalentemente al ácido nucleico. Aunque las aflatoxinas G1 y M1 han sido estudiadas en menor medida, parece que son, en cuanto a su efecto toxicológico, similares a la aflatoxina B1. Tienen un efecto carcinogénico en hígado ligeramente menor que la B1, pero, sin embargo, su carcinogenicidad en riñones es ligeramente mayor.

El envenenamiento por aflatoxinas se denomina comúnmente aflatoxicosis. Actualmente, se estima que la ingesta humana de aflatoxinas oscila entre 0 y 30000 ng Kg⁻¹ por día con un valor medio de 10 a 200 ng Kg⁻¹ por día³⁰. El consumo de alimentos o piensos contaminados con elevados niveles de aflatoxinas puede llevar a una aflatoxicosis aguda mientras que la ingesta regular, incluso a bajas concentraciones (ppb), puede ser responsable de efectos crónicos a medio y largo plazo como, por ejemplo, el retraso en el crecimiento y la pérdida de peso en niños o conducir al desarrollo de cáncer hepatocelular. Las aflatoxinas también se han asociado al “Kwashiorkor”, una forma de desnutrición que ocurre cuando no hay

³⁰ Revankar SG. 2003. Clinical implications of mycotoxins and stachybotrys. Am J Med Sci 325:262–74.

suficiente proteína en la dieta. Existen estudios en los que se ha detectado la presencia de AFB1 y aflatoxicol (un producto metabólico de la AFB1) en suero, hígado, orina y heces de niños que sufrían dicha enfermedad. Se ha estimado que el 90% de los niños del África Occidental están expuestos a las aflatoxinas debido al consumo de maíz y cacahuets contaminados, lo cual lleva a un retraso importante en su crecimiento.³¹

En los años 70, después de producirse varios casos graves de aflatoxicosis aguda en algunas partes de Asia y África, se informó de lesiones severas en el hígado de adultos malnutridos, con resultados fatales en muchos de ellos. En el África tropical las aflatoxinas son percibidas, junto con el virus de la hepatitis B, como cofactor causante del cáncer hepático (carcinoma hepatocelular)³². El virus de la hepatitis B interfiere con la habilidad de los hepatocitos para metabolizar las aflatoxinas, permitiendo, así, que un conjugado AFM1-ADN perdure por más tiempo en el hígado, incrementando la probabilidad de que se dañen los genes supresores de los tumores.

1.5.2. Ocratoxinas

³¹ Egal S, Hounsa A, Gong YY, Turner PC, Wild CP, Hall AJ, Hell K, Cardwell KF. 2005. Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *Int J Food Microbiol* 104:215–24.

³² Williams JH, Phillips TD, Jollym PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80:1106–1122.

La ocratoxina A (OTA) es la más importante y más común de este grupo de micotoxinas estructuralmente relacionadas. Consta de una mitad que es un derivado policétido de la dihidroxiisocumarina unido a la fenilalanina (que constituye la otra mitad) a través del grupo carboxílico (Tabla 1). La ocratoxina B difiere en estructura sólomente por la ausencia del átomo de cloro. Aparece también de forma natural pero es mucho menos tóxica. Otras moléculas relacionadas son la ocratoxina C, la ocratoxina α y la ocratoxina β .

La OTA es un compuesto cristalino incoloro, que exhibe fluorescencia azul cuando se irradia con luz UV. La sal de sodio es soluble en agua. La forma ácida es moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares como cloroformo, metanol y acetonitrilo. Puede almacenarse disuelta en etanol, refrigerada y protegida de la luz, durante, al menos, un año.

La OTA tiene efectos nefrotóxicos, teratogénicos y genotóxicos. En los riñones puede causar tanto lesiones agudas como crónicas. Los valores LD₅₀ varían de manera muy significativa dependiendo de la especie, siendo los perros especialmente susceptibles. El efecto teratogénico se ha demostrado en ratones, ratas, hamsters y pollos, pero no en cerdos. Por otro lado, se ha comprobado, mediante ensayos tanto in vitro como in vivo que la OTA es genotóxica, pero el mecanismo de dicha genotoxicidad no está todavía claro. La exposición humana a OTA se ha demostrado mediante su detección en fluidos biológicos como la sangre y la leche materna.

La OTA generalmente aparece durante el almacenamiento de los productos frescos (cereales, café, cacao, pasas, especias y en cerdo también) y, de manera ocasional, en el campo, en uvas. En regiones tropicales es producida, principalmente,

por algunas especies de *Aspergillus*, como *A. ochraceus* y, en áreas templadas como Canadá, el este y el noroeste de Europa y algunas partes de Sudamérica, el principal hongo responsable de su producción es el *Penicillium verrucosum*.

La primera vez que se documentó a la ocratoxina A como un contaminante natural de cereales, se hizo en una muestra de maíz. Las concentraciones encontradas están normalmente por debajo de $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ pero cuando los productos no son almacenados correctamente, se pueden encontrar concentraciones más elevadas. En las regiones templadas, podemos encontrar una proporción significativa de muestras de cereales contaminadas con cantidades muy bajas, inferiores a $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ aunque unas pocas podrían contener niveles mucho mayores.

1.5.3. Tricotecenos

Los tricotecenos son una familia de sesquiterpenoides tricíclicos que se caracterizan por tener, en su estructura química, un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y un anillo epóxido en la posición 12, 13 (Tabla 1). Son producidos principalmente por unas pocas especies de *Fusarium* (por ejemplo, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum* y *F. poae*), aunque también pueden ser producidos por especies de otros géneros como *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*. Aunque el número de compuestos de esta familia es del orden de cientos, sólo unos pocos son importantes desde el punto de vista agrario y de la seguridad alimentaria. El género *Fusarium* es el más importante dentro del grupo de hongos productores de micotoxinas apareciendo frecuentemente en las cosechas hasta más de 20 especies diferentes. Además de producir micotoxinas, estos hongos producen otros patógenos

de plantas que causan una serie de enfermedades graves en los cultivos en crecimiento.

Los tricotecenos se dividen en cuatro grupos (A-D) de acuerdo a la naturaleza de sus grupos funcionales. Los del tipo A (por ejemplo, toxinas T-2 y HT-2 y diacetoxiescirpenol) y los del tipo B (por ejemplo, desoxinivalenol, nivalenol y 3-acetil-desoxinivalenol) son los más importantes. Los tricotecenos del tipo A tienen un grupo hidroxilo esterificado en la posición C-8 en vez de una función oxigenada, la cual es característica de los del tipo B (Tabla 1). Debido a esta característica química los tricotecenos del tipo A son menos polares y, por tanto, solubles en disolventes no polares (acetato de etilo, éter dietílico ether y acetona) mientras que los del tipo B se solubilizan mejor en disolventes polares como metanol o acetonitrilo. Los tricotecenos del tipo C tienen un segundo grupo epóxido en las posiciones C-7, C-8, C-9 o C-10 (por ejemplo, la crotocina) y los del tipo D contienen un anillo macrocíclico entre los carbonos 4 y 7 con dos uniones éster (por ejemplo, satratoxina, roridina). Esta familia de compuestos es químicamente estable y pueden persistir, una vez formados, durante largos períodos. A elevadas temperaturas o en condiciones fuertemente ácidas, se produce un reordenamiento de su esqueleto debido a la apertura del anillo epóxido.

Los tricotecenos poseen toxicidad aguda a bajas concentraciones aunque dicha toxicidad varía considerablemente. La toxina T-2 y las micotoxinas macrocíclicas son mucho más tóxicas que el desoxinivalenol, pero su presencia en productos agrícolas es menos común. La toxicidad aguda de los tricotecenos se caracteriza por trastornos gastrointestinales, como vómitos, diarrea e inflamación, irritación de la piel, pérdida

de apetito, aborto, anemia y leucopenia. Este grupo de toxinas es extremadamente citotóxico e inmunosupresor.

La Aleucia tóxica alimentaria (ATA) es la micotoxicosis de tricotecenos más conocida en humanos. La exposición continua a los tricotecenos da lugar a erupciones cutáneas, que pueden convertirse en lesiones necróticas. Han sucedido muchos brotes de enfermedades agudas en humanos, sobre todo en Asia, atribuidos al consumo de granos contaminados con *Fusarium*. En algunas muestras de tales brotes se encontraron concentraciones elevadas de desoxinivalenol (DON).

DON se encuentra frecuentemente en productos alimentarios y piensos preparados a partir de maíz y trigo contaminados. Es la toxina de *Fusarium* más detectada. La presencia de DON ha sido muy documentada. Sólo en Estados Unidos, simulaciones con ordenador reflejaron que los costes anuales debidos a las pérdidas por cosechas contaminadas con DON eran de 637 millones de dólares en el caso de trigo y 18 millones en maíz. Se considera que el desoxinivalenol es extremadamente estable y puede resistir varios métodos de procesado de alimentos (como la molienda o la pulverización). Además, se ha documentado, su presencia y la de su metabolito deepoxi-DON, en bajas cantidades, en huevos³³ y cerveza³⁴.

En general, los tricotecenos se encuentran en granos de cereales como trigo, cebada, maíz, avena, arroz, semillas de soja y en productos derivados como cereales

³³ Valenta H, Danicke S. 2005. Study on the transmission of deoxynivalenol and de-epoxydeoxynivalenol into eggs of laying hens using a hi-performance liquid chromatography ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity. *Mol Nutr Food Res* 49:779–85.

³⁴ Scott PM. 1996. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J AOAC Int* 79:875–82.

de desayuno y cerveza. Existen también informes de su presencia en otros productos alimentarios entre los que se encuentran las patatas, los plátanos, las semillas de mostaza, los cacahuets y las semillas de girasol.

1.5.4. Zearalenona

La zearalenona es una lactona del ácido resorcíclico, producida por una serie de especies de *Fusarium* entre las que se encuentran *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. crookwellense* (Tabla 1). Estas especies colonizan cereales y tienen tendencia a desarrollarse durante las temporadas de frío y crecimiento húmedo.

La zearalenona es un compuesto cristalino de color blanco el cual exhibe una fluorescencia verde/azul cuando se excita con luz UV de longitud de onda larga (360 nm) y una fluorescencia verde más intensa cuando la fuente de excitación UV usa longitudes de onda más cortas (260 nm). La solubilidad en agua es aproximadamente de 0.02 g L⁻¹. Es ligeramente soluble en hexano y soluble en benceno, acetonitrilo, metanol, etanol y acetona. Es soluble, también, en disoluciones acuosas alcalinas. En cultivos fúngicos se forman una serie de metabolitos estrechamente relacionados, pero hay pocas pruebas de que esto ocurra en los productos alimentarios.

La zearalenona es un estrógeno natural causante de efectos hormonales en animales como el cerdo. Su potencia estrógena ha sido comparada con otros estrógenos vegetales en ensayos con células de cáncer de mama y se llegó a la conclusión de que, junto con el 17- β -estradiol, la zearalenona es uno de los xenoestrógenos más potentes. Estudios en animales han demostrado que la zearalenona se absorbe rápidamente tras la administración por vía oral y puede ser

metabolizada por el tejido intestinal en cerdos y posiblemente también en humanos con la formación de α - y β -zearalenol, los cuales son posteriormente conjugados con ácido glucurónico. Las proporciones de estos productos pueden variar considerablemente entre especies. Se requieren más estudios para considerar a la zearalenona como un agente mutagénico o carcinogénico en humanos.

La zearalenona aparece en casi todos los productos agrícolas y se ha encontrado en granos para consumo directo (maíz, concretamente), en productos alimentarios tales como cereales de desayuno, cerveza de maíz, harina de trigo, pan y nueces y en piensos. Ya que la zearalenona es metabolizada por levaduras durante el proceso de producción de cerveza, principalmente a β -zearalenol, este metabolito debería ser controlado cuando se analicen muestras de cerveza. Debido a que la zearalenona y sus metabolitos son producidos por el mismo hongo que produce desoxinivalenol y nivalenol, no es sorprendente encontrar mezclas de estas micotoxinas en la misma muestra.

1.5.5. Fumonisin

Las fumonisin son una familia de al menos 15 micotoxinas estrechamente relacionadas que aparecen frecuentemente en maíz. La más importante es la fumonisin B1. Las fumonisin se identificaron hacia mediados de los años 80, aunque sus efectos sobre el ganado equino ya se conocían por lo menos 150 años antes.

Son metabolitos polares producidos por diferentes especies de *Fusarium*, entre las que se encuentran *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*,

F. dlamini y F. napiforme. Sus estructuras están constituidas por una larga cadena hidrocarbonada e hidroxilada que contiene grupos metilo y amino (Tabla 1). La fumonisin B1 se diferencia de la fumonisin B2 en que la primera tiene un grupo hidroxilo extra en la posición 10. Las fumonisinas a menudo aparecen junto con otras micotoxinas, como por ejemplo las aflatoxinas, el desoxinivalenol y la zearalenona.

Las fumonisinas son solubles en disolventes polares debido a sus 4 grupos carboxilo libres, los grupos hidroxilo y el grupo amino. Su insolubilidad en muchos disolventes orgánicos como cloroformo o hexano que se usaban habitualmente en análisis explica parcialmente la dificultad que existía originariamente para identificarlas. Las fumonisinas B1 y B2 son estables en metanol si se almacenan a –18°C pero se degradan fácilmente a temperaturas de 25°C y superiores. Sin embargo, existen informes que dicen que son estables por 6 meses a 25°C en una mezcla de acetonitrilo-agua (1:1).

Los efectos de las fumonisinas se han observado durante muchos años en una enfermedad esporádica, que afecta a los caballos, llamada leucoencefalomalacia equina (ELEM). A igualdad de concentraciones, las fumonisinas son mucho menos tóxicas que las aflatoxinas. Sin embargo, las fumonisinas generalmente se encuentran a mayor concentración (niveles de ppm) que las fumonisinas (ppb) en los productos contaminados.

Aun está por determinar el efecto real de las fumonisinas presentes en maíz sobre la salud humana y animal. Las fumonisinas afectan a la síntesis de los esfingolípidos. Dicha alteración ocurre de forma inmediata después de la exposición debido a que la fumonisin inhibe la ceramida sintetasa, un enzima clave en el

metabolismo de los esfingolípidos. Los estudios realizados en animales con fumonisina B1 marcada isotópicamente (isótopo ^{14}C) han mostrado que apenas se absorbe y se elimina rápidamente. En humanos, parece que existe un vínculo entre el alto consumo de maíz en algunas zonas del mundo y la aparición de cáncer de esófago. Se necesitan más estudios epidemiológicos para definir de manera más precisa el papel del F. moniliforme y sus metabolitos en el cáncer de esófago en zonas como China, el norte de Italia y parte de Sudáfrica, donde la incidencia es mayor.

Cuando se identificaron las fumonisinas por primera vez, se consideró que su presencia estaba limitada exclusivamente al maíz. Posteriormente, han aparecido en otros muchos productos, entre los que podemos incluir arroz, sorgo y alubias o judías, pero hasta ahora aparecen en concentraciones mucho más bajas de las que aparecen en maíz. Las inspecciones alimentarias han mostrado que las fumonisinas pueden estar presentes en una serie de productos alimentarios acabados como los cereales de desayuno a base de maíz, la cerveza y aperitivos. No se han detectado aún en leche, carne o huevos.

1.6.Legislación vigente

Se estima que aproximadamente una cuarta parte de los cultivos del mundo ([WHO/FAO Food risk analysis guidelines](#)) están afectados por micotoxinas. Los costes económicos derivados de esta contaminación son imposibles de determinar

con precisión³⁵, pero la FDA estima que sólo en Estados Unidos el coste medio anual de las pérdidas de cosechas como consecuencia de la contaminación por aflatoxinas, las fumonisinas y el desoxinivalenol es de 932 millones de dólares.

Las pérdidas asociadas con las micotoxinas en los países industrializados son fundamentalmente pérdidas de mercado, debidas al rechazo de las cosechas contaminadas y la obligada redirección de su uso o incluso su eliminación en casos de contaminación aguda. En los países en desarrollo, además de estas pérdidas, existen importantes consecuencias sobre la salud. La exposición crónica a elevados niveles de micotoxinas, a menudo combinada con malnutrición, causa diferentes niveles de toxicosis e incluso la muerte³⁶.

Para establecer niveles máximos legales de micotoxinas se deben tener en cuenta muchos aspectos, de manera que en dicho proceso pueden intervenir diferentes organizaciones científicas, autoridades y otros organismos. En la UE, este proceso es responsabilidad de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA; www.efsa.europa.eu). Varios grupos de trabajo y comités de expertos, con delegados de todos los estados miembros, preparan propuestas que posteriormente se remiten al Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y la Salud Animal (Standing Committee on the Food Chain and Animal Health, SCFCAH) para que sean votadas, tras lo cual la Comisión adopta el

³⁵ Wu, F. 2007. Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds In: Morgavi, D.P., Riley, R.T. (Eds.), *Fusarium and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact*. Anim. Feed Sci. Technol.

³⁶ Wu, F., 2004. Mycotoxins risk assessment for the purpose of setting International Regulatory Standards. Environ. Sci. Technol. 38 (15), 4049–4055.

correspondiente Reglamento o Directiva. Además, a lo largo de estas discusiones debe considerarse que la UE es un socio importante en el mercado internacional. Por lo tanto, cuando se preparan niveles máximos permitidos para micotoxinas, tienen que tenerse en cuenta las normas y estándares internacionales (por ejemplo, el Codex Alimentarius) para asegurarse que dicho mercado internacional no se ve obstaculizado sin ninguna justificación.

Una vez se han establecido los límites máximos permitidos es necesario monitorizar el cumplimiento de la legislación tanto en la importación como en la circulación de mercancías. Esto se hace a través de una serie de procedimientos de control y respuesta basados en chequeos aleatorios. En la UE, dicha monitorización la proporciona el Sistema de Alertas Rápidas para Alimentos y Piensos (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF)³⁷. Para hacerse una idea del gran problema que suponen las micotoxinas a nivel mundial basta con repasar los informes de los últimos años del RASFF³⁸. En ellos se puede apreciar que las alertas alimentarias debidas a micotoxinas constituyen un 25-30% del total de alertas registradas por dicho organismo.

Sobre la base del Reglamento (CEE) 315/93³⁹, se han establecido por el Reglamento (CE) 1881/2006² niveles máximos para una serie de micotoxinas en determinados productos alimentarios (Tabla 2). Este Reglamento (CE) 1881/2006 entró en vigor el 1 de marzo de 2007 y en lo que respecta a las micotoxinas, se ha modificado posteriormente en cinco ocasiones. La primera modificación está

³⁷ Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF.
http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.

³⁸ RASFF reports: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff_publications_en.htm.

³⁹ Reglamento (CEE) 315/93 <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1993R0315:20090807:EN:PDF>.

recogida en el Reglamento (CE) 1126/2007⁴⁰, en el cual se fijan niveles máximos para toxinas de Fusarium en maíz y productos derivados del mismo. En 2010 se realizaron modificaciones que han sido recogidas en el Reglamento (UE) 105/2010⁴¹ y en el Reglamento (UE) 165/2010⁴². En el primero se reflejan ciertos cambios en los niveles máximos para OTA y en el segundo para aflatoxinas. Además se especifican nuevos grupos de productos alimentarios para los que existen niveles máximos permitidos de dichas micotoxinas. Las dos últimas modificaciones del Reglamento (CE) 1881/2006 han tenido lugar en el año 2012 y vienen recogidas en el Reglamento (UE) 594/2012⁴³ y en el Reglamento (UE) 1058/2012⁴⁴. En el primero se incluyen nuevos grupos de productos alimenticios regulados para OTA, mientras que en el segundo se establecen niveles máximos permitidos de aflatoxinas en higos secos. Además el Reglamento (CE) 401/2006⁴⁵ (modificado recientemente por el Reglamento (UE) 178/2010⁴⁶) regula los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de micotoxinas en productos alimentarios. Aparte de estas regulaciones que son de obligado cumplimiento por los estados miembros de la UE, la Comisión Europea ha establecido una Recomendación sobre la prevención y la reducción de toxinas de Fusarium en cereales y derivados (Recomendación

⁴⁰ Reglamento (CE) 1126/2007 (http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2007/l_255/l_25520070929en00140017.pdf).

⁴¹ Reglamento (UE) 105/2010 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:050:0008:0012:EN:PDF>).

⁴² Reglamento (UE) 165/2010 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:050:0008:0012:EN:PDF>).

⁴³ Reglamento (UE) 594/2012 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:176:0043:0045:EN:PDF>).

⁴⁴ Reglamento (UE) 1058/2012 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:313:0014:0015:EN:PDF>).

⁴⁵ Reglamento (CE) 401/2006 (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:ES:PDF>).

⁴⁶ Reglamento (UE) 178/2010; <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:052:0032:0043:EN:PDF>.

2006/583/CE⁴⁷). Existen también leyes y regulaciones de carácter nacional en los estados miembros que cubren cualquier producto o micotoxinas no reguladas por la legislación europea.

⁴⁷ Recomendación 2006/583/CE; http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2006/l_234/l_23420060829es00350040.pdf

Tabla 2: Niveles máximos permitidos de micotoxinas en alimentos, legislados por la Unión Europea

Producto alimenticio		Niveles máximos (µg/kg)		
2.1	Aflatoxinas	B1	Suma B1, B2, G1 y G2	M1
2.1.1	Cacahuetes y otras semillas oleaginosas que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios, con la excepción de: los cacahuetes y otras semillas oleaginosas que vayan a molerse para la producción de aceite vegetal refinado	8.0	15.0	-
2.1.2	Almendras, pistachos y huesos de albaricoque que vayan a someterse a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	12.0	15.0	-
2.1.3	Avellanas y nueces del Brasil que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	8.0	15.0	-
2.1.4	Frutos de cáscara arbóreos, salvo los indicados en los puntos 2.1.2 y 2.1.3, que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5.0	10.0	-
2.1.5	Cacahuetes y otras semillas oleaginosas y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes en los productos alimenticios, con la excepción de: y aceites vegetales crudos destinados a ser refinados y aceites vegetales refinados	2.0	4.0	-
2.1.6	Almendras, pistachos y huesos de albaricoque destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	8.0	10.0	-

2.1.7	Avellanas y nueces del Brasil destinadas al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	5.0	10.0	-
2.1.8	Frutos de cáscara arbóreos, distintos de los indicados en los puntos 2.1.6 y 2.1.7, y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	2.0	4.0	-
2.1.9	Frutas pasas, diferentes de los higos secos, que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5.0	10.0	-
2.1.10	Frutas pasas, diferentes de los higos secos, y sus productos transformados para el consumo humano directo o su utilización como ingredientes de productos alimenticios	2.0	4.0	-
2.1.11	Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos de cereales transformados, salvo los productos alimenticios indicados en los puntos 2.1.12, 2.1.15 y 2.1.17	2.0	4.0	-
2.1.12	Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5.0	10.0	-
2.1.13	Leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos	-	-	0.050
2.1.14	Los siguientes tipos de especias: Capsicum spp. (frutas pasas de dicho género, enteras o molidas, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón); Piper spp. (frutos de dicho género, con inclusión de la pimienta blanca y negra); Myristica fragrans (nuez moscada); Zingiber officinale (jengibre); Curcuma longa (cúrcuma); Mezclas de especias que contengan una o varias de estas especias	5.0	10.0	-
2.1.15	Alimentos a base de cereales transformados y alimentos para lactantes y niños de corta edad	0.10	-	-
2.1.16	Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	-	-	0.025
2.1.17	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0.10	-	0.025

2.1.18	Higos secos	6.0	10.0	-
2.2	Ocratoxina A			
2.2.1	Cereales no elaborados		5.0	
2.2.2	Todos los productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.2.9, 2.2.10 y 2.2.13		3.0	
2.2.3	Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)		10.0	
2.2.4	Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble		5.0	
2.2.5	Café soluble (café instantáneo)		10.0	
2.2.6	Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15 % vol) y vino de frutas		2.0	
2.2.7	Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas		2.0	
2.2.8	Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo		2.0	
2.2.9	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad		0.50	
2.2.10	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes		0.50	
2.2.11	Especias, incluyendo especias secas: Piper spp. (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra); Myristica fragrans (nuez moscada); Zingiber officinale (jengibre); Curcuma longa (curcuma); Capsicum spp. (frutos de dicho género secos, enteros o pulverizados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón); Mezclas de especias que contengan una o más de las especias antes mencionada		15	

2.2.12	Regaliz (Glycyrrhiza glabra, Glycyrrhiza inflata y otras especies)	
2.2.12.1	Raíz de regaliz, ingrediente para infusiones	20
2.2.12.2	Extracto de regaliz, para uso alimentario, especialmente en bebidas y confitería	80
2.2.13	Gluten de trigo no vendido directamente al consumidor	8.0
2.4	Desoxinivalenol	
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, excepto el destinado a mollienda por vía húmeda	1750
2.4.4	Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales, salvado y germen como producto final comercializado para el consumo humano directo, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.4.7, 2.4.8 y 2.4.9	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 mollienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, clasificadas en los códigos NC 1103 13 u 1103 20 40, y otros productos de la mollienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904 10 10	750

2.4.9	Fraciones de la mollienda del maiz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, clasificadas en el código NC 1102.20, y otros productos de la mollienda del maiz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904.10.10	1250
2.5	Zearalenona	
2.5.1	Cereales no elaborados distintos al maiz	100
2.5.2	Maiz no elaborado, excepto el destinado a mollienda por vía húmeda	350
2.5.3	Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales, salvado y germen como producto final comercializado para el consumo humano directo, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.5.6, 2.5.7, 2.5.8, 2.5.9 y 2.5.10	75
2.5.4	Acetle de maiz refinado	400
2.5.5	Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno, excluidos los aperitivos de maiz y los cereales para el desayuno a base de maiz	50
2.5.6	Maiz destinado al consumo humano directo, aperitivos de maiz y cereales para el desayuno a base de maiz	100
2.5.7	Alimentos elaborados a base de cereales (excluidos los alimentos elaborados a base de maiz) y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	20
2.5.8	Alimentos elaborados a base de maiz para lactantes y niños de corta edad	20
2.5.9	Fraciones de la mollienda del maiz con un tamaño de partícula > 500 micras, clasificadas en los códigos NC 1103.13 u 1103.20.40, y otros productos de la mollienda del maiz con un tamaño de partícula > 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904.10.10	200
2.5.10	Fraciones de la mollienda del maiz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, clasificadas en el código NC 1102.20, y otros productos de la mollienda del maiz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904.10.10	300

2.6	Fumonisin	Suma de B1 y B2
2.6.1	Maíz no elaborado, excepto el destinado a mollienda por vía húmeda	4000
2.6.2	Maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.6.3 y 2.6.4	1000
2.6.3	Cereales para el desayuno a base de maíz y aperitivos	800
2.6.4	Alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
2.6.5	Fracciones de la mollienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, clasificadas en los códigos NC 1103 13 u 1103 20 40, y otros productos de la mollienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904 10 10	1400
2.6.6	Fracciones de la mollienda del maíz con un tamaño de partícula < 500 micras, clasificadas en el código NC 1102 20, y otros productos de la mollienda del maíz con un tamaño de partícula < 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904 10 10	2000
	Toxinas T-2 y HT-2	Suma de toxinas T-2 y HT-2
	Cereales no elaborados y productos a base de cereales	-

1.7. Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en productos agroalimentarios.

La cuantificación de micotoxinas en productos agroalimentarios a los niveles requeridos por la legislación vigente (Tabla 2) constituye un gran reto analítico dado la gran heterogeneidad de la muestra, la complejidad de las matrices implicadas y la sensibilidad requerida para algunos de estos metabolitos (μgKg^{-1}). A continuación se describen las problemáticas asociadas a esta cuantificación y se resumen las características de los métodos descritos hasta la fecha.

1.7.1. Muestreo

El muestreo juega un papel crucial en la exactitud de la determinación de micotoxinas ya que éstas pueden estar distribuidas de manera muy heterogénea en los productos agroalimentarios. Se asume que las micotoxinas están homogéneamente distribuidas en muestras líquidas, sin embargo, dada la naturaleza al azar de la contaminación fúngica, la distribución en muestras sólidas será muy irregular.

En los Reglamentos 401/2006 y 178/2010, la UE ha fijado los criterios que deben cumplirse en la etapa de muestreo para la cuantificación de micotoxinas. Este reglamento incluye métodos de muestreo y análisis para aflatoxinas, ocratoxina A, patulina y toxinas de *Fusarium* en cereales, frutas pasas, zumos de frutas, mosto y vino, cacahuetes y demás frutos secos, especias, leche, café, y productos derivados de todos los anteriores además de en alimentos para bebés y niños.

Como regla general, debe obtenerse una muestra primaria relativamente grande y que represente a un lote, reducirla en tamaño de partícula y en volumen para tener una cantidad manejable y, finalmente, realizar el análisis de una pequeña porción representativa. Los mencionados Reglamentos regulan el número de submuestras que se deben tomar de distintos lugares de un lote dependiendo del peso del lote completo. Esto puede representar un tamaño total de la muestra demasiado grande, hasta 30 Kg en el caso de la determinación de aflatoxinas en higos secos, cacahuetes y demás frutos secos. Sin embargo, también se considera que el manejo y la preparación de grandes cantidades de muestra representan una gran dificultad a la hora de implementar dichos planes de muestreo, especialmente en relación al proceso de validación de métodos de muestreo. La regulación de la UE, por tanto, estipula que las muestras (agregadas) destinadas al consumo directo por el hombre sean divididas en hasta tres muestras (de laboratorio) de 10 Kg para su homogenización y análisis. Esta subdivisión no es necesaria para productos que vayan a ser objeto de una posterior selección o procesamiento antes de su consumo o que se usen como ingredientes.

La Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration (GIPSA) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) desarrolló una guía general para el muestreo de cereales⁴⁸, arroz⁴⁹ y lúpulo⁵⁰. La FDA está constantemente actualizando su Investigative Operation Manual (IOM) el cual

⁴⁸ Grain Inspection Handbook. Book I: Grain Sampling. Washington (DC): USDA Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration. Available: <http://archive.gipsa.usda.gov>.

⁴⁹ Rice Inspection Handbook. Chapter 2: Sampling. Washington (DC): USDA Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration. Available: <http://www.gipsa.usda.gov>.

⁵⁰ Hop Inspection Handbook. Chapter 2: Sampling. Washington (DC): USDA Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration. Available: <http://www.gipsa.usda.gov>.

describe procedimientos generales para los investigadores de campo e inspectores e incluye información sobre el muestreo así como esquemas de muestreo para diferentes situaciones⁵¹. Contiene un esquema de muestreo detallado para el análisis de micotoxinas en el cual figuran tamaños de muestra dependiendo del tipo de producto y distingue entre muestras tomadas para vigilancia (muestra inicial) y muestras de seguimiento en el caso de encontrar muestras contaminadas.

1.7.2. Preparación y tratamiento de muestra

Sólo unas pocas técnicas analíticas, como, por ejemplo, las técnicas ópticas basadas en espectroscopia infrarroja, son capaces de detectar micotoxinas directamente en muestras de cereales triturados. Sin embargo, la aplicación de dichas técnicas es todavía limitada debido a la gran dependencia que tienen de la matriz y a la falta de materiales de calibración apropiados.

Los métodos analíticos tanto de cuantificación como de “screening” normalmente requieren una extracción con disolventes para aislar la micotoxina de la matriz de la muestra, y una posterior etapa de limpieza del extracto para evitar o reducir los efectos de los componentes de la matriz.

Para la extracción se han usado diferentes disolventes o combinaciones de los mismos en diferentes proporciones (cloroformo, tolueno, metanol-agua, acetonitrilo-agua), algunas veces con la adición de modificadores (ácidos, bases,

⁵¹ Investigative Operation Manual. Washington (DC): Food and Drug Administration. Available: <http://www.fda.gov>.

buffers, etc), dependiendo de las propiedades físico-químicas de las micotoxinas, la matriz de la muestra y la técnica de limpieza que se va a usar a continuación. La extracción con disolventes acelerada (ASE, siglas en inglés), también conocida como extracción con líquidos presurizados (PLE, siglas en inglés) o la extracción asistida por microondas (MAE, siglas en inglés) ayudan a acelerar el proceso de extracción y permiten automatizarlo, además de constituir una buena alternativa a las técnicas clásicas de extracción. Hasta ahora, el elevado coste de los equipos de ASE ha limitado la aplicación de esta técnica en el campo del análisis de micotoxinas a unos pocos laboratorios⁵². La extracción con fluidos supercríticos (SFE, siglas en inglés), especialmente con CO₂ supercrítico, cuya selectividad puede modificarse con la adición de disolventes polares, se ha utilizado de forma muy limitada para la extracción de micotoxinas⁵³.

Para la purificación y enriquecimiento de las micotoxinas generalmente se aplica la extracción en fase sólida (SPE, siglas en inglés) utilizando diferentes materiales adsorbentes. En 2006 se publicó una recopilación muy completa de las diferentes estrategias disponibles para la purificación de muestras en el análisis de micotoxinas⁵⁴. Los procedimientos convencionales de SPE usan materiales de fase reversa (C8 y C18), intercambiadores catiónicos o aniónicos fuertes (SCX, SAX) o materiales poliméricos con propiedades combinadas.

⁵² Pereira VL, Fernandes JO, Cunha SC. 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*. 36:96–136.

⁵³ Zougagh M, Ríos A. 2008. Supercritical fluid extraction of macrocyclic lactone mycotoxins in maize flour samples for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatographic method for confirmation. *J. Chromatogr. A* 1177:50-57.

⁵⁴ Zöllner P, Mayer-Helm B. 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136:123–169.

Los procedimientos de purificación de muestras más utilizados en la actualidad se basan en el empleo de columnas multifuncionales como las MycoSep^{®55} y columnas de inmunoafinidad (IAC)⁵⁴, aunque estos materiales son más caros que los convencionales. Las columnas MycoSep[®] contienen una mezcla de carbón vegetal, resinas de intercambio iónico y otros materiales, y son adecuadas para aflatoxinas, tricotecenos, ocratoxinas, zearalenona, moniliformina y patulina⁵⁶. Las IACs contienen anticuerpos inmovilizados que retienen de manera exclusiva una cierta micotoxina o ciertas clases de ellas. Debido a su elevada especificidad, las IACs producen extractos más limpios con un nivel mínimo de interferencias de la matriz y excelentes relaciones señal-ruido si se comparan con los materiales adsorbentes, menos selectivos.

Se han desarrollado IACs para la mayoría de micotoxinas y clases de micotoxinas como las aflatoxinas, la ocratoxina A, los tricotecenos o la zearalenona y sus metabolitos. La Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) y la UE ya han validado algunos métodos que hacen uso de estas IACs; sin embargo, dichos métodos están dirigidos solamente a un número limitado de productos alimentarios. Para algunas micotoxinas, como la ocratoxina A, las IACs ya se usan en análisis de rutina (junto con LC y detección fluorescente), pero cuando se han comparado los métodos convencionales de limpieza con las IACs en el análisis de ciertas micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas B y ocratoxina A), se han encontrado

⁵⁵ Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z. 2007. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1143:48–64.

⁵⁶ Romer Labs Diagnostic GmbH. Disponible en <http://www.romerlabs.com>.

discrepancias para ciertas matrices alimentarias.^{57, 58} Estos problemas ponen de manifiesto la necesidad de validar los métodos para cada matriz compleja de manera separada para obtener resultados analíticos exactos.

Además de su elevado coste, los materiales de inmunoafinidad son menos viables para análisis multitoxina ya que son altamente específicos para una única micotoxina (o clase). Algunos científicos incluso hablan de “capar” cuando se usan técnicas de limpieza altamente específicas, como IACs, en combinación con cromatografía líquida unida a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), ya que la detección específica de un compuesto contradice las capacidades de detección multianalito de la nueva generación de espectrómetros de masas.

Actualmente ya existen en el mercado combinaciones de materiales de inmunoafinidad con los que pueden extraerse selectivamente un amplio intervalo de micotoxinas. En muchos casos, se ha demostrado que la calidad de los resultados analíticos es similar a cuando se usan SPEs convencionales. Por supuesto, esto depende de la selectividad del instrumento de medida. Un espectrómetro de masas de una sola etapa en modo SIM (selected-ion-monitoring; monitorización del ion seleccionado) podría necesitar limpieza selectiva para eliminar interferencias de la matriz, mientras que esas interferencias podrían no ser visibles con un espectrómetro

⁵⁷ Castegnaro M, Tozlovanu M, Wild C, Molini A, Sylla A, Pfohl-Leskowicz A. 2006. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Molecular Nutrition and Food Research* 50:480–487.

⁵⁸ Sugita-Konishi Y, Tanaka T, Nakajima M, Fujita K, Norizuki H, Mochizuki N, Takatori K. 2006. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. *Talanta* 69:650–655.

de masas en tándem trabajando en modo MRM (multiple reaction-monitoring; monitorización de la transición seleccionada).

Los polímeros de impresión molecular (MIPs), específicos para micotoxinas, son también considerados como una alternativa válida para la etapa de limpieza. Además, a diferencia de las columnas de inmunoafinidad, no sufren limitaciones en cuanto al almacenamiento ni problemas de estabilidad respecto a los disolventes orgánicos. Se han desarrollado MIPs selectivos para varias micotoxinas, entre ellas aflatoxinas⁵⁹, toxina T-2⁶⁰ y ocratoxina A⁶¹.

1.7.3. Cuantificación de micotoxinas

Existen dos estrategias para la determinación de micotoxinas. Una conlleva el uso de métodos instrumentales sofisticados que permiten determinar y cuantificar la gran mayoría de micotoxinas con excelente sensibilidad, aunque entre las desventajas se pueden citar los largos tiempos de análisis requeridos y el elevado coste de la instrumentación en algunos casos. Por otra parte están las técnicas de “screening”, como por ejemplo los biosensores o los dispositivos de flujo lateral (Lateral Flow Devices, LFD) que son metodologías rápidas y, en algunos casos, portátiles que se han desarrollado para un limitado número de micotoxinas. El

⁵⁹ Szumski M, Grzywiński D, Prus W, Buszewski B. 2014. Monolithic molecularly imprinted polymeric capillary columns for isolation of aflatoxins. *J. Chromatogr. A* 1364:163-170.

⁶⁰ De Smet D, Monbaliu S, Dubruel P, Van Peteghem C, Schacht E, De Saeger S. 2010. Synthesis and application of a T-2 toxin imprinted polymer. *J. Chromatogr. A* 1217:2879-2886.

⁶¹ Cao J, Zhou S, Kong W, Yang M, Wan L, Yang S. 2013. Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in ginger and LC-MS/MS confirmation. *Food Control* 33:337-343.

funcionamiento varía entre los diferentes kits comerciales, que no son caros (en comparación con la elevada inversión que conlleva cierta instrumentación sofisticada) y pueden usarse en el campo o en el lugar del almacenamiento de los alimentos para dar resultados rápidos bastante aproximados. Sin embargo, algunos no son tan sensibles o específicos como los métodos cromatográficos. Ambos tipos de metodologías pueden ser complementarias. Los métodos de screening son útiles para una rápida respuesta de monitorización (por ejemplo para comprobación de materia prima entrante), que puede entonces ser comprobada y confirmada usando técnicas cromatográficas.

1.7.3.1. Técnicas cromatográficas

Dentro de las diferentes técnicas existentes en el mercado y documentadas en bibliografía, las más usadas para la determinación de las micotoxinas reguladas en alimentos y piensos son cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con fluorescencia (FL), ultravioleta/visible (UV/Vis), o espectrometría de masas (MS), y cromatografía de gases (GC) acoplada a ionización de llama (FID), captura electrónica (ECD) o MS. Cuando se usa cromatografía líquida, como en las investigaciones incluidas en esta Tesis Doctoral, los detectores más usados son espectrometría de masas y fluorescencia. Para algunas micotoxinas que presentan

fluorescencia nativa como la ocratoxina A, la técnica más utilizada para su determinación individual es LC/FL.^{62,63,64}

El Comité Europeo de Normalización (CEN) ha estandarizado algunos métodos para el análisis de micotoxinas. Para ello, establece criterios de ejecución para dichos métodos, normalmente basándose en estudios de colaboración interlaboratorios. Los denominados métodos CEN son métodos oficiales de referencia y son usados para el control e inspección oficial y también en casos de disputas entre diferentes partes. Existen métodos aprobados por el CEN para aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, patulina y desoxinivalenol en varios productos alimenticios.

La tendencia en los últimos años ha sido el desarrollo de métodos multi-micotoxina haciendo uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Esta tendencia se debe, en parte, al descubrimiento de la co-aparición de diferentes toxinas en las muestras y los efectos tóxicos sinérgicos relacionados, los cuales han aumentado la preocupación sobre los peligros para la salud de productos contaminados⁶⁵. También porque sería deseable cubrir, al menos, las toxinas incluidas en la Commission Regulation 1881/2006 (aflatoxinas B₁,

⁶² European Committee for Standardization (CEN), 2003, Method EN 14132:2003 for the determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee. HPLC method with immunoaffinity column clean-up. Publication date 21 May 2003, CEN Brussels, Belgium.

⁶³ A.C. Entwisle, A.C. Williams, P.J. Mann, P.T. Slack, J. Gilbert, J.AOACInt. 83 (2000) 1377.

⁶⁴ Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Determination of Ochratoxin A in wine and beer, Official Method 2001.01, AOAC International, 2002.

⁶⁵ De Ruycck K, De Boevre M, Huybrechts I, De Saeger S. 2015. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. Mutation Research. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.003>.

B₂, G₁, G₂ y M₁, ocratoxina A, patulina, desoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas B₁ y B₂ y toxinas HT-2 y T-2) con un único método ya que así se incrementaría el número de muestras que se podrían analizar y descenderían los costes por análisis. Comparada con otras técnicas de detección convencionales, tales como UV o FL, la espectrometría de masas ofrece mayor selectividad y sensibilidad, confirmación de la identidad del analito y la opción de usar sustancias marcadas isotópicamente como estándares internos. Además, es posible investigar la estructura molecular de metabolitos y conjugados de azúcares y omitir pasos de limpieza y procesos de derivatización que conllevan un gasto de tiempo añadido, además de poder ser fuentes de errores.

Sin embargo, aunque la espectrometría de masas ofrece suficiente selectividad (especialmente si se aplica MS/MS) y capacidad multianalito, su realización en el campo del análisis multimicotoxina ha estado limitado por la diversidad química de las diferentes clases de toxinas, las cuales incluyen compuestos ácidos (fumonisinas), básicos (alcaloides ergóticos) además de polares (moniliformina, nivalenol) y apolares (zearalenona, beauvericina). Por tanto, se tienen que efectuar compromisos en la elección del disolvente de extracción y la fase móvil, y las condiciones pueden no ser las óptimas para todos los analitos. Además, los métodos normalmente hacen uso de algún procedimiento de limpieza, y por tanto, en algunas ocasiones se excluyen ciertas clases de toxinas porque no son compatibles con las condiciones de extracción y/o limpieza. Para superar estos problemas, algunos métodos omiten la etapa de purificación de la muestra y los extractos se inyectan directamente en el LC-MS. Esto, puede hacerse si el modo de detección tiene buena selectividad y, además, requiere una profunda investigación sobre los efectos de matriz, especialmente en matrices complicadas. En este contexto, Sulyok et al. han descrito

una metodología para la determinación cuantitativa de 39 micotoxinas (incluyendo moniliformina, beauvericina, eniatinas y micotoxinas enmascaradas) en trigo y maíz⁶⁶. Aunque el efecto matriz para muestras como maíz es muy pronunciado, éste se puede compensar aplicando el método de adición estándar.

Otra forma de corregir los efectos de matriz implica el uso de estándares internos marcados isotópicamente (IS). Hasta ahora la disponibilidad en el mercado era escasa y económicamente suponía un gran desembolso para los laboratorios disponer de un IS para cada una de las micotoxinas que se pretendía analizar. Hoy en día la disponibilidad comercial de este tipo de IS es mayor. Recientemente se ha publicado un método para la determinación de las 11 micotoxinas legisladas por la UE en maíz y otros productos derivados que hace uso de IS marcados con [¹³C] para cada una de ellas⁶⁷.

1.7.3.2. Métodos de screening

Técnicas inmunoquímicas

Los métodos rápidos basados en técnicas inmunoquímicas a menudo tienen la ventaja de que no requieren ninguna etapa de purificación de la muestra debido a la elevada especificidad que los caracteriza. En este contexto, los kits ELISA se han convertido en una herramienta rutinaria para la monitorización rápida de la mayoría

⁶⁶ Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:2649–2659.

⁶⁷ E. Varga, T. Glauner, R. Köppen, K. Mayer, M. Sulyok, R. Schuhmacher, R. Krska, F. Berthiller. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2675–2686.

de micotoxinas, especialmente para el control de materias primas. Aunque estos ensayos pueden presentar efecto matriz y producir sobreestimación de los valores obtenidos, las ventajas que ofrece este formato son rapidez, facilidad de operación, sensibilidad y capacidad para procesar un número elevado de muestras. Hay comercialmente disponibles kits ELISA para la mayoría de micotoxinas de interés. Otros métodos para micotoxinas basados en inmunoensayo incluyen el uso de inmunosensores⁶⁸ y plataformas inmunoquímicas, tales como inmunoensayos de polarización de la fluorescencia (IPF) o resonancia de plasmon superficial (RPS) con conjugados micotoxina–proteína inmovilizados sobre la superficie de un chip/sensor.⁶⁹

En los últimos años, ha crecido el interés en los métodos inmunoquímicos de membrana, tales como los inmunoensayos flow-through y los dispositivos de flujo lateral o dipsticks (Lateral Flow Devices, LFDs), debido a la necesidad de disponer de metodologías rápidas de (pre)-screening in situ. Los LFDs permiten la determinación cualitativa o semicuantitativa de micotoxinas en un test que implica una sólo etapa y en apenas unos pocos minutos, no requiriendo más preparación de la muestra que una extracción previa. Diferentes compañías desarrollan y comercializan LFDs para un amplio intervalo de micotoxinas y matrices.^{60,70,71}

⁶⁸ Vidal J., Bonel L, Ezquerro A, Hernández S, Bertolín JR, Cubel C, Castillo JR. 2013. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 49:146-158.

⁶⁹ Ying L, Xia L, Zhao L. 2012. Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs. *Food Chemistry* 132:1549–1554.

⁷⁰ VICAM website. Disponible en <http://vicam.com>.

⁷¹ NEOGEN website. Disponible en <http://www.neogen.com>.

Técnicas no invasivas

Los métodos ópticos, tales como la espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) o espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)⁷², son técnicas prometedoras para la detección rápida y no destructiva de micotoxinas en granos. Estas técnicas permiten reducir al mínimo la preparación de la muestra además de poder ser integradas en sistemas de monitorización en línea o portátiles. Sin embargo, existen algunas restricciones importantes como la interpretación rápida de los datos, la cual está basada en complejos métodos quimiométricos, la elevada dependencia de la matriz de la muestra o la falta de materiales de calibración apropiados.

La tendencia en métodos de screening se dirige hacia el desarrollo de ensayos rápidos y sencillos que permitan la medida simultánea de múltiples micotoxinas, los cuales no requieran instrumentación demasiado sofisticada o compleja y en los cuales la capacidad de detección se mejore.

1.8. Validación de métodos analíticos para determinación de micotoxinas

Muchos de los métodos analíticos descritos en la bibliografía para la determinación de micotoxinas en alimentos y piensos no se han validado. Así sólo algunos de ellos han descrito in-house validación de acuerdo a la Directiva 657⁷³ y

⁷² Singh CB, Jayas DS, 2011. Spectroscopic techniques for fungi and mycotoxins detection. In: De Saeger, S. (Ed.), Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 401-414.

⁷³ Commission Decision 2002/657/EC. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>.

han aportado parámetros tales como el límite de decisión (CC_{α}) y la capacidad de detección (CC_{β}), la linealidad, la precisión (en términos de repetibilidad y reproducibilidad), la selectividad, la robustez, el intervalo de linealidad y la veracidad. Se han publicado otros protocolos y guías para la validación de métodos, como por ejemplo la ISO standard 5725⁷⁴ (revisada en 2012) o la guía “The fitness for purpose of analytical methods”⁷⁵.

A pesar de los esfuerzos actuales y pasados para producir materiales de referencia certificados (CRMs) para micotoxinas, existe todavía la necesidad de disponer de más materiales que sean apropiados para las diferentes matrices e intervalos de concentración, especialmente en relación a la implementación y control de límites regulatorios (niveles máximos) de micotoxinas en alimentos y piensos establecidos por las autoridades nacionales e internacionales.

Los estudios de intercomparación juegan un papel importante en la validación de los métodos analíticos y en la producción de CRMs además de actuar como herramientas para el aseguramiento de la calidad en los laboratorios. En los últimos 10 años, dentro de proyectos financiados por la Unión Europea, se han realizado varios estudios de intercomparación en el campo del análisis de micotoxinas, especialmente para las micotoxinas de *Fusarium*, con el fin de mejorar la comparabilidad y la trazabilidad de los datos analíticos en Europa⁷⁶. De manera

⁷⁴ ISO 5725:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.

⁷⁵ B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). Disponible en <http://www.eurachem.org>.

⁷⁶ Josephs RD, Derbyshire M, Stroka J, Emons H Anklam E. 2004. Trichothecenes: reference materials and method validation. *Toxicological Letters* 153:123–132.

adicional, FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) continuamente organiza ejercicios de intercomparación entre laboratorios para el análisis de micotoxinas⁷⁷.

Hay varios métodos para el análisis de micotoxinas disponibles que están validados y han sido aceptados por autoridades y organismos oficiales tales como el CEN, la AOAC o la ISO. La última edición de los Official Methods of Analysis (OMA) de la AOAC está disponible en la red y contiene alrededor de 60 métodos validados para el análisis de micotoxinas⁷⁸.

⁷⁷ FAPAS Proficiency Testing Programme 2015-16. Disponible en <http://www.fapas.com>.

⁷⁸ Latimer G.W. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19th ed (2012). Gaithersburg (MD): AOAC International. Disponible en <http://www.eoma.aoac.org>.

2. AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES

2.1.Introducción

La actividad industrial en los países desarrollados consume alrededor del 60% del gasto total del agua⁷⁹. Se estima que en 2025 se consumirán alrededor de 1200 Km³ de agua/año con fines industriales. Este sector no sólo es el que más agua consume sino también el que más contamina. Así, la industria produce alrededor del 80% de los residuos peligrosos que se generan a nivel mundial y, en el caso de países en vías de desarrollo, un 70% de estos residuos se vierten a los recursos hídricos sin ningún tipo de tratamiento. Estos datos revelan la importancia que tiene el tratamiento de aguas residuales no sólo para evitar la contaminación de los recursos hídricos sino también para la reutilización de las mismas, aspecto fundamental para los países con déficit hídrico.

⁷⁹ Aguas para todos, agua para la vida. Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo (2003).

Las aguas residuales se clasifican en tres grupos: domésticas, industriales y urbanas⁸⁰. Las primeras se generan por el metabolismo humano y las actividades domésticas. Las segundas se vierten desde locales industriales o comerciales. Las aguas urbanas contienen una mezcla de aguas domésticas e industriales, aunque para el vertido de estas últimas se requiere un acondicionamiento previo.

Los efluentes industriales pueden contener tanto compuestos orgánicos como inorgánicos que con frecuencia son resistentes a los tratamientos convencionales aplicados en las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR), bien por la elevada concentración a la que se encuentran o por su naturaleza química. Muchos de estos compuestos están sujetos a regulación especial debido a su carácter tóxico.

2.2.Aspectos legislativos

La legislación relativa al requerimiento de purificación de aguas industriales antes de su vertido a los recursos hídricos se inició en Estados Unidos en 1972 con la aprobación por el Congreso de la “Federal Water Pollution Control Act”, que estableció un sistema nacional de descarga y eliminación de contaminantes. Las enmiendas de 1977 y 1987, conocidas como “Clean Water Act” y “Water Quality Act”, completan la regulación legal norteamericana.

En Europa, las principales directivas en este contexto han sido la Directiva 91/271/CEE, de 21 mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas

⁸⁰ Directiva 91/271/CEE de 21 de Mayo 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.

e industriales, la Directiva 98/15/CE que modifica los requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles propensas a eutrofización, y la Directiva 96/61/CE, relativa a la prevención y al control integrado de la contaminación, mediante la que se establecen medidas para evitar, o al menos reducir, las emisiones de estas actividades en la atmósfera, el agua y el suelo, incluidos los residuos. La tendencia en Europa es reducir el vertido de algunos contaminantes específicos y emplear sistemas avanzados de tratamiento de aguas residuales “in situ”.

De acuerdo a la Directiva 96/61/CE, entre las principales sustancias contaminantes que se tomarán obligatoriamente en consideración para fijar valores límite de emisiones a las aguas se encuentran los compuestos órgano-halogenados, las sustancias con propiedades cancerígenas, o mutagénicas, que puedan afectar a la reproducción en el medio acuático, los hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas persistentes y bioacumulables, las sustancias que ejercen una influencia desfavorable sobre el balance de oxígeno, etc. Estos contaminantes proceden de industrias muy variadas y por su naturaleza, concentración o caudal del efluente, hacen que esas aguas residuales demanden un tratamiento antes de su vertido o reutilización.

2.3. Eliminación de compuestos orgánicos en aguas residuales

Las tecnologías usadas para el tratamiento de aguas residuales deben asegurar que los compuestos orgánicos se encuentren a los niveles requeridos para permitir el vertido del efluente a los recursos hídricos de acuerdo a la legislación o para garantizar las condiciones mínimas del proceso en el caso de reutilización o

recirculación de la corriente para uso interno. Para ello, se utilizan tanto técnicas destructivas (tratamiento biológico aerobio y anaerobio, procesos avanzados de oxidación, incineración, etc) como no destructivas (adsorción, membranas, etc). En el caso de utilizar una técnica no destructiva, ésta se considera como una etapa previa de concentración de los contaminantes antes de abordar su destrucción química o reciclado. Ya que las investigaciones abordadas en esta tesis se incluyen dentro de las técnicas no destructivas, nos limitaremos a la descripción de las mismas en esta sección.

La adsorción de contaminantes sobre materiales sólidos está considerada como una de las tecnologías más prometedoras para el tratamiento de aguas residuales. El material más utilizado en este contexto es el carbón activo, aunque sus propiedades se deterioran en el proceso por lo que es necesario reponer parte del mismo por carbón virgen en cada ciclo, lo que hace que no sea viable económicamente en algunas aplicaciones. La adsorción es una tecnología de amplia aplicación para la eliminación de sustancias orgánicas tales como colorantes, fenol, PAHs, mercaptanos, etc.

La crisis económica ha estimulado a los investigadores a la búsqueda de adsorbentes alternativos de menor coste tales como zeolitas, arcillas, residuos agrícolas, etc⁸¹. La capacidad adsorbente de estos materiales es inferior a la del carbón activo pero su considerable menor coste los hace competitivos en muchos procesos.

⁸¹ Kyzas, G.Z.; Kostoglou, M. Green adsorbents for wastewaters: a critical review. *Materials*. 2014, 7, 333-364.

La nanotecnología también ha irrumpido en el tratamiento de aguas residuales con el desarrollo de nanomateriales tales como hierro de valencia cero, nanotubos de carbono, grafeno, dendrímeros, polímeros de ciclodextrinas, nanopartículas magnéticas, etc, que poseen una gran capacidad de adsorción y propiedades multifuncionales que permiten el desarrollo de procesos avanzados de purificación^{82,83}. Sin embargo hasta el momento no se ha demostrado su viabilidad económica y existe preocupación por su posible toxicidad ambiental y riesgos para la salud^{84,85,86}.

La tecnología de membranas es una de las mejores opciones para la desalinización del agua marina y la purificación del agua residual⁸⁷. Las membranas se construyen a partir de materiales muy diversos (poliméricos, cerámicos o metálicos) y de acuerdo a su estructura física se clasifican en microporosas (con tamaños de poro en el intervalo 0.001mm-10 mm), densas (las sustancias se disuelven en la membrana y se difunden a través de ella), cargadas eléctricamente (son membranas porosas o densas con grupos catiónicos o aniónicos) y anisótropas (en las

⁸² Ghasemzadeh, G.; Momenpour, M.; Omid, F.; Hosseini, M. R.; Ahani, M.; Barzegari, A. Applications of nanomaterials in water treatment and environmental remediation. *Front. Env. Sci. Eng.* 2014, 8, 471-482.

⁸³ Das, S.; Sen, B.; Debnath, N. Recent trends in nanomaterials applications in environmental monitoring and remediation. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2015, 22, 18333-18344.

⁸⁴ Maynard, A. D. A decade of uncertainty. *Nat. Nanotechnol.* 2014, 9, 159-160.

⁸⁵ Batley, G. E.; Kirby, J. K.; McLaughlin, M. J. Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Accounts Chem. Res.* 2013, 46, 854-862.

⁸⁶ Linkov, I.; Bates, M. E.; Canis, L. J.; Seager, T. P.; Keisler, J. M. A decision-directed approach for prioritizing research into the impact of nanomaterials on the environment and human health. *Nat. Nanotechnol.* 2011, 6, 784-787.

⁸⁷ Fane, A. G.; Wang, R.; Hu, M. X. Synthetic Membranes for Water Purification: Status and Future. *Angew. Chem. Int. Edit.* 2015, 54, 3368-3386.

que el tamaño de poro, la porosidad o composición de la membrana cambia a lo largo de su espesor).

Las tecnologías de membranas más utilizadas en el tratamiento de aguas residuales industriales son microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa. En las dos primeras las membranas actúan como tamices moleculares. Hasta la fecha, estas tecnologías solo se aplican en industrias donde es posible mejorar la economía del proceso mediante la recuperación de componentes valiosos que puedan volver a reciclarse en el proceso de producción (ejemplo, industrias de galvanoplastia y de pintura de estructuras metálicas) y en industrias donde la reutilización del agua tratada signifique una reducción importante del consumo de agua (ejemplo, en la industria textil).

Los costes de capital y operación de la tecnología de membrana son aún demasiado elevados para que pueda utilizarse para el tratamiento de grandes caudales de agua. Uno de los principales problemas asociados a esta tecnología es el ensuciamiento de la membrana, producido por la adsorción o precipitación de sustancias, lo que provoca la progresiva disminución del flujo que puede pasar a su través y finalmente requiere su sustitución.

3. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR DEL ESTADO LÍQUIDO

3.1. Aspectos generales

La Química Supramolecular, definida como la Ciencia que estudia los sistemas constituidos por moléculas o iones unidos por interacciones no covalentes, es hoy una Ciencia madura y en plena expansión⁸⁸. En las últimas décadas, los químicos han alcanzado un grado de control importante sobre el enlace no covalente y han usado la química “huésped-anfitrión” y el autoensamblaje para sintetizar una gran cantidad de estructuras funcionales con dimensiones en la escala nanométrica.^{89,90} El autoensamblaje ha sido también esencial en Nanoquímica para la preparación y manipulación de estructuras moleculares en el intervalo aproximado de 1 a 500 nm, lo que hace que la interfase entre Nanoquímica y Química Supramolecular sea muy subjetiva⁹¹.

⁸⁸ J.M. Lehn, P. Ball in *The New Chemistry*, ed. Hall, N. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.), 2000, pp. 300.

⁸⁹ D. K. Smith, A. R. Hirst, C. S. Love, J. G. Hardy, S. V. Brignell, B. Huang, *Progress in Polymer Science* 30 (2005) 220.

⁹⁰ M. Monduzzi, S. Lampis, S. Murgia, A. Salis, *Advances in Colloid and Interface Science* 205 (2014) 48.

⁹¹ J.W. Steed, D.R. Turner, K.J. Wallace, *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England, 2007.

El autoensamblaje constituye una de las dos grandes áreas de la Química Supramolecular y es un proceso mediante el cual se produce la unión espontánea de componentes moleculares, nanoscópicos o macroscópicos en agregados perfectamente estructurados, estables, y unidos mediante interacciones no covalentes⁹². Constituye una de las metodologías de síntesis de nanoestructuras más generales de las que se dispone en la actualidad. Hasta la fecha, la Química Supramolecular se ha centrado en el estudio y síntesis de estructuras en disolución y en estado sólido pero apenas ha abordado el estudio de líquidos, a pesar de que existen antecedentes bien conocidos en la química de coloides (fenómeno de coacervación)^{93,94} que han encontrado amplia aplicación en extracciones analíticas (ej. técnica de “cloud point”)⁹⁵, encapsulación de ingredientes activos⁹⁶, y tratamiento de aguas residuales⁹⁷.

Los disolventes supramoleculares son líquidos nanoestructurados producidos a partir de disoluciones acuosas o hidro-orgánicas de moléculas anfifílicas mediante procesos espontáneos de autoensamblaje y coacervación⁹⁸. En la Figura 1 se muestra una imagen de un disolvente supramolecular obtenida mediante microscopía óptica

⁹² G.M. Whitesides, M. Boncheva, *Proceedings National Academy Sciences* 99 (2002) 4769.

⁹³ E. Pramauro, E. Pelizzetti, *Surfactants in Analytical Chemistry, Applications of Organized Amphiphilic Media*, Elsevier, New York, 1996.

⁹⁴ K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 163.

⁹⁵ F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1613.

⁹⁶ Ezhilarasi, P. N.; Karthik, P.; Chhanwal, N.; Anandharamakrishnan, C. *Food Bioprocess Tech.* 2013, 6, 628-647.

⁹⁷ Haddou, B. et al. Use of cloud point extraction with ethoxylated surfactants for organic pollution removal. In *The role of colloidal systems in environmental protection*, Monzer Fanun, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2014.

⁹⁸ A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530.

y se dibujan las estructuras de los agregados que conforman las disoluciones coloidales a partir de las que se producen.

Los disolventes supramoleculares constituyen una alternativa ventajosa a los disolventes moleculares e iónicos en procesos de extracción. Así, la contaminación derivada del uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos en la industria y los laboratorios de análisis constituye uno de los problemas ambientales más importantes en la actualidad. Los disolventes orgánicos son los responsables de aproximadamente el 35% de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en Europa⁹⁹. Alrededor de la mitad de los 189 contaminantes atmosféricos peligrosos regulados por el “Clean Air Act Amendment” en Estados Unidos (1990)¹⁰⁰ son VOCs y está demostrado que contribuyen decisivamente a la contaminación fotoquímica de la atmósfera. Dado que el diseño de productos y procesos medioambientalmente benignos es la base de la Química Sostenible, una de las áreas de investigación más prometedoras en el campo de las nuevas “tecnologías sostenibles” es el desarrollo y la aplicación de nuevos disolventes compatibles con el medioambiente.

⁹⁹ J. Theloke, R. Friedrich, *Atmospheric Environ.* 41 (2007) 4148.

¹⁰⁰ Public Law No 101-549, US 101st Congress, Clean Air Act Amendments of 1990 (November 1990).

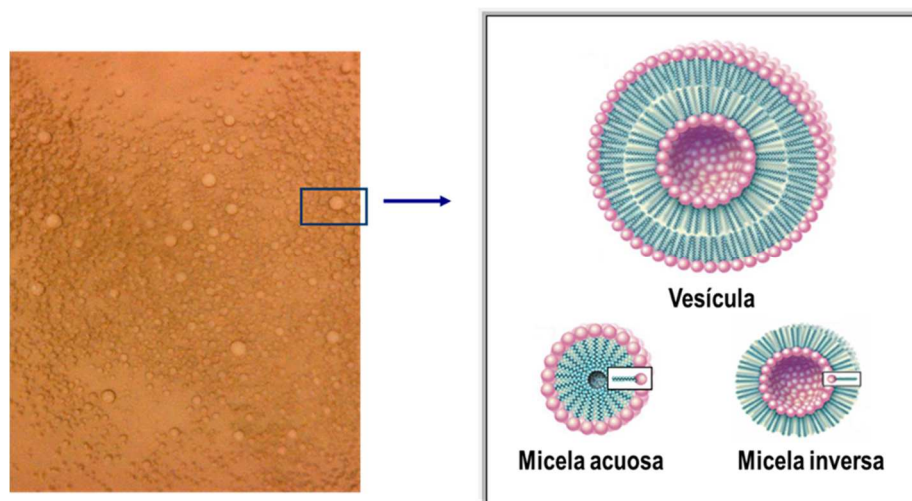


Figura 1: Representación de diferentes tipos de agregados moleculares en disolución

En la última década, el estudio del potencial de los líquidos iónicos como disolventes alternativos ha despertado un enorme interés. Se ha propuesto el uso de líquidos iónicos en múltiples aplicaciones¹⁰¹ y muchos de ellos se han comercializado por diferentes compañías. Dada su baja volatilidad, los líquidos iónicos se han considerado inocuos, sin embargo se ha demostrado que algunos líquidos utilizados hasta la fecha son tóxicos y, dada su baja biodegradabilidad, pueden acumularse en el ambiente si se utilizan a nivel operacional¹⁰². Algunas de las investigaciones recientes están dirigidas a la síntesis de líquidos iónicos más fácilmente degradables¹⁰³.

¹⁰¹ ZG. Tan, J-F. Liu, L. Pang, TrAC, 39 (2012) 218.

¹⁰² Y. Zhao, J. Zhao, Y. Huang, Q. Zhou, X. Zhang, S. Zhang, J. Hazardous Materials 278 (2014) 320.

¹⁰³ B. Peric, J. Sierra, E. Martí, R. Cruañas, M. A. Garau, J. Arning, U. Bottin-Weber, S. Stolte, J. Hazardous Materials 261 (2013) 99.

3.2. Síntesis de disolventes supramoleculares

De acuerdo con los avances que se han producido en Química Supramolecular en relación al concepto de autoensamblaje⁹⁵ y considerando los estudios en Química Coloidal relativos a coacervación, se puede afirmar que los coacervados constituidos por moléculas anfifílicas descritos hasta la fecha se obtienen siempre mediante procesos de autoasociación que se desarrollan en al menos dos etapas secuenciales (Figura 2); la primera a escala molecular y la segunda a escala nano.

Inicialmente, se forman agregados tridimensionales de moléculas anfifílicas en una disolución homogénea, fundamentalmente vesículas o micelas (acuosas o inversas) dependiendo de la estructura de la molécula anfifílica y la naturaleza del disolvente. Estos agregados forman una disolución coloidal y coacervan mediante la acción de un estímulo externo (ej. cambios en el pH o la temperatura, adición de sales o un disolvente miscible con la disolución coloidal en el que la molécula anfifílica tiene baja solubilidad, etc).

La fase líquida resultante resultante (disolvente supramolecular of SUPRAS) está constituida por agregados de mayor tamaño que los agregados coloidales y es inmisible con la disolución a partir de la cual se generó. Esta disolución, denominada de equilibrio, contiene una cantidad de moléculas anfifílicas igual a la concentración de agregación crítica.

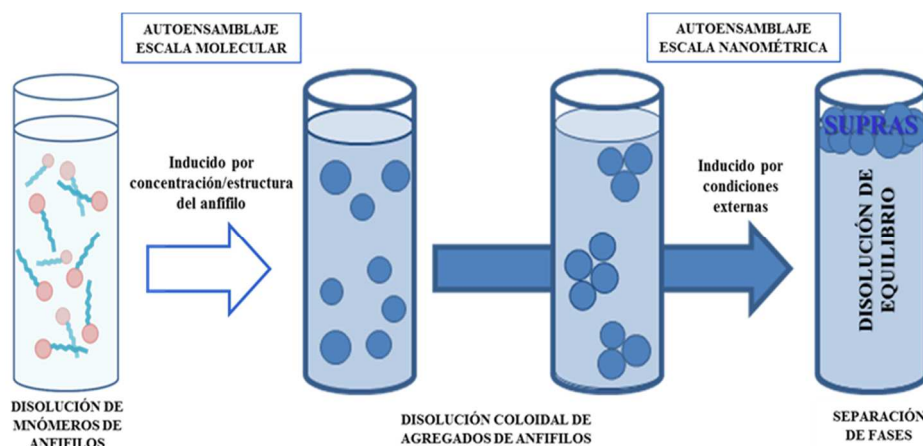


Figura 2: Representación de los diferentes procesos requeridos para la formación de disolventes supramoleculares

Como en todos los procesos de autoensamblaje en Química Supramolecular, las nanoestructuras que conforman el disolvente supramolecular son reversibles. El fluido se genera por la acción de un estímulo externo y si este estímulo se elimina, desaparece la fuerza que causó la asociación y el agregado se disuelve. Por otro lado, las moléculas anfifílicas en el agregado están en equilibrio dinámico con las moléculas en la disolución de equilibrio. El tiempo de residencia de los monómeros en agregados micelares es del orden de $\sim 10^{-8}$ s. Por tanto, el coacervado se disolverá rápidamente en contacto con una disolución que no contiene el componente anfifílico hasta que ésta alcance la concentración de agregación crítica. Estas características han limitado el uso de los disolventes supramoleculares en algunas aplicaciones, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales. Nuestro grupo de investigación ha descrito un disolvente supramolecular basado en la coacervación de vesículas de ácidos alquil carboxílicos inducida por tetrabutilamonio¹⁰⁴. El disolvente

¹⁰⁴ F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 78 (2006) 7229.

resultante es estable cinéticamente, lo que ha permitido su aplicación al análisis de contaminantes en aguas utilizando técnicas de microextracción en una gota¹⁰⁵. Esta propiedad abre interesantes perspectivas para su aplicación en procesos de extracción que impliquen elevados volúmenes de agua.

La coacervación es definida por la IUPAC¹⁰⁶ como la separación de sistemas coloidales en dos fases líquidas, una con un elevado contenido de coloide, denominada coacervado, y la otra con un bajo contenido del mismo, denominada disolución en equilibrio. Este fenómeno se describió por primera vez en 1930¹⁰⁷. Sin embargo, los avances en esta área han sido lentos, fundamentalmente debido a que la descripción de nuevos coacervados se ha realizado sobre una base empírica.

La coacervación simple es la que ofrece mayor interés para la síntesis de disolventes nanoestructurados. Se produce a partir de disoluciones de macromoléculas neutras o cargadas y es inducida por un agente desolvatante¹⁰⁸. Las macromoléculas para las que se han descrito coacervados simples han sido fundamentalmente proteínas, polisacáridos, drogas y agregados supramoleculares¹⁰⁹.

¹⁰⁵ F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1195 (2008) 25.

¹⁰⁶ IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1972) 611.

¹⁰⁷ H.G. Bungenberg de Jong, H.R. Kruyt, Kolloid Z. 50 (1930) 39.

¹⁰⁸ Y. Wang, K. Kimura, Q. Huang, P.L. Dubin, W. Jaeger, Macromolecules, 32 (1999) 7128.

¹⁰⁹ B. Mohanty, H.B. Bohidar, Biomacromolecules, 4 (2003) 1080.

3.3. Propiedades extractivas de los disolventes supramoleculares

Los disolventes supramoleculares presentan un conjunto de características de gran relevancia para procesos de extracción. La capacidad de extracción de los disolventes supramoleculares deriva de la especial estructura y elevada concentración de los agregados que los constituyen. Así, la estructura tridimensional de los agregados presenta regiones de diferente polaridad que muestran una excelente capacidad de solvatación para una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Por otro lado, la concentración de sustancias anfífilas en el disolvente está comprendida entre 0.1 y 1 mg μL^{-1} y, como consecuencia, ofrece un elevado número de centros enlazantes para los compuestos de interés, lo que resulta en elevados rendimientos de extracción y factores de concentración.

Desde el punto de vista operacional, las propiedades más destacadas son las siguientes: (1) los procedimientos de síntesis se basan en fenómenos espontáneos de autoensamblaje que están al alcance de cualquier laboratorio o industria; (2) están constituidos por agua y moléculas anfífilas que son ubicuas en la naturaleza y la química sintética y además son biodegradables y económicas; (3) existe la posibilidad de modificar las propiedades del disolvente variando el grupo polar o la cadena hidrocarbonada del compuesto anfílico que lo constituye y (4) son disolventes con baja volatilidad e inflamabilidad, lo que hace que los procesos de extracción sean menos contaminantes y más seguros.

3.3.1. Eficiencias de extracción y factores de preconcentración

Las eficiencias de extracción para los solutos dependen del número de centros de unión y de las energías de enlace en los SUPRAS (ej. la energía del enlace iónico > puentes de hidrógeno > dipolo-dipolo > dipolo-dipolo inducido > dispersión). Por otra parte, los factores de preconcentración reales dependen de las recuperaciones y de los valores de las relaciones volumen de muestra/volumen de SUPRAS, así que la concentración de anfifilos en el disolvente se convierte en factor clave para obtener elevados valores de eficiencia y factores de preconcentración.

El volumen de SUPRAS producido a partir de una disolución coloidal de agregados supramoleculares depende linealmente de la cantidad de anfifilos en la disolución de origen, al menos para concentraciones por debajo del 4% (p/v) (el intervalo de interés analítico). Esta linealidad indica que la composición de los SUPRAS se mantiene constante si el resto de variables permanecen sin cambios¹¹⁰ y el valor de la pendiente de la relación lineal ($\mu\text{L mg}^{-1}$) es una medida del volumen de SUPRAS obtenido por cantidad de tensioactivo. Este comportamiento común, presenta excepciones. Por ejemplo, el contenido de agua del SUPRAS formado por micelas no iónicas de Triton X-114 varía entre el 80% y 70% cuando se sintetiza a partir de disoluciones coloidales que contienen entre el 1% y 3% de Triton X-114¹¹¹.

La concentración de anfifilos en el disolvente depende principalmente de sus estructuras y de las condiciones ambientales que conducen a la separación de fases.

¹¹⁰ A. Ballesteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51.

¹¹¹ B. Yao, L. Yang, *J. Colloid Interface Sci.* 319 (2008) 316–321.

Se han encontrado concentraciones de 0.2, 0.25-0.75, 1 y 0.09 mg μL^{-1} para SUPRAS formados a partir de micelas acuosas aniónicas de SDS¹¹², micelas inversas¹¹³ y vesículas¹⁰⁴ de ácidos alquilcarboxílicos y micelas acuosas no iónicas de Triton X-114¹¹¹, respectivamente. Una concentración tan elevada de anfifilos y, por lo tanto de sitios de unión, es una propiedad excepcional de los SUPRAS para extracciones analíticas ya que se pueden lograr eficiencias de extracción y factores de preconcentración muy elevados. Como regla general, la concentración de anfifilos en el disolvente supramolecular disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica. Así, la concentración de anfifilos disminuye en el orden decanoico>dodecanoico>tetradecanoico en SUPRAS constituidos por vesículas de ácido alquilcarboxílico/alquilcarboxilatos de tetrabutilamonio. Para tensioactivos alquiletoxilados, la disminución en la concentración de anfifilos en el disolvente no sólo se debe al número de átomos de carbono en la región hidrocarbonada sino también al número de grupos oxietileno¹¹⁴.

Las condiciones ambientales que producen la separación de fases tienen una influencia directa en la concentración de anfifilos en los SUPRAS. Un ejemplo ilustrativo de esto es el efecto que tiene la temperatura en los disolventes formados a partir de tensioactivos no iónicos. Cuanta mayor sea la diferencia entre las temperaturas de operación y la del punto de nube, más compactas son las estructuras y, por tanto, se obtienen volúmenes menores de fase rica y, con menos contenido en agua¹⁰⁰. El descenso en el volumen de disolvente como función del incremento de las

¹¹² F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 998 (2003) 143.

¹¹³ F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 79 (2007) 7473.

¹¹⁴ P. Taechangam, J.F. Scamehorn, S. Osuwan, T. Rirkomboon, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 347 (2009) 200–209.

concentraciones de ácido clorhídrico y del co-tensioactivo 1-octanol, observado para tensioactivos aniónicos¹¹⁵ y catiónicos¹¹⁶, respectivamente, se ha relacionado con la formación de fases ricas en tensioactivo más concentradas.

Se ha descrito un estudio detallado sobre la influencia de las condiciones ambientales en el volumen de los SUPRAS obtenido para disolventes formados por micelas inversas de ácido decanoico¹¹⁰. A partir de este estudio, se han desarrollado ecuaciones generales para predecir el volumen de SUPRAS (y , μL) en función de la cantidad de ácido decanoico (x , mg) y el porcentaje de THF (z , v/v) ($y = 1.035xe^{0.04731z}$). Esta ecuación permite conocer, a priori, los factores de preconcentración máximos que se pueden lograr bajo unas condiciones experimentales dadas.

Los componentes de la disolución coloidal, diferentes a aquellos que provocan la separación de fases, pueden influir también en la composición del disolvente. De este modo, se han documentado numerosos estudios sobre el descenso de la temperatura necesaria para la separación de fases de micelas no iónicas inducido por electrolitos. Para cationes monovalentes, el orden del efecto que tienen sobre el descenso de la temperatura de “cloud point” es $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{NH}_4^+$, y para aniones monovalentes, $\text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$ ¹¹⁷. Además, los aniones trivalentes como el PO_4^{3-} son más efectivos en el efecto “salting out” de los tensioactivos no iónicos que los aniones divalentes como el SO_4^{2-} , que a su vez son más eficaces que los

¹¹⁵ D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 13–22.

¹¹⁶ E.W. Crick, E.D. Conte, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 87–93.

¹¹⁷ M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3rd edition, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, 2004, p. 197.

monovalentes¹¹⁸. Un ejemplo es el descenso observado en el “cloud point” del Triton X-405 de 115°C a aproximadamente 45°C al añadir K₃PO₄ 0.4 M y a 85°C al añadir KBr 2.4 M¹¹⁹. El efecto neto de las sales en el “cloud point” y en la composición de los SUPRAS depende de la concentración de la sal. Por ejemplo, la temperatura de “cloud point” y el contenido en agua para un SUPRAS producido a partir de una disolución de Tergitol 15-S-7 (1%) disminuye desde aproximadamente 33°C a 22°C y desde el 75% al 55%, respectivamente, cuando la concentración de Na₂SO₄ en la disolución se incrementa desde 0.4 M a 0.6 M¹²⁰. Existen excepciones a este comportamiento; los aniones que son interruptores del agua en la estructura (como por ejemplo SCN⁻ y I⁻) y los cationes que forman complejos con los átomos de oxígeno éter de los grupos polioxietileno (por ejemplo, Ag⁺ y cationes divalentes) aumentan la temperatura del “cloud point”¹¹¹ y, consecuentemente, aumentan el contenido en agua de la fase rica en el tensioactivo. La temperatura de “cloud point” puede modificarse también por la presencia de bases, ácidos, polímeros, alcoholes y otros compuestos orgánicos.^{121,122}

3.4.Formatos de extracción

La formación “in situ” de los disolventes supramoleculares en una muestra acuosa (10–100 mL) que contiene el compuesto anfífilico (0.1-2%) y los componentes

¹¹⁸ H. Akbas, C. Batigöc, *Fluid Phase Equilib.* 279 (2009) 115–119.

¹¹⁹ M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3rd edition, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, 2004, p. 197.

¹²⁰ J.L. Li, B.H. Chen, *J. Colloid Interface Sci.* 263 (2003) 625–632.

¹²¹ Z. Sosa, C. Padrón, C. Mahugo, J.J. Rodríguez, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 469–479.

¹²² T. Gu, P.A. Galera-Gómez, *Colloids Surf. A.: Physicochem. Eng. Aspects* 147 (1999) 365–370.

y condiciones requeridas para la coacervación es aun el formato más popular para las extracciones con estos disolventes. El procedimiento consiste en la extracción de los analitos mediante agitación magnética, la centrifugación para acelerar la separación de fases, la recogida de todo el disolvente supramolecular o una alícuota del mismo y el análisis del extracto directamente o previa dilución con un disolvente orgánico.

Los disolventes supramoleculares producidos a partir de disoluciones de micelas inversas¹¹³ o vesículas¹⁰⁴ de ácidos alquilcarboxílicos son menos densos que el agua y, por tanto, flocculan en la disolución, lo que facilita su extracción. El volumen de disolvente producido “in situ” en tubos cilíndricos de centrifuga se calcula generalmente a partir de la expresión $\pi r^2 h$, donde r es el radio del tubo y h la altura que el disolvente ocupa en el tubo. Se pueden obtener medidas más precisas de h usando tubos de centrífuga con cuellos estrechos especialmente diseñados y un calibre digital. Además, el volumen de disolvente puede calcularse de manera precisa mediante pesada.

La extracción de solutos en muestras sólidas (0.1-1 g) se ha realizado normalmente formando el disolvente supramolecular en agua destilada y añadiendo la mezcla disolvente +disolución de equilibrio a la muestra¹¹² De esta forma, una vez se alcanza el equilibrio, el soluto se distribuye en tres fases, la fase sólida, la disolución acuosa y el disolvente supramolecular. Este formato de extracción es adecuado para compuestos apolares con muy baja solubilidad en agua porque la partición del soluto hacia el disolvente supramolecular está favorecida. Al mismo tiempo, la fase acuosa puede solubilizar componentes de la matriz de la muestra y ayudar a incrementar la selectividad. Sin embargo, aquellos compuestos muy polares y solubles en agua se distribuyen entre el coacervado y la disolución acuosa en

equilibrio, disminuyendo, por tanto, la eficiencia de extracción. Recientemente, se ha propuesto la extracción directa de la muestra sólida con el disolvente para superar esta limitación¹²³. Dicho formato implica la formación del disolvente, su retirada de la disolución acuosa en equilibrio y la extracción directa de la muestra sólida con el mismo. De este modo, se han extraído residuos de fármacos veterinarios (flumequina y ácido oxolínico) con constantes octanol-agua entre 0.94 y 1.5 en pescado y marisco con recuperaciones en el intervalo 99-102%.

Además se ha propuesto y aplicado el uso de los disolventes supramoleculares en microextracciones en una gota (single-drop microextractions, SDME) a la extracción de clorofenoles en aguas ambientales¹⁰⁵. Estos disolventes constituyen una buena estrategia para ampliar la aplicabilidad de la técnica SDME a áreas donde el uso de disolventes orgánicos convencionales inmiscibles con el agua es menos efectivo o no es adecuado, es decir, cuando se vaya a usar LC para la separación de los analitos o cuando se desee extraer compuestos polares o iónicos.

3.5. Compatibilidad con las técnicas de separación y detección

Los disolventes supramoleculares se han usado principalmente en combinación con cromatografía de líquidos unida a detección UV-visible, fluorescente y espectrometría de masas. Los extractos del disolvente, que contienen los analitos, se inyectan normalmente de manera directa en el sistema cromatográfico donde los agregados supramoleculares se destruyen en la fase móvil

¹²³ E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1447–1454.

hidroorgánica produciendo una elevada concentración de monómeros de tensioactivo que no influyen en el comportamiento cromatográfico de los analitos. Sin embargo, cuando se usan fases móviles con alto contenido de agua los agregados se destruyen lentamente en el sistema cromatográfico de modo que llegan a formar una pseudofase donde los analitos se pueden distribuir. Algunas veces, la introducción de un mecanismo de retención adicional puede ser beneficiosa para la separación de los analitos, sin embargo, de manera general, suele ser perjudicial para la resolución cromatográfica y el extracto tiene que diluirse con un disolvente orgánico antes de su inyección en el cromatógrafo de líquidos.

La estructura y las propiedades físico-químicas del tensioactivo son esenciales para la correcta separación y detección de los analitos. Como norma general, cuando se elige la detección por espectrometría de masas el tensioactivo se envía directamente a desecho después de la separación cromatográfica. De esta forma se evita la contaminación de la fuente de ionización y/o la pérdida de eficacia de ionización y de sensibilidad del detector. En la última década se han producido progresos significativos en la combinación de los disolventes supramoleculares y la cromatografía de gases. La mayoría de aplicaciones se centran en la eliminación del tensioactivo antes de la inyección del extracto en el cromatógrafo de gases.

3.6. Aplicaciones analíticas

Los disolventes supramoleculares se han empleado extensamente en las últimas décadas, para la extracción de compuestos orgánicos y metales a partir de muestras ambientales, agroalimentarias y biológicas. El único tipo de coacervación

usado hasta el momento en procesos de extracción analítica ha sido la coacervación simple de agregados supramoleculares (micelas acuosas, micelas inversas y vesículas) de compuestos anfifílicos.

Los SUPRASs constituidos por agregados micelares de tensioactivos no iónicos, obtenidos mediante incremento de la temperatura de la disolución (técnica de cloud point), han sido los más usados en extracciones analíticas. Esto se ha debido fundamentalmente a la escasa atención que se ha prestado al desarrollo de nuevos SUPRAS. Los tensioactivos no iónicos más utilizados han sido alquil fenol etoxilados Triton X-114, Triton X-100 y Genapol X-080, a concentraciones aproximadas del 1%, aunque para algunas aplicaciones (ej. determinación de compuestos bioactivos en muestras biológicas) se requieren concentraciones mayores (3-10%). Los factores de concentración obtenidos con este tipo de SUPRAS no son generalmente elevados (1-10), aunque se pueden incrementar los mismos modificando la composición del SUPRAS mediante la variación de las condiciones ambientales (ej. adicionando sales o incrementando la temperatura). De esta forma, se han obtenido factores de concentración en el intervalo 73-152 para la extracción de estriol, estradiol, estrona y progesterona con Triton X-114 (0.25%) adicionando una sal (0,4M Na₂SO₄) a 45 °C¹²⁴. Otro ejemplo es el uso de SUPRAS formados con 0.1% de Triton X-114 y 0.2M de NaCl a 60°C, para la extracción de residuos de filtros UV (Eusolex 232, Benzophenone-3, Eusolex 6300, Eusolex 9020, Eusolex 2292), con un factor de concentración de 500¹²⁵.

¹²⁴ L. Wang, Y.Q. Cai, B. He, C.-G. Yuan, D.-Z. Shen, J. Shao, G.-B. Jiang, *Talanta* 70 (2006) 47.

¹²⁵ D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, D.A. Lampropoulou, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 19.

Entre los SUPRASs formados por micelas de tensioactivos iónicos los más usados en extracciones analíticas han sido los producidos en medio ácido. Esto se debe a que la principal desventaja que presentan, la formación bajo condiciones extremas (3-4M HCl o 4g NaCl), puede ser muy ventajosa en ciertas aplicaciones, como la extracción de tensioactivos catiónicos a partir de muestras de suelo, lodo y sedimentos¹²⁶. El medio ácido favorece la desorción del tensioactivo de la matriz mediante intercambio iónico. Otras ventajas que han favorecido su utilización es que proporcionan elevados factores de concentración a bajas concentraciones de tensioactivo (140 con 0.1% de dodecano sulfonato¹²⁷ y un comportamiento cromatográfico adecuado para su uso en combinación con espectrometría de masas. Los tensioactivos aniónicos, a diferencia de los no-iónicos, están disponibles comercialmente como un único homólogo por lo que proporcionan un único pico cromatográfico estrecho, facilitando el enviar a desecho la fracción en la que eluye. Por otra parte, se han descrito aplicaciones muy interesantes con SUPRASs constituidos por tensioactivos catiónicos, como la extracción de clorofenoles de muestras acuosas¹²⁸.

La formación de SUPRASs a partir de micelas constituidas por mezclas de tensioactivos iónicos y no iónicos es una excelente estrategia para la extracción de compuestos iónicos. Habitualmente la mezcla se compone de Triton X-114 y los tensioactivos dodecilsulfato sódico, cetiltrimetil amonio o cloruro de cetilpiridinio. Este tipo de SUPRAS se ha aplicado a la extracción de pesticidas, colorantes y ácidos

¹²⁶ M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1046 (2004) 147.

¹²⁷ D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E. A. G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 392 (1999) 2964.

¹²⁸ X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, Anal. Chem. 71 (1999) 514.

húmicos y fúlvicos, a partir de muestras ambientales y biológicas^{129,130}. Por otro lado, la formación de micelas con mezclas de dos tensioactivos no iónicos se ha propuesto para la extracción de PAHs, ya que al parecer presentan una mayor superficie activa comparada con las micelas no iónicas simples; y proporcionan una mayor selectividad. La mayor desventaja de estas micelas es la elevada temperatura de trabajo (78°C) que se recomienda^{131,132}.

Los SUPRASs formados a partir de micelas inversas se han aplicado a la extracción de una amplia variedad de compuestos orgánicos como PAHs, colorantes, alteradores endocrinos, micotoxinas o sustancias bioactivas, en muestras ambientales y agroalimentarias^{133,134,135,136,137,138}. La principal ventaja que presentan estos SUPRAS respecto a los demás, es la elevada concentración de anfifilos que contienen (> 0,75 mg/μL), lo cual permite obtener grandes factores de concentración en muestras líquidas. La extracción de compuestos polares es muy efectiva debido a la posibilidad que tienen estos SUPRAS para establecer puentes de hidrógeno e interacciones polares con los solutos.

¹²⁹ A.R. Zarei, *Anal. Biochem.* 369 (2007) 161-167; N. Pourreza, M. Zareian, *J.Hazard. Mater.* 165 (2009) 1124-1127.

¹³⁰ J.C.A. Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J.A. Caruso, *Analyst* 128 (2003) 453-458.

¹³¹ B.Delgado, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 165-172.

¹³² B.Delgado, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Analyst* 130 (2005) 571-577.

¹³³ A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Béndito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530-539.

¹³⁴ A. Ballesteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Béndito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51-59

¹³⁵ A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Béndito, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168-176.

¹³⁶ A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Béndito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51-58.

¹³⁷ A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Béndito, *Food Addit. Contam. Part. A* 26 (2009) 265-274.

¹³⁸ A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Béndito, *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 19-27.

Los SUPRAS formados a partir de vesículas de ácidos alquil carboxílicos contienen la mayor concentración de anfifilos (1 mg/μL) de todos los SUPRAS descritos hasta la fecha, lo que ha permitido la extracción de solutos con factores de concentración superiores a 700. Además ofrecen una serie de ventajas adicionales como los diferentes tipos de interacciones que pueden establecer (iónicas, puentes de hidrógeno, π -catión e hidrofóbicas), la elevada estabilidad cinética de los agregados que conforman el SUPRAS, así como la gran fuerza de cohesión entre las moléculas que constituyen los agregados. Se han aplicado con éxito a la extracción de pesticidas, alteradores endocrinos y fenoles en muestras de alimentos y ambientales^{139,140,141}.

3.7. Aplicaciones al tratamiento de aguas residuales

La aplicación de los SUPRAS al tratamiento de aguas residuales ha estado limitada hasta la fecha al uso de SUPRASs producidos a partir de micelas de tensioactivos no iónicos¹⁴². Los SUPRASs se consideran una alternativa más eficiente y ecológica que los disolventes orgánicos.

¹³⁹ A.Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, Anal. Chim. Acta 650 (2009) 207-213.

¹⁴⁰ F.J. Ruiz, S.Rubio, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 269-276.

¹⁴¹ A.Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3740-3745.

¹⁴² Haddou, B.; et al. Use of cloud point extraction with ethoxylated surfactants for organic pollution removal. In *The role of colloidal systems in environmental protection*, Monzer Fanun, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2014.

Los tensioactivos más utilizados han sido Triton X-100, Triton X-114 y alquil etoxilados y las aplicaciones se han centrado en la extracción de colorantes^{143,144,145,146,147,148}, fenol, alcohol bencílico y ácidos húmicos¹⁴⁹.

Los problemas más importantes derivados de la utilización de este tipo de SUPRAS en el tratamiento de aguas residuales están relacionados con la elevada temperatura requerida para operación y la considerable concentración de tensioactivo en equilibrio con el disolvente, lo que obliga a la eliminación del mismo después del proceso de purificación.

¹⁴³ Tatara, E.; Materna, K.; Schaadt, A.; Bart, H. J.; Szymanowski, J. Cloud point extraction of direct yellow. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 3110-3115

¹⁴⁴ Melo, R. P. F.; Barros Neto, E. L.; Moura, M. C. P. A.; Castro Dantas, T. N.; Dantas Neto, A. A.; Oliveira, H. N. M. Removal of Reactive Blue 19 using nonionic surfactant in cloud point extraction. *Sep. Purif. Technol.* 2014, 138, 71-76.

¹⁴⁵ Purkait, M. K.; Banerjee, S.; Mewara, S.; DasGupta, S.; De, S. Cloud point extraction of toxic eosin dye using Triton X-100 as nonionic surfactant. *Water Res.* 2005, 39, 3885-3890.

¹⁴⁶ Pourreza, N.; Elhami, S. Removal of malachite green from water samples by cloud point extraction using Triton X-100 as non-ionic surfactant. *Environ.Chem. Lett.* 2010, 8, 53-57.

¹⁴⁷ Chen, J.; Mao, J.; Mo, X.; Hang, J.; Yang, M. Study of adsorption behavior of malachite green on polyethylene glycol micelles in cloud point extraction procedure. *Colloids Surf. A* 2009, 345, 231-236.

¹⁴⁸ Purkait, M. K.; DasGupta, S.; De, S. Performance of TX-100 and TX-114 for the separation of chrysoidine dye using cloud point extraction. *J. Hazard. Mater.* 2006, 137 (2), 827-835.

¹⁴⁹ Haddou, B.; et al. Use of cloud point extraction with ethoxylated surfactants for organic pollution removal. In *The role of colloidal systems in environmental protection*, Monzer Fanun, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2014.

PARTE I

DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES CON
PROPIEDADES DE ACCESO RESTRINGIDO (SUPRAS-
RAM) PARA LA EXTRACCIÓN DE MICOTOXINAS EN
PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

En esta parte de la Memoria se presenta el empleo de disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido (SUPRAS-RAM) para la extracción en diferentes alimentos de algunas de las más importantes micotoxinas reguladas por la Unión Europea (Aflatoxina B1 (AFB1), Ocratoxina A (OTA), Desoxinivalenol (DON), Zearalenona (ZON) y Fumonisinias B1 y B2 (FB₁ y FB₂)).

Todos los SUPRAS son, por su naturaleza intrínseca, sensibles a estímulos ambientales. Ello se debe a que las fuerzas que dirigen el proceso de auto-ensamblaje y coacervación son siempre no covalentes y por tanto reversibles. Los agregados, en los diferentes niveles, se forman mediante un balance de fuerzas de atracción entre las cadenas hidrocarbonadas y de repulsión entre los grupos polares. Si las condiciones ambientales eliminan la repulsión se favorece el crecimiento de los agregados y por tanto la coacervación. En el caso de que se favorezca la repulsión, el coacervado se destruye y se forman agregados de menor tamaño. Podemos por tanto manipular el tamaño de los agregados formados y existe el potencial para manipular las estructuras y propiedades de los SUPRAS para que cumplan funciones específicas (SUPRAS funcionales).

Nuestro grupo de investigación ha descrito por primera vez SUPRAS funcionales que presentan propiedades de acceso restringido¹. Estos SUPRAS-RAM se sintetizan espontáneamente a partir de disolución de ácidos carboxílicos (C8-C14) en tetrahidrofurano (THF) mediante adición de agua. Están formados por agregados hexagonales inversos que contienen cavidades acuosas rodeadas por los grupos alcoholes mientras las cadenas hidrocarbonadas están disueltas en THF (Figura 1).

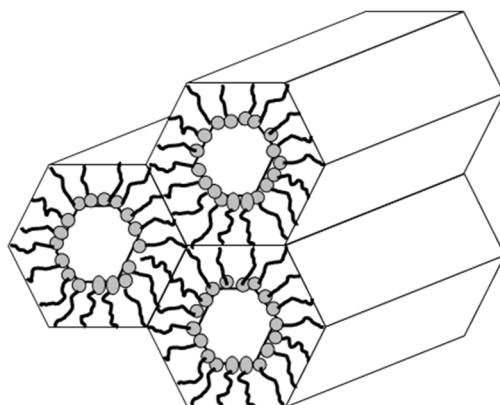


Figura 1. Diagrama esquemático de los agregados inversos de alcohol en el SUPRAS

En la figura 2 se muestran fotografías, obtenidas mediante crio-microscopía electrónica de barrido, del SUPRAS (Fig. 2A), una gotita de coacervado (Fig. 2B) y la superficie porosa de la misma (Fig. 2C).

¹ A. Ballesteros, S. Rubio Anal. Chem. 72 (2006) 7229.

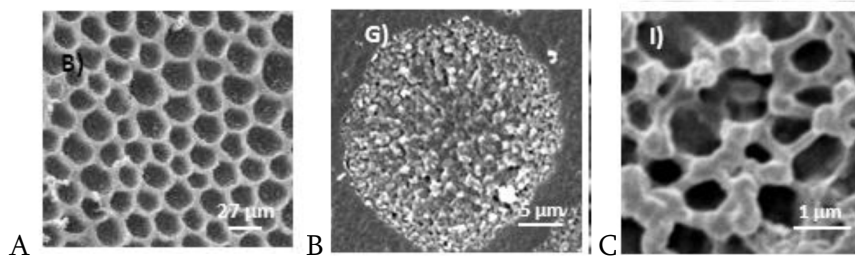


Figura 2. Imágenes obtenidas mediante crio-SEM del (A) SUPRAS, (B) gota de coacervado y (C) superficie porosa de las gotas

Seleccionando el porcentaje de THF y agua en la disolución de síntesis, pueden controlarse la composición del SUPRAS (es decir, la cantidad relativa de alcohol, agua y THF que contiene), el tamaño de las gotitas que lo constituyen y el tamaño de las cavidades acuosas de las estructuras hexagonales invertidas en las que se auto-ensamblan los alcoholes. Como un ejemplo, en la figura 3, obtenidas mediante microscopía óptica, se aprecia cómo aumenta el tamaño de las gotitas que forman el SUPRAS a medida que aumenta el porcentaje de THF en la disolución de síntesis

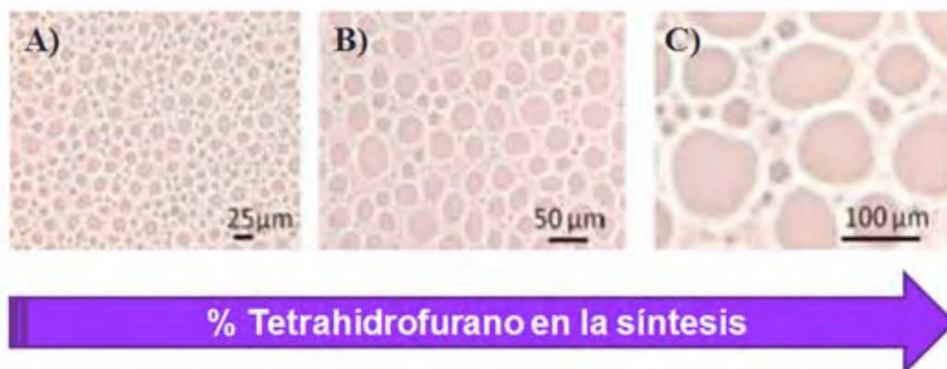


Figura 3. Microfotografías obtenidas mediante microscopía óptica de las gotitas que forman el SUPRAS, sintetizadas a partir de diferentes porcentajes de tetrahidrofurano: (A) 20%, (B) 50% y (C) 60%.

Las nanoestructuras formadas son reversibles y sus características se modifican espontáneamente cuando se producen cambios en el medio en el que se

generan. El auto-ensamblaje sigue rutas predecibles, de forma que tanto la composición como el volumen de coacervado pueden predecirse a partir de modelos matemáticos.

El aspecto más interesante de estos SUPRAS es que el tamaño de las cavidades acuosas de los agregados hexagonales inversos aumenta cuando lo hace el porcentaje de THF en la disolución de síntesis. Ya que existen en los agregados dos microambientes (polar en la cavidad acuosa y apolar en las cadenas hidrocarbonadas disueltas en THF, estos SUPRAS pueden utilizarse como materiales de acceso restringido para sustancias iónicas y/o polares.

Hemos comprobado que la exclusión de macromoléculas por los SUPRAS-RAM puede realizarse a través de mecanismos químicos y físicos. Así las proteínas se eliminan por precipitación inducida por la disminución de la constante dieléctrica en presencia de THF y la formación de complejos con alcoholes. Tanto los polisacáridos como los ácidos húmicos y fúlvicos no se extraen debido a fenómenos de exclusión de tamaño en la cavidad acuosa del SUPRAS-RAM.

Similarmente a los alcoholes, los ácidos carboxílicos originan SUPRAS en mezclas de THF y agua² y los resultados obtenidos hasta la fecha indican que estos también tienen propiedades de acceso restringido. La coacervación de ácidos carboxílicos saturados (C8-C16) e insaturados (C18) ocurre en una amplia variedad de mezclas de agua y disolventes orgánicos, tanto próticos (etilenglicol, metanol,

² F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

etanol, 1-propanol) como apróticos (tetrahidrofurano, NN-dimetilformamida, acetonitrilo, acetona y dioxano).

Los diagramas de fases obtenidos para mezclas ternarias de ácidos alquilcarboxílicos con diferente longitud de cadena hidrocarbonada (C8-C18), tetrahidrofurano y agua presentan tres regiones (Figura 4). La región inferior (I) corresponde a la insolubilización de los ácidos alquilcarboxílicos. La región intermedia (C) corresponde a la formación del SUPRAS, mientras que en la superior (L), el contenido de THF en la mezcla es muy elevado y el disolvente supramolecular es miscible con la fase hidroorgánica. Las tres regiones del diagrama de fases de los tensioactivos sólidos a temperatura ambiente (decanoico, dodecanoico, tetradecanoico y hexadecanoico) son reconocibles visualmente. Sin embargo, la interfase I-C no es detectable para los ácidos octanoico y oleico a simple vista ya que son líquidos inmiscibles con agua a temperatura ambiente (punto de fusión a 16 y 14 °C, respectivamente). En cualquier caso, la composición de la mezcla hidroorgánica que define esta interfase I-C depende de la longitud de la cadena del ácido, ya que el porcentaje de THF requerido para la solubilización del ácido y, por tanto, para la coacervación del mismo aumenta con su hidrofobicidad. La región de formación del disolvente es en todos los casos lo suficientemente amplia para su uso en aplicaciones analíticas.

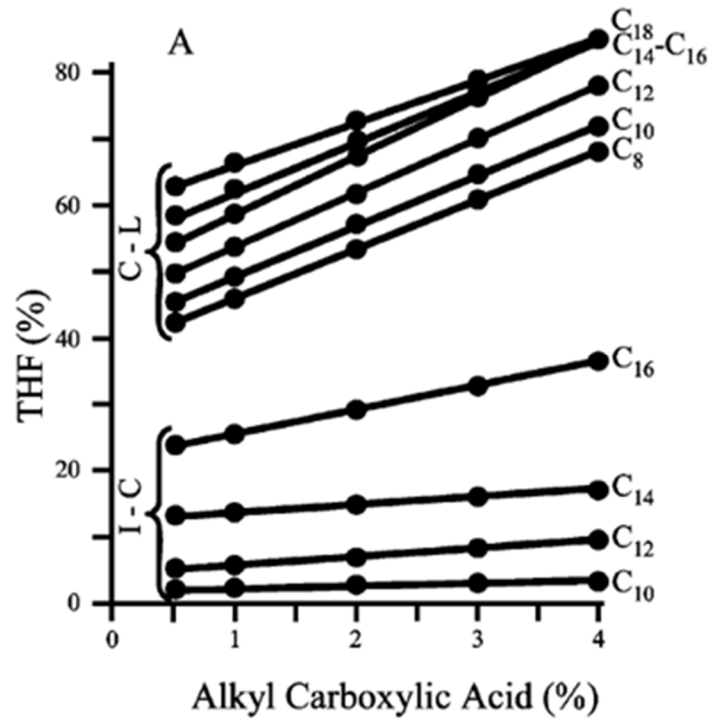


Figura 4. Diagrama de fases para mezclas ternarias de ácido alquilcarboxílicos (C8-C18), THF y agua.

La formación del SUPRAS requiere que los ácidos alquilcarboxílicos estén protonados (pK_a R-COOH= $4,8 \pm 0,2$); por lo tanto su uso en extracciones analíticas implica que éstas deben llevarse a cabo a valores de pH inferiores a 4.

En la parte I de la Memoria se investigará el potencial RAM de los SUPRAS de ácidos carboxílicos para la extracción de micotoxinas en productos agroalimentarios con objeto de simplificar la etapa de tratamiento de muestras.

PARTE I
CAPÍTULO 1

COACERVATIVE EXTRACTION OF OCHRATOXIN A
IN WINES PRIOR TO LIQUID
CHROMATOGRAPHY/FLUORESCENCE
DETERMINATION

**Coacervative extraction of Ochratoxin A in wines prior to liquid
chromatography/fluorescence determination**

Analytica Chimica Acta 617 (2008) 3-10

Sergio García-Fonseca, Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

Abstract

Coacervates made up of reverse micelles of decanoic acid were assessed as a new strategy for the simplification of wine sample treatment in the determination of Ochratoxin A (OTA). Simultaneous extraction/concentration of this contaminant was based on both hydrophobic and hydrogen bond OTA:coacervate interactions. Parameters affecting extraction efficiency and concentration factors were studied. Concentrations of decanoic acid and tetrahydrofuran (THF) were the most influential parameters, being 0.5% of acid and 5% of THF the selected ones. The procedure was very robust, so that the extractions were not influenced by the pH and the nature or concentration of matrix components. OTA recoveries from different types of wines (white, rosé and red) ranged between 85 and 100% and the actual concentration factors varied from 105 to 125 for sample volumes of 15 mL.

The detection limits for OTA, after liquid chromatography/fluorimetry (LC/FL) analysis of the coacervate (20 μL), were 4.5 ngL^{-1} in white and rosé wines and 15 ngL^{-1} in red wines, values which were far below the threshold limit established for OTA by EU directives ($2.0 \mu\text{gL}^{-1}$). No clean-up of the extracts was required for any of the samples analyzed. The overall sample treatment took about 15–20 min and several samples could be simultaneously treated using conventional lab equipment. The precision of the method, expressed as relative standard deviation, was about 5%. The approach developed was successfully applied to the determination of OTA in different wine samples from the South of Spain. The concentrations found ranged between 0.015 and $0.091 \mu\text{gL}^{-1}$.

1. Introduction

The control of food contaminants, like mycotoxins, has become an issue creating a strong demand for analytical methods that permit their rapid determination at the strict regulation limits established. Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced in less amounts by various fungi growing in a wide variety of foods. Among them, Ochratoxin A (OTA) is widespread in cereals and derived cereal products, dried fruits, grape-based beverages, coffee, etc. According to a 2002 report on the assessment of dietary intake of OTA by European people, wine resulted in one of the main dietary sources (10–20%)¹. Occurrence of OTA in wines depends on both environmental and manufacturing conditions and is linked to the action of several fungi species, namely *Aspergillus* (96% of the cases) and

¹ Scientific Cooperation (SCOOP) Task Report 3.2.7, Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States, 2002, http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html.

Penicillium (4%)². OTA is a nephrotoxic substance that causes non-reversible disturbances in kidneys and it has immunosuppressive and neurotoxic properties³. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has considered it as a possible carcinogen to humans (Group 2B). Because of this, there is a growing need for monitoring OTA in food, including wine, for which the EU has set a maximum permitted level of 2.0 µgL⁻¹⁴.

Analytical methods for the determination of OTA in wines are generally based on reverse-phase liquid chromatography coupled to fluorescence detection (LC/FL), although other detection methods, such as photodiode array (PDA)⁵ or tandem mass spectrometry (MS/MS)^{6,7}, and other techniques (e.g. capillary electrophoresis with diode array detection⁸) have also been proposed. Due to the complexity of the matrices, sample preparation usually consists of several steps including clean-up, extraction and concentration.

² N. Magan, M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, 2004.

³ International Agency for Research on Cancer. *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, vol. 56, 1993, 489–521.

⁴ Commission Regulation (EC) no 123/2005 of 26 January 2005 amending regulation (EC) no 466/2001 as regards ochratoxin A, *Off. J. Eur. Union* L25 (2005) 3.

⁵ G.J. Soleas, J. Yan, D.M. Goldberg, *J. Agric. Food. Chem.* 49 (2001) 2733.

⁶ P. Zöllner, A. Leitner, D. Lubda, K. Cabrera, W. Lidner, *Chromatographia* 52 (2000) 818.

⁷ A. Leitner, P. Zöllner, A. Paolillo, J. Stroka, A. Papadopoulou-Bouraoui, S. Jaborek, E. Anklam, W. Lidner, *Anal. Chim. Acta* 33 (2002) 453.

⁸ E. González-Peñas, C. Leache, A. López de Cerain, E. Lizarraga, *Food. Chem.* 97 (2006) 349.

The most frequently used concentration/clean-up technique is the solid-phase extraction (SPE)^{7,9,10,13}. Immunosorbents or immunoaffinity columns (IAC)^{7,10,13}, which offer high selectivity, have been the more extensively used sorbents. In fact, IAC is recommended by the Office International de la Vigne et du Vin (OIV)¹¹ and the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)¹². However, there are important disadvantages associated to IAC; immunosorbents are not recyclable, have a limited storage time and, in some cases, show cross-reactivity with Ochratoxin C¹³. Recently, alternative clean-up/concentration procedures have been reported, which include the use of molecular imprinted polymers (MIPs)^{14,15}, solid-phase microextraction (SPME)¹⁶ and liquid-liquid microextraction with a porous hollow fiber (LPME)¹⁷. With regard to MIPs major disadvantages are the high cost and time to produce them. On the other hand, SPME presents several specific drawbacks, such as the high extraction time necessary (60 min) and the low robustness of the technique regarding the sample pH¹⁶. The application of LPME to OTA extraction also requires long extraction times (2 h) to get concentration factors of around 90 and the use of additional clean-up/concentration steps to get adequate selectivity/sensitivity, which stretch even more the analysis time¹⁷.

⁹ M.J. Hernández, M.V. García-Moreno, E. Durán, D. Guillén, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 117.

¹⁰ A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 89.

¹¹ Office International de la Vigne et du Vin (OIV), *Reduction de L'Ochratoxine A dans les Vins*, Resolution CST 1/2002, Paris, France, 2002.

¹² Association of Official Analytical Chemists (AOAC), *Determination of Ochratoxin A in wine and beer*, Official Method 2001.01, AOAC International, 2002.

¹³ B. Zimmerli, R.J. Dick, *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 85.

¹⁴ N.M. Maier, G. Buttinger, S. Welhartizki, E. Gavioli, W. Lindner, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 103.

¹⁵ J.C.C. Yu, E.P.C. Lai, *Food Chem.* 105 (2007) 301.

¹⁶ A. Aresta, R. Vatinno, F. Palmesano, C.G. Zambonin, *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 196.

¹⁷ E. González-Peñas, C. Leache, M. Viscarret, A. Pérez de Óbanos, C. Araguas, A. López de Cerain, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 163.

As the sample preparation is the bottleneck in wine OTA control and the main reason for low sample throughput, the introduction of new approaches to extract/concentrate this contaminant is desirable and this issue demands research. In this context, this paper investigates the potential of coacervates to simplify sample treatment for OTA determination in wine.

Coacervates constitute a valuable strategy to replace organic solvents in analytical extraction processes. According to the IUPAC¹⁸, coacervation is defined as the separation into two liquid phases (coacervate and equilibrium solution) in colloidal systems. The phenomenon occurs under the action of a dehydrating agent, namely changes in the temperature or the pH of the colloidal solution, or the addition of an electrolyte or a non-solvent for the macromolecule. After separation, the coacervate, a very low volume liquid phase, contains most of the colloidal component. A number of macromolecules have been known to undergo coacervation (i.e. proteins, polysaccharides, drugs, etc.¹⁹). However, the use of coacervates in analytical extractions has largely involved the use of surfactants at levels above their critical aggregation concentration^{20,21,22}. To date, the coacervation

¹⁸ IUPAC Compendium of Chemical Terminology 1972, 31, 611.

¹⁹ B. Gander, M.J. Blanco-Prieto, C. Thomasin, Ch. Wandrey, D. Hunkeler, Coacervation/phase separation, in: J. Swarbrick, J.C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, 2002.

²⁰ W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.

²¹ S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470.

²² R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.

of a variety of surfactant aggregates (i.e. non-ionic²³, zwitterionic²⁴, cationic²⁵ and anionic²⁶ aqueous micelles, reverse micelles²⁷ and vesicles²⁸) has successfully been used for the extraction of pollutants from environmental samples^{29,30,31,32}. A major benefit of the special structure of supramolecular-based coacervates is their high solvation properties for a variety of organic compounds which make them suitable to extract solutes in a wide polarity range.

In this paper, coacervates made up of decanoic acid reverse micelles²⁷ were assessed for the extraction/concentration of OTA prior to LC/FL determination. The aim was to develop a simple and rapid method for the routine control of this contaminant in wine. The selection of this coacervate was based on both its potential for extracting OTA efficiently and its low volume. Parameters affecting extraction efficiency and concentration factors were optimized and the applicability of the proposed method to the determination of OTA in different red, white and rosé wines from the South of Spain was assessed.

²³ H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 28 (1977) 252.

²⁴ T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.

²⁵ X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.

²⁶ I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.

²⁷ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

²⁸ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.

²⁹ F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143.

³⁰ M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 147.

³¹ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr.* 1030 (2004) 109.

³² A. Ballesteros-Gómez, F.-J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid was purchased from Fluka (Madrid, Spain). Tetrahydrofuran (THF), HPLC-grade acetonitrile, methanol and acetic acid glacial were supplied by Panreac (Sevilla, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). OchratoxinA (OTA) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). A stock standard solution of 10 mg L⁻¹ of OTA was prepared in methanol and stored under dark conditions at -20°C. Working solutions were prepared by dilution of the stock solution with methanol.

2.2. Apparatus

The liquid chromatographic system used (Spectra System SCM1000, ThermoQuest, San Jose, CA, USA) consisted of a P2000 binary pump and a FL3000 fluorescence detector. In all experiments a PEEK Rheodyne 7125NS injection valve with a 20 µL sample loop was used (ThermoQuest, San Jose, CA, USA). The stationary-phase column was a Hypersil ODS C8 (5 µm 150 mm×4.6 mm) from Análisis Vinicos (Tomelloso, Spain). A Mixtasel Selecta centrifuge was employed for sample preparation. An Ostwald capillary viscosimeter was used for the determination of the dynamic viscosity of the coacervate.

2.3. Determination of OTA in wine samples

2.3.1. Sample collection and preservation

Wine samples were purchased in supermarkets from Córdoba (Spain) and were stored at 4°C until their analysis. Red wines were microfiltered through 0.45 µm nylon filter membranes (Análisis Vínicos S.L. Tomelloso, Spain) to remove suspended solids. All selected wines were manufactured from grapes which had grown in plantations from the South of Spain.

2.3.2. Coacervate-based extraction

Decanoic acid (80 mg) was dissolved in THF (0.8 mL) in a specially designed glass tube with a narrow neck (Fig. 1). Then, 15 mL of wine sample (pH 3–3.5) were added. Immediately, the coacervate phase separated from the bulk solution. The mixture was stirred (5 min, 800 rpm) to favour OTA extraction and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min to accelerate the complete separation of the coacervate phase. Then the volume of the coacervate, which was standing at the neck of the glass tube, was measured with a digital calliper. The small internal diameter of the tube neck (~7.5 mm) facilitated the extraction of the low volume of coacervate obtained (120–130 µL) and the accuracy of the measurements. Finally, 20 µL of coacervate were withdrawn with a microsyringe and injected into the LC/FL system.

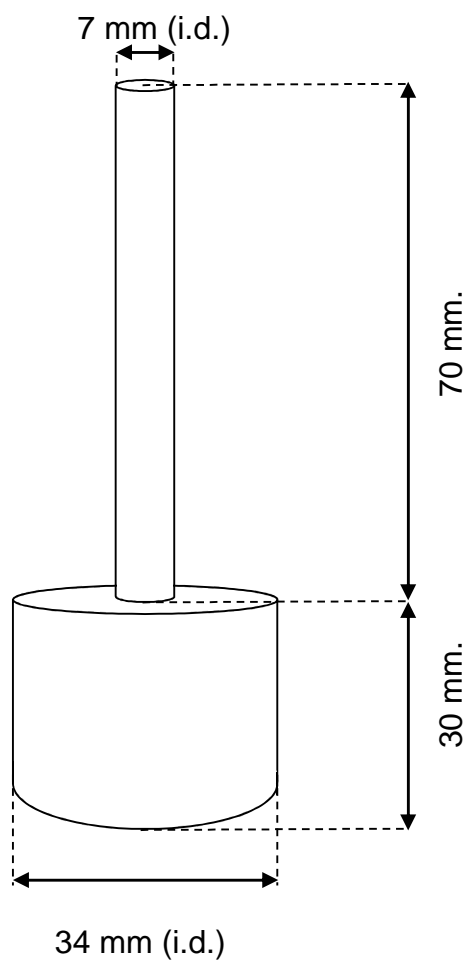


Figure 1. Schematic picture with the dimensions of the glass centrifuge tube designed for coacervate-based extraction.

2.3.3. Liquid chromatography/fluorimetry

Quantification of OTA and separation from the matrix components were carried out by liquid chromatography/fluorimetry. The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 1% acetic acid. The elution program was: linear gradient from 60 to 50% in A for 15 min and then

isocratic conditions (50% A and 50% B) for 20 min. The flow-rate was 1 mL min⁻¹. OTA was monitored at λ_{ex} 334 nm and λ_{em} 460 nm. Quantification was performed by measuring peak areas. Calibration curves for OTA in methanol were linear in the range 2–5000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3. Results and discussion

3.1. Decanoic acid reversed micelle coacervate-based extraction of OTA

3.1.1. Coacervate description

Decanoic acid dissolves in THF forming reverse micelles. The addition of water to this binary system causes partial desolvation of the micellar aggregates which makes micelle–micelle interaction easier. As a result, big supramolecular aggregates are formed that separate from the bulk solution as an immiscible liquid phase named coacervate²⁷. So, water, a non-solvent for the decanoic acid, is the inductor agent of the coacervation. At a microscopic level, the structure of the coacervate consists of spherical droplets made up of a variable number of reverse micelles that are dispersed in the water:THF continuous phase. As reverse micelles are produced from the protonated decanoic acid form ($\text{p}K_{\text{a}}$ 4.8±0.2), pH values below 4 are required for the formation of the coacervate.

Fig. 2 shows the relative concentration of the three coacervate components at which coacervation is produced in the aqueous bulk solution. Beyond the boundaries of the coacervation region, the decanoic acid precipitates or solubilizes in the water:THF mixture. Supramolecular aggregates in the coacervate provide two

types of interactions for the extraction of solutes, namely van der Waals interactions in the decanoic acid hydrocarbon chain and hydrogen bonds in the micellar core, so a number of analytes can be extracted efficiently with this solvent. The volume of coacervate is a function of both, the decanoic acid concentration and the percentage of THF, and a mathematical expression has previously been derived that permits to know *a priori* the volume of coacervate that can be obtained under given experimental conditions³².

3.1.2. Wine as an inductor agent of the coacervation

Wine samples have a high water content, 0.87 g mL^{-1} ³³, so they were expected to induce the coacervation of reverse micelles of decanoic acid.

³³ United States Department of Agriculture (USDA) Nacional Database for Standard Reference, Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.

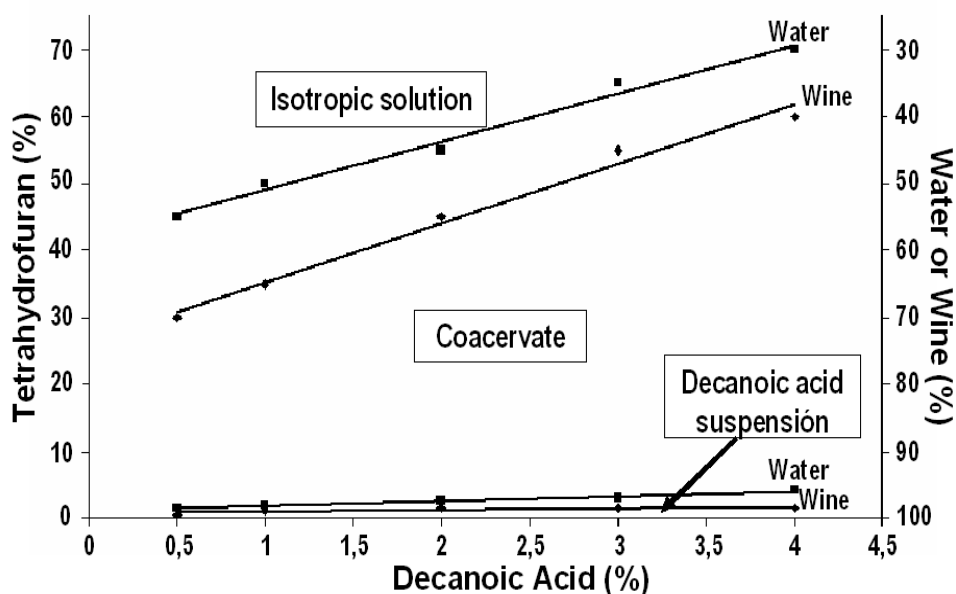


Figure 2. Diagrams of phase boundaries corresponding to the ternary systems tetrahydrofuran, decanoic acid and water or wine.

Fig. 2 shows a typical phase diagram obtained from ternary mixtures made up of decanoic acid:THF and wine. All the samples investigated, including white, rosé and red wines, behaved similarly. The phase diagrams always showed three regions, which were a function of the relative THF:wine percentage and corresponded to regions where the decanoic acid was precipitated, coacervated or solubilized. The boundaries in the phase diagrams moved towards lower THF percentages compared with those obtained in ternary mixtures containing distilled water. This behaviour was the result of the higher solubilization capability of the wine sample for decanoic acid owing to the presence of ethanol in its composition (11–13%, v/v³³). It was checked that other major components of wines (proteins, 0.74 mg mL⁻¹; carbohydrates, 27.41 mg mL⁻¹; condensed tannins, 0.6471 and 0.0085 mg mL⁻¹ for

red and white wines, respectively)^{33,34} did not have any influence on phase diagrams. Although the region encompassed by coacervates was slightly smaller in the presence of wine, this behaviour had not analytical consequences since the coacervating region was wide enough and extractions are usually carried out at coacervate compositions near the lower phase boundary in order to use the minimal amount of THF.

The density and dynamic viscosity of the coacervates produced in wine samples under typical experimental conditions (e.g. decanoic acid 0.5%, THF 5%) were determined. The value of the density was $0.920 \pm 0.008 \text{ g mL}^{-1}$. The dynamic viscosity was determined at 25°C (room temperature) using an Ostwald capillary viscosimeter calibrated against distilled water. Flow times were recorded with a stopwatch with reproducibility within $\pm 0.5 \text{ s}$. The viscosity value was $3.4 \pm 0.2 \text{ mPa s}$, which was about four-fold higher than that for water at the same temperature (0.905 mPa s) but smaller than that of liquid decanoic acid (melting point 31°C), which was 4.95 mPa s at 40°C³⁵. So, the viscosity of the coacervate was not a problem for its withdrawn and injection into the LC system.

In red wine samples, a reddish precipitate, which was standing at the bottom of the coacervate as a very thin layer, was extracted. This precipitate was caused by the condensed tannins present in red wines, their content being especially high ($0.6471 \text{ mg mL}^{-1}$) compared to that of white wines ($0.0085 \text{ mg mL}^{-1}$). Condensed

³⁴ United States Department of Agriculture (USDA) Nacional Database for the proanthocyanidin content of selected foods, Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/PA/PA.html>1987.

³⁵ G. Knothe, K.R. Steidley, *Fuel* 84 (2005) 1059.

tannins have been reported to bond to proteins and form large colloidal particles³⁶. These macromolecules were agglutinated by the reverse micelles and extracted by the coacervate, but they did not interfere in the recovery of OTA.

3.1.3. Optimisation

Optimisation studies were carried out by extracting red and white samples (10–40 mL) fortified with 1.5 μgL^{-1} of OTA under a variety of experimental conditions (0.1–3% decanoic acid; 1.5–30% THF; pH 0.5 to 3.5; stirring time 0–60 min). Experiments were made in triplicate. Selection of the optimal conditions was based on the recoveries (R) and actual concentration factors (ACF) obtained for OTA. Phase volume ratios (PVR) were calculated as the ratio of the sample volume over the coacervate volume, so they represented the maximum concentration factors that could be obtained under given experimental conditions.

Ochratoxin A is a hydrophobic compound (its octanol–water partition coefficient; $\log K_{ow}$, is 4.74) and, because of their pK_a values (4.4 for the acid group and 7.1 for the alcohol one), OTA is neutral at pH values below 4, at which the coacervate is produced. Consequently, the expected driving forces for the extraction were van der Waals interactions between the hydrocarbon chains of the decanoic acid and the OTA aromatic framework, and hydrogen bonds, on account of the acceptor and donor groups of the analyte.

³⁶ K.J. Siebert, LWT- Food Sci. Technol. 39 (2006) 987.

3.1.3.1. Phase volume ratios. The volume of coacervate obtained, and consequently the sample/coacervate volume ratio (PVR), was mainly dependent on the amount of decanoic acid and THF added to the wine samples as they are major components of the coacervate. Water did not incorporate to the extractant phase in a significant proportion due to its nonsolvent character for the reverse micelles.

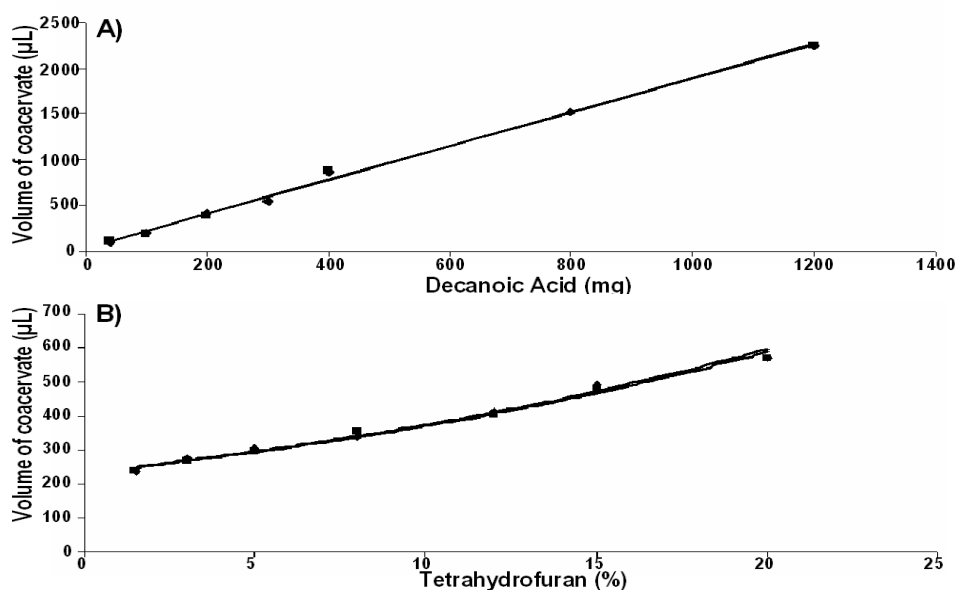


Figure 3. Volume of coacervate (μL) as a function of: (A) the decanoic acid amount (10% THF) and (B) the tetrahydrofuran percentage (decanoic acid 200 mg), for both white and red wines.

The volume of coacervate was linearly dependent on the amount of surfactant used (Fig. 3A), independently of the type of wine or percentage of THF investigated. The corresponding equations for white and red wine (10% THF) were $y=32\pm 26 + 1.86\pm 0.05x$ and $y=38\pm 38 + 1.86\pm 0.07x$, respectively, where y was the volume of coacervate in μL and x the amount of decanoic acid in mg. The correlation coefficients (r^2) were 0.997 and 0.996. Taking into account that according to previous

results the relationship between the coacervate volume and the THF percentage was exponential (Fig. 3B). The corresponding equations (decanoic acid = 200 mg) were $y = 240 \pm 8 e^{0.045 \pm 0.002x}$ ($r^2 = 0.98$) and $y = 237 \pm 7 e^{0.045 \pm 0.002x}$ ($r^2 = 0.990$) for white and red wines, respectively, where y was the volume of the coacervate in μL and x the percentage of THF. The pH of wine samples (range 0.5–3.5) had only minor influence on the volume of the coacervate. This volume kept constant for pH values above 2 and then decreased for stronger acidic conditions in percentages of 5 and 27% from pH 2 to 1.75 and 0.5, respectively.

According to these results, the highest phase volume ratios will be obtained using low amounts of decanoic acid and THF and forming the coacervate under strong acidic conditions. So, recommended coacervate compositions for extraction are those near the lower boundary in the phase diagrams (Fig. 2) provided that they give good extraction efficiencies for OTA. On the other hand, very strong acidic conditions are not recommended for the extraction of OTA since, although the quantitative acid hydrolysis of this compound only occurs under very drastic conditions (e.g. between 6 and 18 M HCl and reflux for 48 h^{37,38,39}), there is no data about its stability under lower acidities at room temperature. We checked that no degradation of OTA occurred under the experimental conditions selected for its extraction (pH 3–3.5) and chromatographic separation (mobile phase containing 1% acetic acid).

³⁷ K.J. Van der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, J. Chem. Soc. 1304 (1965) 7083.

³⁸ P.S. Steyn, C.W. Holzapfel, Tetrahedron Lett. 23 (1967) 449.

³⁹ D. Rousseau, G. Slegers, c. Van Peteghem, A. Claeys, J. Labelled Compd. Radipharm. 21 (1984) 429.

3.1.3.2. Recoveries and actual concentrations factors. Recoveries (R) for OTA were investigated using fortified red and white wines ($1.5 \mu\text{gL}^{-1}$ of OTA) and the corresponding actual concentration factors were calculated ($0.01 \times R(\%) \times \text{PVR}$) by measuring the respective coacervate volumes with a digital calliper.

Decanoic acid concentration was the most influential parameter on recoveries; they were higher than 85% at surfactant concentrations as low as 0.5% and significantly decreased at lower concentrations (Table 1). Although quantitative extractions were obtained for decanoic acid above 2%, a concentration of 0.5% was selected as optimal on the basis that it provided the best possible ACF for OTA at recovery values high enough for its reproducible quantification. In order to estimate the effect of wine matrix components on OTA recoveries, the extraction of OTA from distilled water as a function of decanoic acid concentration was investigated. The results obtained are included in Table 1. Matrix components decreased recoveries at the lowest decanoic acid concentrations studied (e.g. below 0.3%) and scarcely influenced them as the concentration increased, which reinforce the use of the selected concentration (i.e. 0.5%).

Table 1 – Mean percent recoveries and standard deviations and actual concentration factors obtained for Ochratoxin A in red and white wines and water using different decanoic acid concentrations

Decanoic acid (%)	Red wine		White wine		Water	
	^a R± ^b S (%)	^c ACF	^a R± ^b S (%)	^c ACF	^a R± ^b S (%)	^c ACF
0.1	50 ± 10	193	40 ± 2	152	60 ± 5	317
0.25	76 ± 2	184	71 ± 1	160	80 ± 2	169
0.5	88 ± 4	114	88 ± 1	96	90 ± 1	95
1	92 ± 1	42	91 ± 1	46	93 ± 4	52
2	97 ± 2	24	97 ± 2	25	100 ± 2	26
3	98 ± 1	17	98 ± 1	18	100 ± 1	18

^aRecoveries.
^bStandard deviation; n=3.
^cActual concentration factors; THF= 10%.

With regard to the influence of THF, maximal extraction efficiencies were obtained in the range 3–12%, beyond it, recoveries progressively decreased (Table 2). According to previous studies²⁷, decanoic acid incorporates progressively to the coacervate from the bulk solution at low THF concentrations, so the low recovery obtained at 1.5% THF was in agreement with the fact that only a fraction of the surfactant was incorporated to the coacervate. On the other hand, the solubility of OTA in the bulk solution increased as the THF concentration did, which resulted in decreased partition coefficients for THF percentages of above 15%. We selected 5% THF, which gave recoveries around 90–95% and actual concentration factors about 120.

The pH of wine samples did not affect recoveries in the range 2–3.5, but it caused a slightly decreased at lower pHs (e.g. recovery was 80% at pH 0.5). As most of the wine samples have pHs around 3–3.5, it was not necessary to adjust them

before extraction. Extraction equilibrium conditions were rapidly reached; maximal recoveries were achieved after stirring the wine samples for 1 min at 700 rpm.

Table 2 – Mean percent recoveries and standard deviations and actual concentration factors obtained for Ochratoxin A in red and white wines and water using different tetrahydrofuran percentages

THF (%)	Red wine		White wine		Water	
	^a R _± ^b S (%)	^c ACF	^a R _± ^b S (%)	^c ACF	^a R _± ^b S (%)	^c ACF
1.5	77 ± 3	129	82 ± 1	139	91 ± 4	153
3	90 ± 2	135	91 ± 7	132	96 ± 2	146
5	95 ± 2	124	90 ± 2	117	98 ± 1	141
7.5	92 ± 1	103	88 ± 3	106	95 ± 2	105
10	91 ± 4	91	88 ± 4	84	93 ± 5	89
15	78 ± 8	65	82 ± 6	66	88 ± 6	72
20	64 ± 3	55	57 ± 3	40	93 ± 7	47
25	36 ± 4	28	53 ± 4	36	87 ± 3	37
30	17 ± 6	38	30 ± 4	31	85 ± 5	28

^aRecoveries.
^bStandard deviation; n=3.
^cActual concentration factors; decanoic acid = 0.5%.

The volume of wine sample to be analysed was selected to get around 100 µL of coacervate per sample, which permitted 2–3 different chromatographic runs in a reliable way (20 µL each injection). So, a volume of wine sample of 15mL was chosen, which provided volumes of coacervate around 120–130 µL.

3.2. Analytical performance

Calibration curves for OTA were run using standard solutions prepared in methanol. No differences in peak areas or retention times were observed for the analytes injected in organic solvent or coacervates. The retention time for OTA was 15.8 min. The correlation between peak areas and OTA concentration (2–5000 µg

L⁻¹) was determined by linear regression and was 0.99998, indicating a very good fit. The slope of the calibration curve was 102.6±0.2 L µg⁻¹ (*n* = 7). The instrumental detection limit was calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 3 and it was 0.6 µg L⁻¹. The detection limit of the method was calculated by analysing white, rosé and red wines under the proposed experimental conditions (Section 2.3). Samples were selected to give OTA concentrations below the detection limit. The values of LOD found were 4.5 ng L⁻¹ for white and rosé wines and 15 ng L⁻¹ for the red ones, on account of the higher noise value in these more complex samples.

The possible interference of matrix components that could elute with OTA was assessed by the comparison of the slopes of the calibration curves (*n* = 7) obtained from standards in distilled water with those obtained from two red and two white wines, fortified with known amounts of OTA (0.03–0.1 µg L⁻¹), and run using the whole procedure. The slopes of the calibration curves were 14.8±0.8 ng L⁻¹ in water and 10.4±0.5 and 11.2±0.7 ng L⁻¹ in white and red wines, respectively. Differences in both types of calibration curves were only due to the different ACF reached in water (~145) and in wines (105–125), so matrix components were not expected to interfere in the OTA determination, although the greater background noise produced in red wine matrices increased the detection limit three-fold.

The precision of the method was evaluated by the extraction of 11 independent fortified samples using red (*n* = 4), white (*n* = 4) and rosé (*n* = 3) wines. The value, expressed as relative standard deviation (R.S.D.), was about 5%.

3.3. Analysis of wine samples

Red, white and rosé wines from different origin were analysed in order to prove the suitability of the proposed method for the routine control of OTA. Table 3 shows the concentrations found as well as the recoveries obtained after spiking the samples with variable amounts of this contaminant. Values for concentrations of OTA and for recoveries were expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. Recoveries ranged between 85 and 100%, 91 and 99% and 85 and 94% for red, white and rosé wines, respectively, with relative standard deviations ranging from 1 to 7%.

OTA was quantified in four of the samples analysed (3 white wines and 1 rosé one), their concentration ranging between 0.015 and 0.091 $\mu\text{g L}^{-1}$. These concentrations were far below the threshold limit set for OTA in wines by EU directives (2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$)⁴.

Chromatograms obtained from (A) an OTA standard solution in methanol (7.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), (B) a white wine sample naturally contaminated with OTA (0.063 $\mu\text{g L}^{-1}$), (C) a non-contaminated ([OTA] < L.O.D.) red wine sample and (D) a spiked (0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) red wine sample, are shown in Fig. 4. No interference from matrix components was detected for any of the samples analysed.

Table 3 – Mean concentrations and recoveries and the respective standard deviations obtained for OTA in the analysis of red, white and rosé wines using the proposed method

Concentrations ± ^a S (µg L ⁻¹) and recoveries ± ^a S (%)					
Red wines		White wines		Rosé wine	
Córdoba 1	< L.O.D. ^b	Montilla 1	< L.O.D. ^b	La Mancha 2	0.091±0.002
Spiked sample ^c	90 ± 3	Spiked sample ^d	96 ± 1	Spiked sample ^c	91 ± 7
Córdoba 2	< L.O.D. ^b	Montilla 2	0.063±0.002	Valdepeñas 3	< L.O.D. ^b
Spiked sample ^e	89 ± 4	Spiked sample ^f	96 ± 3	Spiked sample ^g	85 ± 4
Granada 1	< L.O.D. ^b	Montilla 3	0.016±0.002	La Mancha 3	< L.O.D. ^b
Spiked sample ^g	100 ± 3	Spiked sample ^h	97 ± 5	Spiked sample ^c	88 ± 3
Valdepeñas 1	< L.O.D. ^b	Valdepeñas 2	< L.O.D. ^b	Valdepeñas 4	< L.O.Q. ^h
Spiked sample ^c	85 ± 4	Spiked sample ^h	91 ± 3	Spiked sample ^c	87 ± 1
La Mancha 1	< L.O.Q. ^h	Huelva 1	0.015±0.001	La Mancha 5	< L.O.D. ^b
Spiked sample ^c	92 ± 7	Spiked sample ^j	99 ± 2	Spiked sample ^c	94 ± 4

Decanoic acid = 0.5%; tetrahydrofuran = 5%; sample volume = 15 mL.
^aStandard deviation; n=3.
^b(Lower than the detection limit).
^c(0.1 µg L⁻¹)
^d(0.055 µg L⁻¹).
^e(0.0855 µg L⁻¹).
^f(0.07 µg L⁻¹).
^g(0.4 µg L⁻¹).
^h(0.025 µg L⁻¹).
ⁱ(Lower than the quantification limit).
^j(0.04 µg L⁻¹).

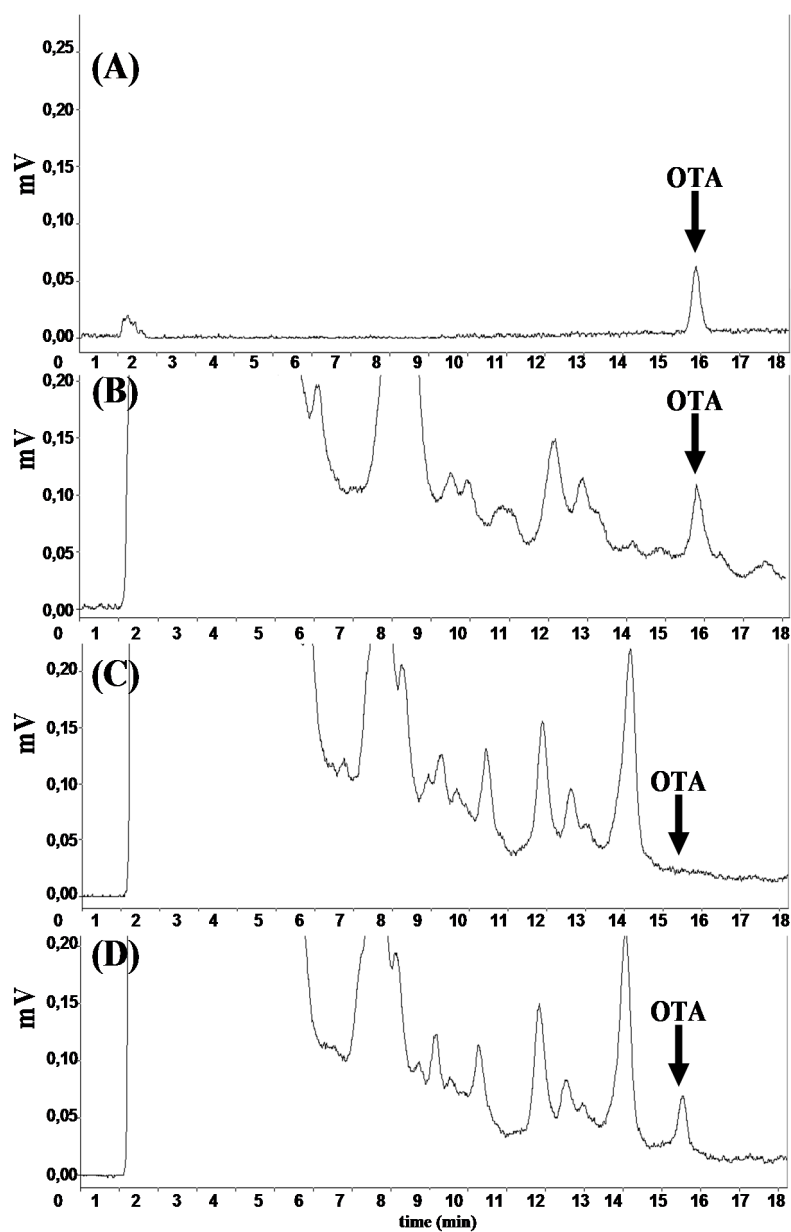


Figure 4. LC/fluorescence chromatograms obtained from (A) an OTA standard ($7.5 \mu\text{g L}^{-1}$) in methanol; (B) a white wine sample naturally contaminated with OTA ($0.063 \mu\text{g L}^{-1}$); (C) a non-contaminated ($[\text{OTA}] < \text{L.O.D.}$) red wine sample and (D) a spiked ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) red wine sample.

4. Conclusions

Coacervates made up of reverse micelles of decanoic acid in THF have been proven to be a valuable tool for the extraction and concentration of OTA from wines (white, red and rosé), offering a simple, inexpensive and rapid alternative for the usually tedious and time-consuming sample treatment methods. The extraction process is robust (extractions were not significantly influenced by the pH and the nature or concentration of the matrix components), simple (sample pre-treatment only involved the microfiltration of red wines to remove suspended solids) and rapid (the complete extraction procedure took about 20 min and several samples were simultaneously extracted). It requires low sample volume (15 mL wine), features low cost (conventional equipment in labs is used for extraction) and achieves actual concentration factors around 105–125 for the target compound, which result in detection limits of 4.5 ng L⁻¹ for white and rosé wines, and 15 ng L⁻¹ for the red ones. Thus, the method developed can be used for the routine control of OTA in wines below the tolerance level permitted by the European Directives (2 µg L⁻¹)⁴.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MCyT (Project CTQ2005-00643). S. García-Fonseca acknowledges to the Spanish MEC the doctoral fellowship awarded (BES-2006-12643).

PARTE I
CAPÍTULO 2

SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED
MICROEXTRACTION OF OCHRATOXIN A IN RAW
WHEAT PRIOR TO LIQUID CHROMATOGRAPHY-
FLUORESCENCE DETERMINATION

Supramolecular solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat prior to liquid chromatography-fluorescence determination

Journal of Chromatography A, 2010, 1217, 2376–2382

Sergio García-Fonseca, Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

Abstract

A supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid, dispersed in a continuous phase of THF:water, was proposed for the simple, fast and efficient microextraction of OTA in wheat prior to liquid chromatography-fluorescence determination. The method involved the stirring of 300 mg wheat subsamples (particle size 50 μm) and 350 μL of supramolecular solvent for 15 min, subsequent centrifugation for 15 min and the direct quantitation of OTA in the extract, previous 5.7-fold dilution with ethanol/water/acetic acid (49.5/49.5/1), against solvent-based calibration curves. No clean-up of the extracts or solvent evaporation was needed. Interactions between the supramolecular solvent and major matrix components in the wheat (i.e. carbohydrates, lipids and proteins) were investigated. The reverse micelles in the extractant induced gluten flocculation but only in the coacervation region of lower analytical interest (i.e. at percentages of THF above 11%). The quantitation of OTA was interference-free. Representativity

of the 300 mg-wheat subsamples was proved by analysing a reference material. OTA recoveries in wheat ranged between 84% and 95% and the precision of the method, expressed as relative standard deviation, was 2%. The quantitation limit of the method was 1.5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ and was below the threshold limit established for OTA in raw cereals by EU directives (5.0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$). The method developed was validated by using a certified reference material and it was successfully applied to the determination of OTA in different wheat varieties from crops harvested in the South of Spain. OTA was not detected in any of the analysed samples. This method allows quick and simple microextraction of OTA with minimal solvent consumption, while delivering accurate and precise data.

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is one of the most widespread and hazardous mycotoxins contaminating foodstuffs¹. It is produced by several fungi (*Aspergillus* and *Penicillium* species) in a variety of plant products, such as cereals, pulses, coffee, wine, grape juice, dried fruits and spices². OTA is considered a potent nephrotoxic and genotoxic agent³ and has been classified as a possible human carcinogen (group

¹ Commission Regulation (EC) no 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, Off. J. Eur. Commun. L70 (2005) 12.

² Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Ochratoxin A in food. Question number EFSA-Q-2005-154, adopted on 4 April 2006. The EFSA Journal, 365 (2006) 1, available online at http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620762138.htm.

³ Scientific Committee on Food. Opinion on aflatoxins, ochratoxin A and patulin, expressed on 23 September 1994. Food Science and techniques, 35th series, Published by European Commission, Directorate-General Industry, 1996, p. 45. Available online at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scf_reports_35.pdf.

2B) by the International Agency for Research on Cancer⁴. Monitoring OTA in cereals has become an important issue worldwide due to both the impact on human health and the high economic losses associated to crop production. In fact, among the most frequently contaminated food commodities, cereals are the main European dietary source of OTA (44%), increasing this value in the case of Spain (60%)⁵. The European Union has established maximum residue levels (MRLs) of OTA in raw cereals and derived products of 5 and 3 µg Kg⁻¹, respectively⁶.

Several official methods are available for surveillance of OTA residues in cereals and cereal products (e.g. barley^{7,8,9,10}, wheat flour¹¹, barley, wheat bran and corn¹² and wheat, rye and corn⁹). Liquid chromatography with fluorescence detection (LCFL), which provides quantitation limits between 0.1 and 10 µg Kg⁻¹, is by far the most used technique for OTA determination. Recoveries and relative standard deviations for these methods range in the intervals 65–100% and 10–20%, respectively. On the other hand, several non-official LC-FL methods, affording

⁴ International Agency for Research on Cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins; International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, vol. 56, 1993, pp. 489–521.

⁵ Scientific Cooperation (SCOOP) Task Report 3.2.7, Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States, 2002, <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index.en.html>.

⁶ Commission Regulation (EC) no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Off. J. Eur. Union L364 (2006) 5.

⁷ European Committee for Standardization (CEN), 2003, Method EN 14132:2003 for the determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee. HPLC method with immunoaffinity column clean-up. Publication date 21 May 2003, CEN Brussels, Belgium.

⁸ A.C. Entwisle, A.C. Williams, P.J. Mann, P.T. Slack, J. Gilbert, J. AOAC Int. 83 (2000) 1377.

⁹ S. Nesheim, M.E. Stack, M.W. Trucksess, M. Eppley, J. AOAC Int. 75 (1992) 481.

¹⁰ S. Nesheim, N.F. Hardin, O.J. Francis, W.S. Langham, J. AOAC Int. 56 (1973) 817.

¹¹ European Committee for Standardisation (CEN), in: Document prEN-ISO 15141-1 on Food analysis, Horizontal methods – Mycotoxins, CEN, Brussels, Belgium, 1996.

¹² European Committee for Standardisation (CEN), in: Document prEN-ISO 15141-2 on Food analysis, Horizontal methods – Mycotoxins, CEN, Brussels, Belgium, 1996.

recoveries above 75%, have been reported^{13,14,15}; many of them constituting a good alternative to official methods in terms of sensitivity, reproducibility and/or simplicity. Immunochemical methods, highlighting immunosensors based on enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)¹⁶, have been proposed as simple on-site screening methods (detection limits in the $\mu\text{g Kg}^{-1}$ range).

Due to the complexity of food matrices, sample preparation (extraction, concentration and clean-up) is essential in OTA analysis. Solvent extraction is by far the most used strategy for isolation of OTA from cereals and derived products. A variety of solvents and solvent mixtures, including acidified chloroform^{9,10,12,17}, methanol–aqueous bicarbonate¹⁵, methanol–phosphate buffer^{18,19}, acidified toluene–magnesium chloride¹¹ and acetonitrile–water^{7,8,20}, have been proposed. The volume of organic solvent consumed per sample is relatively high (50–250 mL) and after extraction, further clean-up is usually needed. Immunoaffinity chromatography (IAC) is widely used for sample clean-up^{8,15,17,18,19,20,21}, although other approaches, including purification through a silica gel column¹¹, defatting with n-hexane¹⁷ or filtration through diatomaceous earth followed by back-extraction with aqueous bicarbonate and purification through C18

¹³ C. Juan, A. Pena, C. Lino, J.C. Moltó, J. Mañés, *Int. J. Food Microbiol.* 127 (2008) 284.

¹⁴ C. Juan, J.C. Moltó, C. Lino, J. Mañés, *Food Chem.* 107 (2008) 525.

¹⁵ Y. Sugita-Konishi, T. Tanaka, M. Nakajima, K. Fujita, H. Norizuki, N. Mochizuki, K. Takatori, *Talanta* 69 (2006) 650.

¹⁶ S.H. Alarcón, G. Palleschi, D. Compagnone, M. Pascale, A. Visconti, I. Barna-Vetró, *Talanta* 69 (2006) 1031.

¹⁷ M. Solfrizzo, G. Avataggiato, A. Visconti, *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 67.

¹⁸ M. Sharman, S. MacDonald, J. Gilbert, *J. Chromatogr.* 603 (1992) 285.

¹⁹ C. Juan, C.M. Lino, A. Pena, J.C. Moltó, J. Mañés, I. Silveira, *Talanta* 73 (2007) 246.

²⁰ D. Chan, S.J. MacDonald, V. Boughtflower, P. Brereton, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 13.

²¹ G. Buttinger, E. Fuchs, H. Knapp, F. Berthiller, R. Schumacher, E.-M. Binder, R. Krska, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 1107.

cartridges^{9,10,12}, are also being used. Recently, new strategies including matrix solid phase dispersion (MSDP), which combines extraction and clean-up in one step and considerably reduces solvent consumption²², and molecularly imprinted polymers (MIP), which provide selectivity comparable to IAC without the cost of producing antibodies²³, have been reported. So far, IAC surpasses other reported clean-up methods in versatility (e.g. it is applicable to a wider range of matrices), selectivity (e.g. it provides cleaner extracts and consequently lower quantification limits) and reproducibility (e.g. usually, relative standard deviations are below 5%)^{15,17}. However, IAC presents important disadvantages for routine analysis; immunoaffinity columns are expensive, not recyclable, have a limited storage time and, in some cases, show cross-reactivity with ochratoxin C²⁴.

²² J. Blesa, H. Berrada, J.M. Soriano, J.C. Moltó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 127.

²³ S.N. Zhou, E.P.C. Lai, J.D. Miller, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1903.

²⁴ B. Zimmerli, R. Dick, *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 85.

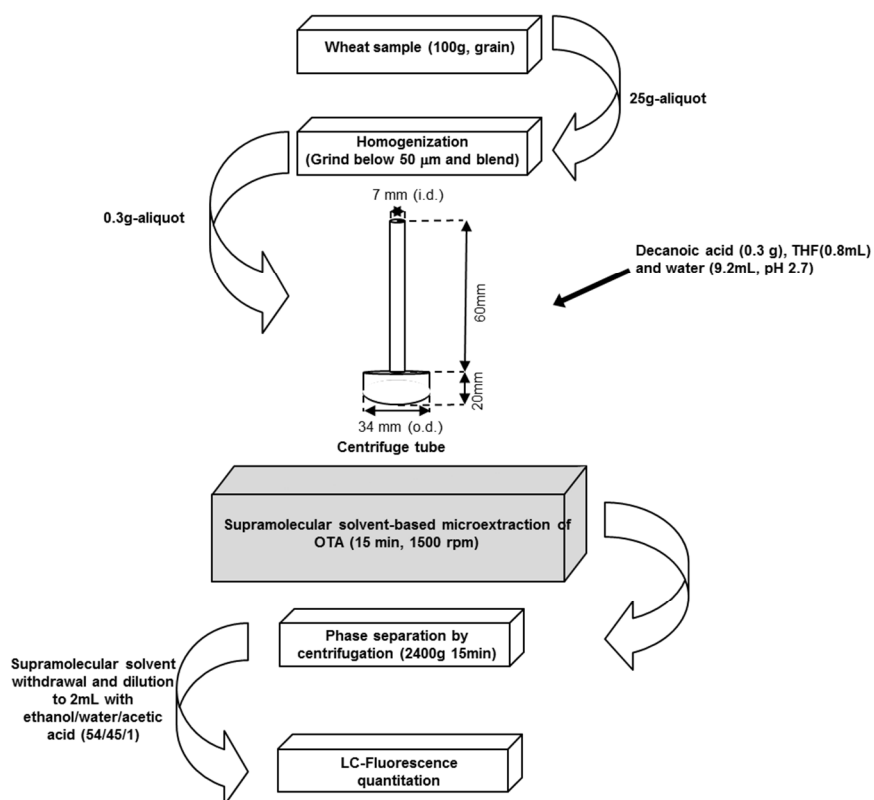


Figure 1. Scheme of the different steps followed for the analysis of OTA in cereals.

According to the state of the art in this field, new methods intended to improve OTA determination in cereals should focus on simplifying sample preparation making it faster, cheaper and environmentally friendly (i.e. by reducing considerably solvent consumption) while keeping method sensitivity below the legislative limits and enough selectivity. In this context, this paper explores the suitability of supramolecular solvents to simplify sample treatment in the

determination of OTA in wheat. Supramolecular solvents are water-immiscible liquids made up of supramolecular assemblies dispersed in a continuous phase. They are produced from amphiphile solutions by a sequential self-assembly process occurring on two scales, molecular and nano, and constitute a valuable strategy to replace organic solvents in analytical extraction processes. First, amphiphilic molecules spontaneously form three-dimensional aggregates above a critical aggregation concentration, mainly aqueous (size 3–6 nm) or reversed (size 4–8 nm) micelles and vesicles (size 30–500 nm), depending on the structure of amphiphiles and solvent properties. Then, the generated nanostructures self-assemble in larger aggregates, with a wide size distribution in the nano and micro scale regimes, by the action of an external stimulus (e.g. temperature, electrolyte, pH, solvent) and separate from the bulk solution as an immiscible liquid by a phenomenon named coacervation. To date, supramolecular solvents from a variety of surfactant aggregates, i.e. non-ionic²⁵, zwitterionic²⁶, cationic²⁷ and anionic²⁸ aqueous micelles, reversed micelles²⁹ and vesicles³⁰ have been successfully used for the extraction of pollutants from the environment^{31,32,33,34} and, more recently, from foodstuffs³⁵.

²⁵ R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández-Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.

²⁶ T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.

²⁷ X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.

²⁸ I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.

²⁹ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

³⁰ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.

³¹ F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143.

³² M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 147.

³³ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 109.

³⁴ A. Ballesteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51.

³⁵ A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51.

In this paper, a supramolecular made up of decanoic acid reverse micelles, previously described by our research group²⁹ and applied to the extraction of OTA in liquid matrices such as wine³⁶, was selected for the microextraction of OTA in raw wheat prior to LC/FL determination. Selection was based on the different types of interactions (i.e. hydrogen bonding and dispersion forces) it provides for OTA solubilisation and the high amphiphile concentration in the solvent (around 0.75 mg μL^{-1}), all of which should give high extraction efficiencies. The aim was to develop a simple, low-cost and rapid method for the routine control of this contaminant in wheat matrices. Parameters affecting sample representativity, extraction efficiency and detection and quantification limits were optimised and the method was successfully applied to the determination of OTA in different varieties of wheat including bread and durum wheat and two synthetic wheat hybrids.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Tetrahydrofuran (THF), HPLC-grade acetonitrile, methanol, ethanol and glacial acetic acid were supplied by Panreac (Sevilla, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Decanoic acid was purchased from Fluka (Madrid, Spain), while starch, gluten from

³⁶ S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 3.

wheat and ochratoxin A (OTA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The certified reference material BCR471 (an OTA free wheat) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and the reference material OW815 batch (OTA content in wheat: 4.9 ± 1.0 ppb) was supplied by R-Biopharm (Glasgow, Scotland). A stock standard solution of 10 mg L^{-1} of OTA was prepared in methanol and stored under dark conditions at -20°C . Working solutions were prepared by dilution of the stock solution with methanol and calibration solutions were made with a mixture of water/ethanol/acetic acid (49.5/49.5/1).

2.2. Apparatus

The liquid chromatographic system used (Spectra System SCM1000, ThermoQuest, San Jose, CA, USA) consisted of a P2000 binary pump and a FL3000 fluorescence detector. In all experiments a PEEK Rheodyne 7125NS injection valve with a $100 \mu\text{L}$ sample loop was used (ThermoQuest, San Jose, CA, USA). The stationary-phase column was a Kromasil C8 ($25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}, 5 \mu\text{m}$) from Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain). A Retsch MM301 mixer mill and a Mixtasel Selecta centrifuge were employed for sample preparation. Centrifuge tubes with narrow necks (Fig. 1) were designed by authors in order to make easier the measurement and collection of the supramolecular solvent after microextraction. Pobel S.A. (Madrid, Spain, web page: www.pobel.com) constructed them from commercial heavy-duty glass cylindrical centrifuge tubes with round-bottom (ref. 159050) by keeping their basic structure at the bottom (34 mm of outside diameter) but reducing the diameter from a specified height, which depended on the required tube capacity.

2.3. Determination of OTA in wheat

2.3.1. Sample preparation and preservation

The cereal samples analysed ($n = 6$) were kindly supplied by the Department of Agronomy and Genetic Improvement of the Spanish National Research Council (SNRC) of Córdoba (Spain) and consisted of two durum wheat (*Triticum durum* Desf), two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and two wheat hybrids, namely Triticale (*Triticosecale* spp., which is an hybrid from bread wheat and rye) and Tritordeum (*Hordeum-Triticum*, which is an hybrid from a South American wild barley and durum wheat³⁷). Samples were supplied as 100 g-single bags. Aliquots of 25 g were ground and blended in a Retsch MM301 mixer mill, in two steps (2 min each), at a vibrational frequency of 28 s^{-1} . This procedure gave particle sizes below $50 \mu\text{m}$. Aliquots of 300 mg were subsequently subjected to microextraction with the supramolecular solvent. Otherwise, the samples were vacuum-packaged in foil-laminate pouches, heatsealed and stored at -4°C until their analysis. Fig. 1 outlines the sequential steps followed for the determination of OTA in wheat including subsampling, microextraction and quantitation.

2.3.2. Supramolecular solvent-based microextraction

A wheat subsample (300 mg) was introduced in a specially designed 10 mL-glass centrifuge tube (Fig. 1) and then, decanoic acid (300 mg) dissolved in THF (0.8 mL) and 9.2 mL of water (pH 2.7 adjusted with hydrochloric acid) were added in

³⁷ A. Martín, J.B. Alvarez, L.M.Martín, F. Barro, J. Ballesteros, J. Cereal Sci. 30 (1999) 85.

sequence. The supramolecular solvent, made up of reverse micelles of decanoic acid dispersed in THF:water spontaneously formed and separated from the THF:water solution as an immiscible liquid. The mixture was stirred at 1500 rpm for 15 min to favour analyte partition and then centrifuged at 2400×g for 15 min to accelerate the complete separation of the two immiscible liquids. The supramolecular solvent, which was standing at the top of the solution into the narrow neck of the tube, was withdrawn with a 100µL-microsyringe and transferred to a 2-mL calibrated flask. Then, it was diluted to the mark with a mixture of ethanol/water/glacial acetic acid (54/45/1), filtered (0.45 µm filters) and 100 µL-aliquots were injected in the LC/FL system.

2.3.3. Liquid chromatography-fluorescence detection

Quantification of OTA was carried out by LC-FL. The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 1% acetic acid. The elution program was: isocratic conditions (55% of A and 45% of B) for 5min, linear gradient from 55% to 50% in A for 10 min, then linear gradient from 50% to 0% in A for 5 min and, finally, 5 min more from 0% to 55% in A to recover initial conditions. The flow-rate was 1 mL min⁻¹. OTA was monitored at λ_{ex} 334 nm and λ_{em} 460 nm. Quantification was performed by measuring peak areas. Calibration curves for OTA in ethanol/water/glacial acetic acid (54/45/1) were constructed in the range of 0.2–10 µg L⁻¹.

3. Results and discussion

3.1. Supramolecular solvent–wheat interactions: analytical consequences

A good knowledge of the interactions between extractant and matrix is essential to prevent interferences and set up efficient extraction schemes, so before optimisation of the extraction procedure we investigated the major interactions occurring between the supramolecular solvent and wheat. Considering that most of raw and processed foods contain similar constituents (e.g. carbohydrates, lipids, proteins, etc.), the conclusions derived of this study can be probably extended to other applications involving supramolecular solvent microextractions of contaminants in food.

The supramolecular solvent selected for OTA microextraction consists of decanoic acid reverse micelles dispersed in a THF:water continuous phase²⁹. It spontaneously forms in a ternary system made up of decanoic acid, THF and water, at the proportions shown in Fig. 2A, through a phenomenon named coacervation³⁸. Major components of the supramolecular solvent are decanoic acid and THF; water is a minor constituent.

The volume of solvent produced depends on the amount of decanoic acid ($y = a + bx$) and the percentage of THF ($y = b_0e^{b_1z}$)³⁴. In these equations, y is given in μL , x is the amount of decanoic acid in mg, and z the THF percentage (v/v).

³⁸ IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1972), 611.

Concerning wheat, carbohydrates (mainly as starch), proteins (mainly as gluten), lipids and water are the main constituents of this cereal, the relative percentages depending on wheat variety. These percentages range between around 71–75%, 10–14%, 2–2.5% and 10.5–11%, respectively, for the wheat varieties analysed^{39,40,41}.

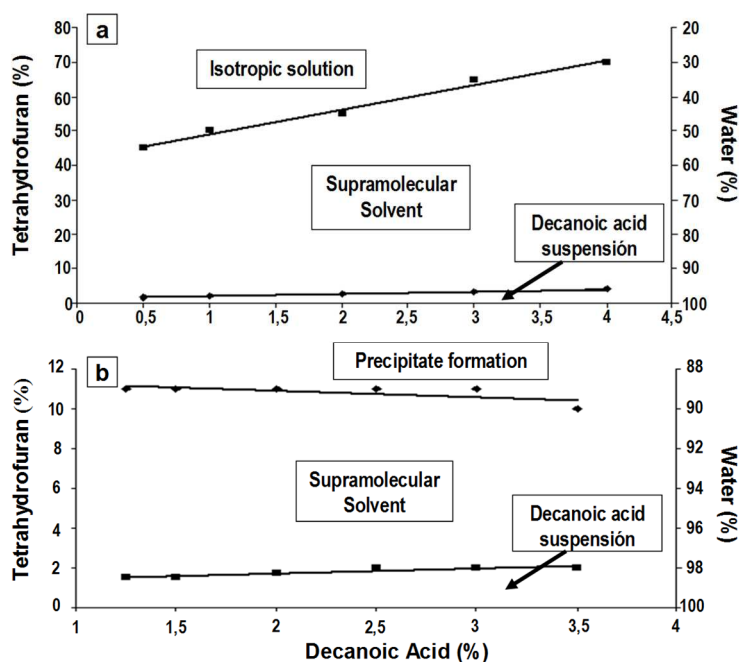


Fig. 2. Phase diagram of ternary mixtures made up of tetrahydrofuran, decanoic acid and water in the (A) absence and (B) presence of wheat (300 mg).

³⁹ United States Department of Agriculture (USDA) National Database for Standard Reference, Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.

⁴⁰ United States Department of Agriculture (USDA) National Database for the proanthocyanidin content of selected foods, Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/PA/PA.html1987>.

⁴¹ J.B. Alvarez, J. Ballesteros, J.A. Sillero, L.M. Martín, *Hereditas* 116 (1992) 193.

The influence of wheat matrix components on supramolecular solvent formation and volume was investigated. Fig. 2B shows the phase diagram obtained in the presence of 300mg of wheat, independently of the variety tested. By comparison with Fig. 2A, it is clearly observed that the upper boundary moved toward lower THF percentages (around 11%), owing to the apparition of a dense whitish precipitate that was standing at the interface between the supramolecular solvent and the bulk solution, as a very thin layer, after centrifugation. This layer became wider as the percentage of THF in the bulk solution increased, until the entire clear upper liquid phase corresponding to the supramolecular solvent was completely adsorbed by the precipitate at around 25% THF. This behaviour was pH-dependent; precipitation being favoured at the lowest pHs (e.g. the upper boundary in the phase diagram moved around 8% of THF at pH 2).

In order to explain the observed phenomenon, phase diagrams were constructed in the presence of starch and gluten, as representative of carbohydrates and proteins, respectively; at the maximal concentrations these constituents are usually found in wheat (i.e. 225 mg of starch and 42 mg of gluten per 300 mg of sample). The pH in these experiments ranged between 1.5 and 4. Starch did not influence phase diagrams but gluten flocculated in the presence of decanoic acid reverse micelles and phase diagrams were identical to those obtained in the presence of wheat (Fig. 2B). Flocculation of proteins by reverse micelles has been previously reported in the literature^{42,43,44}. From an analytical point of view, it is worth noting that the effect of wheat proteins on the supramolecular solvent phase diagram is not

⁴² C. Jolivald, N. Minier, N. Renon, *Fluid Phase Equilib.* 53 (1989) 483.

⁴³ A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530.

⁴⁴ M. Mejri, B. Rogé, A. BenSouissi, F. Michels, M. Mathlouthi, *Food Chem.* 92 (2005) 7.

significant for extraction purposes, since analytical applications are usually carried out near the lower phase boundary in order to use the minimal amount of THF for solvent production^{29,34}. With the aim of avoiding gluten flocculation, and having into account that the supramolecular solvent forms at pH below 4, extraction of OTA in wheat should be carried out at pHs between about 2.5 and 4.

Table 1 – Figures of merits of the linear relationship ($y = a + bx$) between the coacervate volumen (y , μL) and the amount of decanoic acid (x , mg) at different THF percentages.

THF (%)	$b \pm S^a$ ($\mu\text{L mg}^{-1}$)	$a \pm S^a$ (μL)	R^2 ^b
4	1.15 ± 0.03	-61 ± 6	0.998
6	1.30 ± 0.02	-66 ± 4	0.9992
8	1.39 ± 0.02	-65 ± 5	0.9990
9	1.42 ± 0.03	-46 ± 8	0.998
11	1.55 ± 0.06	-44 ± 13	0.995

^aStandard deviation.
^bCorrelation coefficient; n = 6.

To study the influence of wheat constituents on the volume of solvent produced, a set of solutions containing 300 mg of bread wheat, amounts of decanoic acid between 125 and 350 mg, THF percentages between 4% and 11% and water (96–89%) were prepared. The volumes of supramolecular solvent obtained were measured with a digital calliper and the relationships between these volumes and the amount of decanoic acid and THF were investigated. [Tables 1 and 2](#) show the results obtained.

Table 2 – Figures of merits of the exponential relationships ($y = b_0e^{b_1z}$) between the coacervate volume (y , μL) and the concentration of THF (z , %) at different amounts of decanoic acid.

Decanoic acid (mg)	$b_0 \pm S^a$ (μL)	$b_1 \pm S^a$	R^2 ^b
125	55 ± 4	0.092 ± 0.009	0.97
150	86 ± 5	0.069 ± 0.007	0.97
200	127 ± 5	0.062 ± 0.004	0.990
250	179 ± 6	0.059 ± 0.004	0.990
300	224 ± 9	0.057 ± 0.005	0.98
350	277 ± 6	0.056 ± 0.003	0.995

^aStandard deviation.
^bCorrelation coefficient; $n = 5$.

As expected, the volume of supramolecular solvent produced was linearly dependent on the amount of surfactant used (Table 1), but the slopes of these linear relationships were around 10% below those obtained in the absence of wheat³⁴, probably due to the adsorption of some decanoic acid on matrix components. Accordingly, the volume of solvent produced decreased in around 20–40 μL in the interval of decanoic acid tested. The y -intercepts were negative and different from zero, thus indicating that more initial amount of surfactant was needed in bulk solutions containing wheat to start producing the supramolecular solvent.

The relationship between the volume of supramolecular solvent and the THF percentage was exponential (Table 2). Similar to water, the parameter b_0 was linearly related to the amount of decanoic acid. However, the parameter b_1 , which describes how rapidly the volume of coacervate increases as the THF (%) does, did not keep constant (mean value for b_1 in water 0.046 ± 0.001 ³⁴) and it was exponentially related to the decanoic acid amount, thus corroborating the interaction of the surfactant with matrix components.

Because of supramolecular solvent volumes in the presence of wheat were reproducible and related to decanoic acid and THF through clear relationships, the reduction in around 10% compared to the volumes obtained in the absence of wheat is irrelevant for analytical extraction processes. So, although the reverse micelles in the supramolecular solvent are expected to flocculate proteins from food, the effects produced (i.e. reduction of the proportions THF:water at which the supramolecular solvent forms and decrease in solvent volume) should have no effect in extraction processes.

3.2. Sample representativity study

OTA is distributed irregularly in raw cereals due to the random nature of fungal contamination² and this makes sampling and subsampling a major issue. Because of subsamples of at least 25 g are recommended for analysis of cereals, reliable microextraction methods, based on the analysis of minute amounts of sample, require a thorough sample homogenization prior to subsampling in order to achieve representativity.

With the aim of obtaining homogeneous 25 g-samples and thus representative 300 mg-subsamples, the influence of reducing the particle size on the accuracy of OTA microextraction was investigated. For this purpose, the reference material CRM OW 815 (OTA concentration: $4.9 \pm 1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$, particle size < 1mm) was used as raw material. Experiments were carried out by extracting 300 mg-subsamples ($n = 11$) at three ranges of particle size (x), namely: (a) $x < 1 \text{ mm}$, as supplied by the distributor; (b) $50 < x < 250 \mu\text{m}$, obtained after grounding 25 g of the reference material with a ball crusher (Retsch MM301 mixer mill; vibrational frequency 21.6

s⁻¹ for 1min, twice); and (c) $x < 50 \mu\text{m}$, obtained by increasing the vibrational frequency to 28 s⁻¹ for 2 min, twice. Relative standard deviations (RSD) were calculated as a measurement of homogeneity.

The results obtained for the analysis of <1 mm-material (RSD = 96%) stood out the irregular distribution of the mycotoxin, most of the amount of OTA determined being concentrated in just 2 of the 11 aliquots analysed. The aspect of this material was heterogeneous in colour and texture and included clearly visible dark particles corresponding to the wheat bran. The homogeneity moderately increased for particle sizes in the interval $50 < x < 250 \mu\text{m}$ although the presence of outliers was still observed (RSD = 34%). A sharp decrease of the RSD value (3%) was found for the material with particle size $< 50 \mu\text{m}$, which also became uniform in colour. So, the later conditions were selected for OTA microextraction with the supramolecular solvent.

3.3. Optimisation of the supramolecular solvent-based microextraction of OTA

OTA is a hydrophobic compound (its octanol–water partition coefficient, $\log K_{ow}$ is 4.74) and, because of its pKa values (4.4 for the acid group and 7.1 for the alcohol one), it is neutral at pH values below 4, at which the solvent is produced. The sum of hydrogen donors and acceptors in OTA is 10. So, the expected driving forces for OTA microextraction in the supramolecular solvent are Van der Waals interactions between the hydrocarbon chains of the decanoic acid and the OTA aromatic framework, and hydrogen bonds between the acceptor and donor groups of the analyte and the polar head-groups of the surfactant.

Optimisation was carried out by extracting 300 mg of a blank certified reference material (BCR471 wheat) fortified with 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of OTA under a variety of experimental conditions (125–350 mg decanoic acid; 4–11% THF; stirring time 0–60 min; pH between 2 and 4). Experiments were made in triplicate. Selection of the optimal conditions was based on recoveries (R) in order to obtain the lower quantification limits for the method, since concentration factors were maintained constant by diluting the supramolecular solvent to 2 mL with a solvent mixture composition similar to that of the mobile phase; ethanol/water/acetic acid (54/45/1). Spiking of samples was made by adding 150 μL of OTA ($20\mu\text{g L}^{-1}$) in methanol and left to stand for 1.5 h to allow solvent evaporation at room temperature and favour analyte–matrix interactions. Equilibration between OTA and wheat matrices for a longer period of time (i.e. overnight) did not change the extraction efficiency.

Table 3 – Mean percent recoveries (n = 3) and standard deviations obtained for ochratoxin A in wheat (300 mg) as a function of the amount of decanoic acid and percentage of THF used for supramolecular solvent production.

Decanoic acid (mg)	Recoveries \pm standard deviations (%)				
	THF (%)				
	4%	6%	8%	9%	11%
125	49 \pm 2	61 \pm 1	63 \pm 3	57 \pm 4	57 \pm 3
150	59 \pm 2	67 \pm 2	70 \pm 4	60 \pm 2	63 \pm 2
200	66 \pm 4	72 \pm 2	75 \pm 6	69 \pm 5	70 \pm 2
250	73 \pm 3	77 \pm 6	80 \pm 2	74 \pm 5	75 \pm 4
300	77 \pm 6	86 \pm 3	94 \pm 2	87 \pm 2	79 \pm 6
350	79 \pm 1	80 \pm 2	81 \pm 2	76 \pm 6	Precipitate

Table 3 shows the recoveries obtained along with their respective standard deviations as a function of the main constituents of the supramolecular solvent (i.e. decanoic acid and THF). Maximal recoveries were always obtained for THF

percentages around 8%. The amount of OTA extracted increased as the decanoic acid did and was maximal for 300 mg (i.e. at sample/decanoic acid ratios of 1). Further studies were carried out with the aim of determining the interval of sample/decanoic acid ratios at which recoveries were above 90%. For this purpose, amounts between 100 and 2000 mg of BCR471 wheat and between 150 and 300mg of decanoic acid were combined to give wheat/decanoic acid ratios from 0.33 to 13. Fig. 3 shows the results obtained. Recoveries around 94% were obtained for wheat/decanoic acid ratios below 1.2. From this value, recoveries progressively decreased until they kept constant at around 25% for ratios above 2.5. Gluten precipitated from ratios around 13. According to these results, the procedure can be resized at will provided that the amount of decanoic acid is similar to that of wheat, although the representativity of wheat aliquots lower than 300 mg should be thoroughly investigated before their use for OTA determination. We selected 300 mg of both sample and decanoic for further studies.

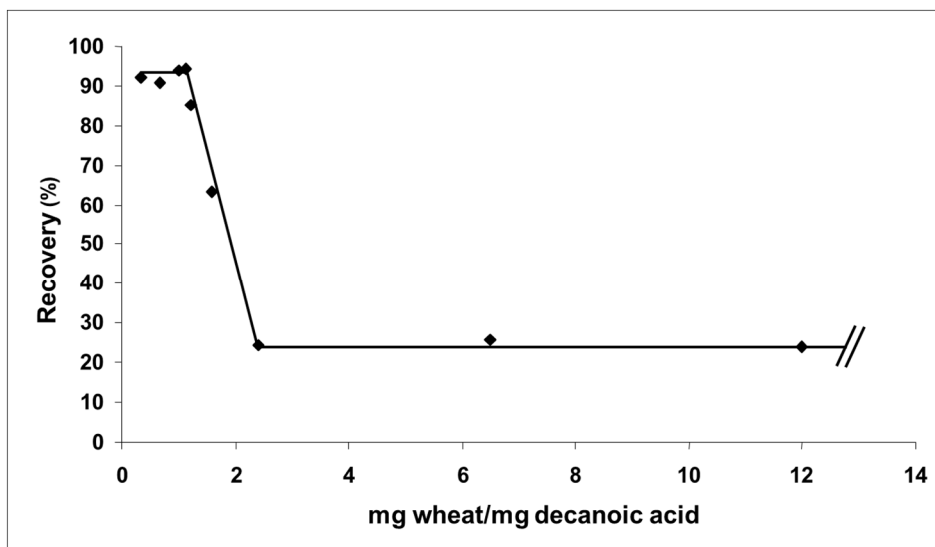


Fig. 3. Recoveries for OTA at different wheat (mg)/decanoic acid (mg) ratios.

The pH did not influence recoveries in the range 2.5–4, which is logical considering the neutral character of OTA in this interval and the type of interactions governing its solubilisation in the extractant. The extraction time (stirring rate 1500 rpm) to reach equilibrium conditions was around 15 min and this time was selected as optimal.

The high capability of the supramolecular solvent for the microextraction of OTA in wheat was consequence of both the types of analyte–extractant interactions established and the special structure of the aggregates making it up. Thus, recoveries for the extraction of OTA ($10 \mu\text{g Kg}^{-1}$) from wheat (BCR471 blank sample) with reverse micelles of decanoic acid in THF, at a decanoic acid concentration similar to that found in the supramolecular solvent (e.g. 1400 mM), was only around 40%. THF and water were also bad extractants for OTA with recoveries around 26% and 50%, respectively.

3.4. Analytical performance

Calibration curves for OTA were run using standard solutions prepared in ethanol/water/acetic acid (49.5/49.5/1). Because of the similar polarity of the injection solvent and the mobile phase, injection of 100 μL of sample extract did not cause broadening of the chromatographic peak for OTA. No differences in peak areas or retention times were observed for the analytes injected in the standard solutions and the supramolecular solvent ($\sim 350 \mu\text{L}$) diluted to 2 mL with a mixture of

ethanol/water/acetic acid (54/45/1). Correlation between peak areas and OTA concentration ($0.2\text{--}10\ \mu\text{g L}^{-1}$) was determined by linear regression and was 0.9991, indicating a good fit. The slope of the calibration curve was $500\pm 14\ \text{L}\ \mu\text{g}^{-1}$ ($n = 8$). The instrumental quantitation (LOQ) and detection (LOD) limits were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 10 and 3, respectively, and were 20 pg and 6.5 pg.

The method LOD and LOQ were estimated from the respective instrumental LOD and LOQ and considering the amount of wheat (300 mg), the recoveries under optimum conditions ($\sim 94\%$) and the final extract volume (2 mL), were 0.5 and $1.5\ \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Since detection and quantitation limits calculated in this way are often optimistic, the practical LOD and LOQ were calculated from six independent complete determinations of blank wheat samples fortified with OTA in the range of $0.5\text{--}3\ \mu\text{g Kg}^{-1}$ ⁴⁵. The practical LOQ and LOD were equal to those previously estimated, thus indicating the low matrix influence in the method proposed.

The possible interference of matrix components that could elute with OTA was assessed by the comparison of the slopes of the calibration curves ($n = 8$) obtained from standards in distilled water with those obtained from wheat (BCR471) fortified with known amounts of OTA ($1.5\text{--}40\ \mu\text{g Kg}^{-1}$) and run using the whole procedure. The difference between both slopes ($519\pm 12\ \text{L}\ \mu\text{g}^{-1}$ for water and $491\pm 12\ \text{L}\ \mu\text{g}^{-1}$ for wheat) was found to be not statistically significant by applying an appropriate Student's *t*-test⁴⁵. The calculated *t*-value (1.74) was below the critical *t*-

⁴⁵ M. Thomson, S.L.R. Ellison, R. Wood, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835.

value (2.21), being significance established at 0.05 levels. Therefore, matrix components were not expected to interfere in the determination of the target compounds.

The precision of the method was evaluated by extracting seven independent samples (BCR471) fortified with $8.0 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of OTA. Fortification was carried out as it has been described for optimisation studies (Section 3.3). The value, expressed as relative standard deviation (RSD), was about 2%.

3.5. Method validation

The method proposed was validated by analysing 300 mg-aliquots ($n = 11$) of a reference material (RM OW 815, RBiopharm) consisting in a wheat sample with an OTA content of $4.9 \pm 1.0 \mu\text{g Kg}^{-1}$. The reference material was previously grounded to give particles sizes below $50_{\mu\text{m}}$, as specified in Section 2.3.1. The average concentration found ($4.1 \pm 0.2 \mu\text{g Kg}^{-1}$) was included in the interval of concentration certified by the manufacturer, indicating the accuracy of this method for the determination of OTA in wheat.

3.6. Analysis of wheat samples

Six wheat samples, including four varieties, were analysed in order to prove the suitability of the proposed method for the routine control of OTA. None of them contained OTA at detectable levels. Table 4 shows the recoveries obtained after spiking the samples at three levels of concentration (3, 8 and $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

Fortification was carried out by following the same procedure than that specified in Section 3.3. Recoveries were expressed as the mean value of three independent determinations along with their corresponding standard deviations. Recoveries were between 84% and 95% with relative standard deviations ranging from 0.1% to 5%.

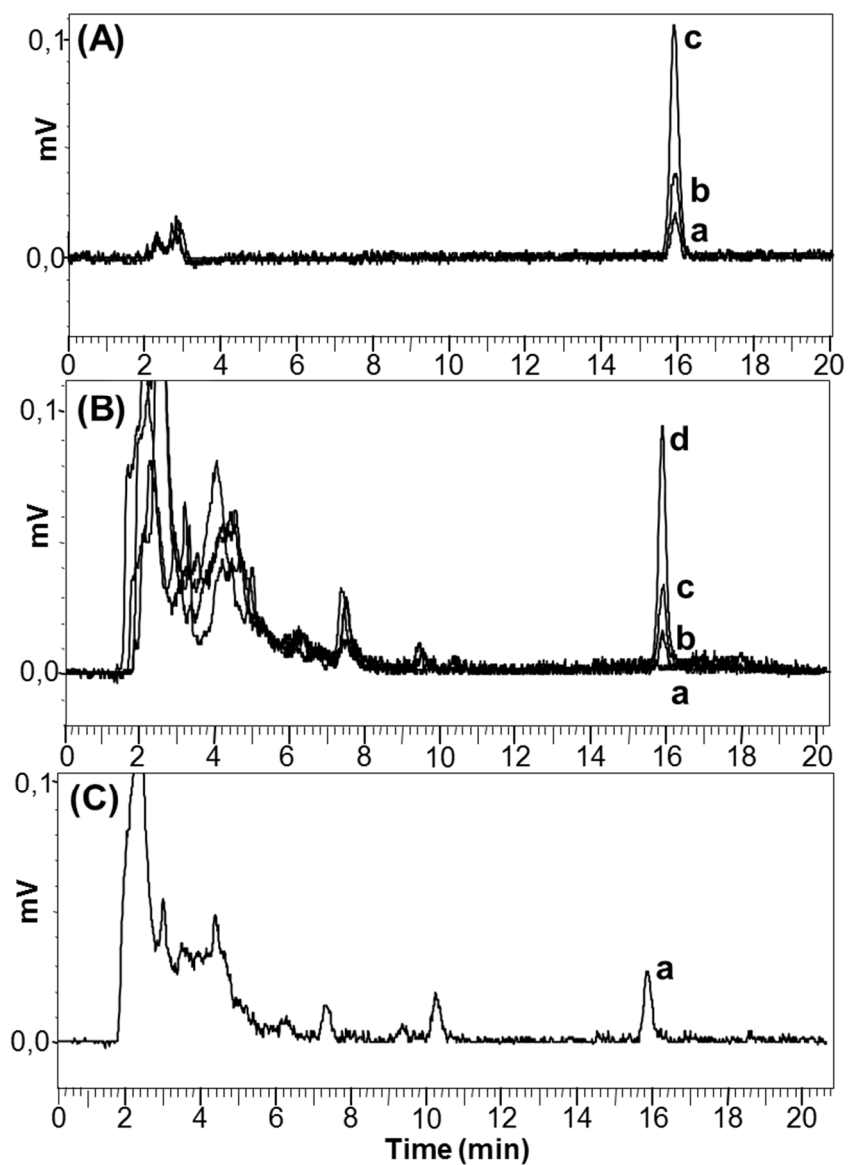
Table 4 – Mean recoveries and standard deviations obtained for OTA in the analysis of wheat samples using the proposed method.

Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery \pm standard deviation (%) ^a					
	Samples					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
3	90 \pm 4	95 \pm 3	86 \pm 4	89 \pm 2	87 \pm 5	87.7 \pm 0.3
8	88 \pm 3	90 \pm 1	92 \pm 2	92 \pm 2	84 \pm 3	95 \pm 3
20	91 \pm 2	90 \pm 1	89.1 \pm 0.3	94 \pm 4	90 \pm 1	90.1 \pm 0.1

Wheat varieties: M1 and M2, *Triticum durum*; M3, *Triticosecale*; M4 and M6, *Triticum aestivum*; M5, *Hordeum-Triticum*. Sample amount = 0.3 g.

^an=3.

The chromatograms obtained from three different concentrations of OTA in water/ethanol/acetic acid (49.5/49.5/1), a sample of *T. aestivum*, fortified at three levels of concentration (3, 8 and 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), and a sample of *T. durum*, fortified with 8 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of OTA are shown in Fig. 4A, B and C, respectively. No interference from matrix components was detected for any of the samples analysed.



*Fig. 4. LC/fluorescence chromatograms obtained from: (A) standard solutions of OTA in water/ethanol/acetic acid (49.5/49.5/1); (a) 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, (b) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and (c) 3 $\mu\text{g L}^{-1}$; (B) a 300 mg-aliquot of *Triticum aestivum* spiked with OTA; (a) blank sample, (b) 3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, (c) 8 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ and (d) 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$; and (C) a 300 mg-aliquot of *Triticum durum* spiked with (a) 8 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of OTA.*

4. Conclusions

Supramolecular solvents consist of amphiphilic nanostructures that provide multiple binding sites and regions of different polarity. These outstanding properties make them suitable to extract a variety of analytes with high efficiency and render them ideal for microextractions. In this research, supramolecular solvents made up of reverse micelles of decanoic acid in THF are proposed as valuable tools for the microextraction of OTA from wheat, offering a simple, inexpensive and rapid alternative to conventional sample preparation methods, which combine high solvent consumption with the need of clean-up and solvent evaporation steps. The extraction procedure takes about 30 min; several samples can be simultaneously extracted; requires a low sample amount (0.3 g wheat), which is made representative of the bulk by reducing the particle size to $<50\ \mu\text{m}$, and a low supramolecular solvent volume (350 μL); conventional equipment in labs is used for extraction and features low cost. The method developed can be used for the routine control of OTA in raw wheat below the tolerance level permitted by the European Directives ($5\ \mu\text{g Kg}^{-1}$)⁶. Because most of raw and processed foods contain similar constituents than wheat (e.g. carbohydrates, lipids, proteins, etc.), the microextraction procedure here proposed could be widely applicable to food residues with ability to establish hydrogen bonding and dispersion interactions with the supramolecular solvent.

Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project No CTQ-2008-01068). They specially thank to Department of Agronomy

and Genetic Improvement of Córdoba for kindly providing the wheat samples. The first two authors acknowledge the Spanish MEC for the postgrad fellowships award (BES-2006-12643 and AP2005-4275).

PARTE I
CAPÍTULO 3

RESTRICTED ACCESS SUPRAMOLECULAR SOLVENTS
FOR REMOVAL OF MATRIX-INDUCED IONIZATION
EFFECTS IN MASS SPECTROMETRY: APPLICATION
TO THE DETERMINATION OF FUSARIUM TOXINS IN
CEREALS

Restricted access supramolecular solvents for removal of matrix-induced ionization effects in mass spectrometry: Application to the determination of *Fusarium* toxins in cereals

Talanta 148 (2016) 370-379

Sergio García-Fonseca and Soledad Rubio

Abstract

Ion suppression/enhancement caused by matrix effects continues being a major concern in liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). This research explores the ability of a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of inverted hexagonal aggregates of oleic acid to behave as a liquid with restricted access properties (SUPRAS-RAM). *Fusarium* toxins in cereals were extracted with the oleic acid-based SUPRAS-RAM prior to their quantification by LC-electrospray ionization (ESI)-ion trap-MS (LC-ESI-IT-MS) in order to investigate the capability of this solvent to remove or reduce ionization suppression and/or enhancement in the analysis of complex samples by MS. The method involved the vortex-shaking of 300 mg of cereal with 600 µL of the SUPRAS-RAM for 15 min, centrifugation for separation of the supernatant and quantitation by LC-ESI-IT-MS. Macromolecules such as proteins and carbohydrates were excluded from extraction by chemical and physical mechanisms. Extraction of analytes and sample clean-up were thus carried out in a single step. No evaporation of the extracts was needed. Method detection limits for the legislated *Fusarium* toxins [i.e. deoxynivalenol (DON), zearalenone

(ZEA) and fumonisins B1 (FB1) and B2 (FB2)] were $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ for DON and ZEA and $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ for fumonisins. These values were far below the maximum levels set by the European Commission for these toxins in foodstuffs. The method was successfully applied to the determination of these toxins in wheat and maize harvested in the South of Spain. No contamination of *Fusarium* toxins was found in samples at detectable levels. Recoveries in spiked samples were in the range 87–105%, with relative standard deviations between 1 and 7%. The use of the oleic acid-based SUPRAS-RAM effectively removed matrix interferences and allowed reliable quantitation of *Fusarium* toxins in cereals using solvent-based calibration.

1. Introduction

Matrix effects giving rise to suppression or enhancement of the signal heavily influence both qualitative and quantitative analysis in liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS)^{1,2,3}. The presence of interfering compounds in the ionisation source causes changes in the efficiency of analyte droplet formation or evaporation and/or the amount of analyte ions formed in the gas phase, through mechanisms not yet fully understood^{4,5}.

¹ P.J. Taylor. Clin. Biochem. 38 (2005) 328-334.

² F. Gossetti, El Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro. J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 3929-3937.

³ H. Trufelli, P. Palma, G. Famigliani, A. Capiello. Mass Spectrom. Rev. 30 (2011) 491–509.

⁴ R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11 (2000) 942-950.

⁵ H. Metwally, R.G. McAllister, L. Konermann. Anal. Chem. 87 (2015) 2434-2442.

Different single or combined strategies are currently in use to overcome matrix effects in LC-MS^{6,7,8}. They include modifications of mass spectrometry and/or chromatography conditions and improvement of sample preparation and purification. If suppression/enhancement phenomena cannot be eliminated or made negligible by application of these strategies, appropriate calibration techniques (mainly, addition of isotopically labelled internal standards, matrix-matched calibration and the standard addition method) have to be used.

Among sample preparation methods for LC-MS, protein precipitation, sample dilution, solid phase extraction (SPE) and/or solvent extraction are the most frequently used, the choice depending on each specific application^{2,9,10,11}. Protein precipitation, often used for treatment of biological fluids, does not result in a very clean extract⁶. Sample dilution significantly reduces ionization suppression, although the analyte concentration may fall below the limit of quantification before complete removal of matrix effects¹¹. Liquid-liquid extraction is frequently more effective than SPE in removing ionization suppression^{9,10}, mainly because sample preconcentration in SPE can magnify matrix effects¹². The use of sorbents offering different mechanisms of interaction with the sample (e.g. restricted access materials,

⁶ A.V. Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte. *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2198–2207.

⁷ A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito. *Anal. Chim. Acta*, 870 (2015) 29–44.

⁸ A. Kruve, I. Leito. *Anal. Methods* 5 (2013) 3035–3044.

⁹ R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175–1185.

¹⁰ S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey. *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 61–66.

¹¹ H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder. *Anal. Chem.* 84 (2012) 1474–1484.

¹² R. Dams, M.A. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 1290–1294.

RAM) provides additional selectivity to SPE, which often results in simplified sample treatments^{13,14}. As solid samples are analysed by LC-MS, multiple extraction steps are commonly required to increase analyte recovery and obtain cleaner extracts⁶.

This research was intended to explore the suitability of supramolecular solvents with restricted access properties (SUPRAS-RAM) to remove or reduce ionization suppression and/or enhancement in the analysis of complex samples by LC-MS. For this purpose, the potential of a SUPRAS made up of oleic acid to remove matrix interferences in LC-MS, was investigated. To date, only SUPRASs made up of inverted hexagonal aggregates of alkanols in tetrahydrofuran (THF) and water have been known to show restricted access properties¹⁵. Macromolecules were excluded from SUPRAS-RAM extracts by both chemical and physical mechanisms. Similarly to alkanols, alkyl carboxylic acids self-assemble and coacervate in mixtures of THF and water¹⁶ and therefore they should present restricted access properties.

The potential of oleic acid-based SUPRAS-RAM to remove matrix interferences was explored by extracting Fusarium toxins in cereals prior to their quantification by LC-MS/MS. Liquid chromatography tandem mass spectrometry is the first choice for the determination of Fusarium toxins, which are analysed singly

¹³ J. Beinhauer, L. Bian, H. Fan, M. Sebel, M. Kukula, J.A. Barrera, K.A. Schug. *Anal. Chim. Acta* 858 (2015) 74-81.

¹⁴ E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 40-48.

¹⁵ A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio. *Anal. Chem.* 84 (2012) 342-349.

¹⁶ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473-7484.

or together with other mycotoxins^{17,18,19}. Major concerns with current methods arise from the low recoveries achieved, the need for purification and evaporation of extracts and eluates, and the occurrence of matrix effects, mainly ionization suppression^{17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28}.

Fusarium toxins are ubiquitously present in both unprocessed cereals and processed cerealbased food^{29,30,31,32,33,34,35}. Four *Fusarium* toxins [i.e. deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), and fumonisins B1 (FB1) and B2 (FB2)] are covered by

-
- ¹⁷ R. Krska, E. Welzing, H. Boudra. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137 (2007) 241-264.
- ¹⁸ V.M.T. Lattanzio, M. Pascale, A. Visconti. *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 758-768.
- ¹⁹ J.P. Meneely, F. Ricci, H.P. van Egmond, C.T. Elliot. *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 192.
- ²⁰ M. Zachariasova, O. Lacina, A. Malachova, M. Kostelanska, J. Poustka, M. Godula, J. Hajslova. *Anal. Chim. Acta*, 662 (2010) 51-61.
- ²¹ E. Ates, K. Mittendorf, J. Stroka, H. Senyuva. *Food Addit. Contam. A* 30 (2013) 156-165.
- ²² M. Sulyok, F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2649-2659.
- ²³ E. Varga, T. Glauner, F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher, M. Sulyok. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5087-5104.
- ²⁴ N. Arroyo-Manzanares, J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña. *Talanta*, 115 (2013) 61-67.
- ²⁵ A.B. Serrano, G. Font, J. Mañes, E. Ferrer. *Food Control* 32 (2013) 105-114.
- ²⁶ U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon. *Food Chem.* 153 (2014) 44-51.
- ²⁷ N. Arroyo-Manzanares, J. F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia. *Food Control* 36 (2014) 94-101.
- ²⁸ R. Maul, R. Pielhau, M. Koch. *Food Control* 40 (2014) 151-156.
- ²⁹ E. Streit, E.S. Schatzmayr, P. Tassi, E. Tzika, D. Marin, I. Taranu, C. Tabuc, A. Nicolau, I. Aprodu, O. Puel, I.P. Oswald. *Toxins* 4 (2012) 788-809.
- ³⁰ B. Škrbić, A. Malachova, J. Tivančev, Z. Veprikova, J. Hajšlová. *Food Control* 22 (2011) 1261-167.
- ³¹ C. Juan, A. Ritieni, J. Mañes. *Food Chem.* 141 (2013) 1747-1755.
- ³² Y. Rodríguez-Carrasco, M. Fattore, S. Albrizio, H. Berrada, J. Mañes. *Food Chem.* 178 (2015) 149-155.
- ³³ J. Pleadin, N. Vahčić, N. Perši, D. Švelj, K. Markov, J. Frece. *Food Control* 32 (2013) 49-54.
- ³⁴ J. Blesa, J.C. Molto, S. El Akhdari, J. Manes, A. Zimedine. *Food Control*, 46 (2014) 1-5.
- ³⁵ E. Beltrán, M. Ibáñez, T. Portolés, C. Ripollés, J.V. Sancho, V. Yusà, S. Marín, F. Hernández. *Anal. Chim. Acta* 783 (2013) 39-48.

the EU legislation³⁶. Because of their wide range of polarities (Table 1), solvent mixtures containing a large fraction of methanol or acetonitrile, which are appropriate for the extraction of most mycotoxins in cereals, are not suitable for extraction of FB1 and FB2 (the recoveries are around 45%²²). Recoveries for DON, FB1 and FB2 are also low (e.g. 18-40%) in matrices such as almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios²³. Increasing water proportion (e.g. up to 50%) increases the recoveries for FB1 and FB2 but recoveries for DON decrease at around 50%²². Many of the methods developed^{37, 38, 39, 40, 41} are only suitable for screening purposes since the detection limits are not low enough to control the maximum limits established in the EU legislation³⁶ or recoveries do not comply with the EU requirements set for official methods for mycotoxins⁴². Extraction recoveries for fumonisins in cereals increase using a QuEChERS-like procedure^{20,24,26} or ultra Turrax-enhanced extraction²⁵.

Purification of extracts remains a key step for reliable quantitative analysis of Fusarium toxins by LC-MS/MS. The presence of co-extracted matrix compounds affects analyte ionization and the use of solid phase extraction (SPE) with Mycosep®

³⁶ Commission regulation (EC) No. 1126/2007 amending regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products.

³⁷ H.G.J. Mol, P. Plaza-Bolanos, P. Zomer, T.C. de Rijk, A.A.M. Stolker, P.P.J. Mulder. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9450-9459.

³⁸ M.C. Spanjer, P.M. Rensen, J.M. Scholten. *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 472-489.

³⁹ D. Herebian, S. Zühlke, M. Lamshöft, M.J. Spiteller. *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 939-948.

⁴⁰ M.K. Kokkonen, M.N. Jestoy. *Food Anal. Methods* 2 (2009) 128-140.

⁴¹ J.D.D. Mavungu, S. Monbaliu, M. Scippo, G. Maghuin-Rogister, Y. Scheneider, Y. Larondelle, A. Callebaut, J. Robbens, C. Van Peteghem, S. De Saeger. *Food Addit. Contam.* 26 (2009) 885-895.

⁴² Commission Regulation (EC) No. 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs.

columns^{43,44} and other materials^{45,46} is preferred for sample purification. Clean-up of QuEChERS extracts is commonly carried out by dispersive SPE with MgSO₄, PSA, C18 and alumina-neutral^{20,26,27} although dispersive liquid-liquid microextraction has given better results in some applications²⁴. Considering the wide range of polarities of the analytes, dilute-and-shoot approaches have been also proposed^{22,23,38} and although significant signal suppression has been obtained for some toxins (e.g. between 66 and 92% for DON in dried fruits²³) and the sensitivity is reduced, these approaches seem the most viable alternative as multi-mycotoxin determination is involved since they might still be acceptable in proficiency testing⁴⁷. On the whole, the estimated timing for the preparation of one sample ranges between 15 min⁴⁸ and 190 min³⁷, and it is usually above 1 h^{38,39}. Any of these methods give sample extracts clean enough to quantify *Fusarium* toxins using solvent-based calibration and, because of the lack or high cost of isotopically labelled internal standards, the use of matrix-matched calibration or the standard addition method are commonly used to compensate for matrix interferences. The cost associated to the use of isotopically labeled internal standards to remove matrix effects can be reduced if they are added to an aliquot of the final extract, but good extraction recoveries have to be achieved to apply this approach⁴⁹.

⁴³ F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Buttinger, R. Krska. *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 209-216.

⁴⁴ D. Royer, H.U. Humpf, P.A. Guy. *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 678-692.

⁴⁵ V.M.T. Lattanzio, M. Solfrizzo, A. Visconti. *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 320-330.

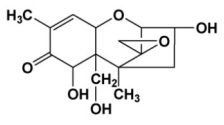
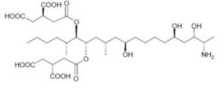
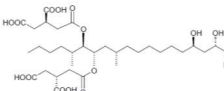
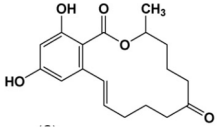
⁴⁶ G. Stecher, K. Jarukamjorn, P. Zaborski, R. Bakry, C.W. Huck, G.K. Bonn. *Talanta* 73 (2007) 251-257.

⁴⁷ A. Malachová, M. Sulyok, E. Beltrán, F. Berthiller, R. Krska. *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 145-156.

⁴⁸ A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, R. Romero-Gonzalez, M. Aguilera-Ruiz. *Food Chem.* 117 (2009) 705-712.

⁴⁹ E. Varga, T. Glauner, R. Köpen, K. Mayer, M. Sulyok, R. Schuhmacher, R. Krska, F. Berthiller. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2675-2686.

Table 1. Chemical structures, molecular weight (MW), ionization constants (pKa), octanol-water coefficients (log Kow) and numbers of donor and acceptor groups for the legislated Fumonisin.

Mycotoxin	Chemical structure	^a MW	^b pK _a	^a Log K _{ow}	^a Hydrogen donor and acceptor sum
Deoxynivalenol (DON)		296.31	11.91	-0.7	9
Fumonisin (FB ₁)	B ₁ 	721.82	3.49	-0.5	24
Fumonisin (FB ₂)	B ₂ 	705.83	3.49	1.2	22
Zearalenone (ZEA)		318.36	7.41	3.6	7

^aObtained from the PubChem Compound, National Institutes of Health (USA). Available from <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

^bData obtained from Scifinder

Below, the most salient results obtained in the optimization of the extraction and cleanup of Fusarium toxins from cereals using an oleic acid-based SUPRAS, as well as the results found in method validation and application of the proposed method to the analysis of wheat and corn, are presented and discussed.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Tetrahydrofuran (THF), HPLC-grade acetonitrile, methanol and glacial acetic acid were supplied by Panreac (Sevilla, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Oleic acid (OA) was purchased from Aldrich (St. Louis, USA) while deoxynivalenol (DON, powder) and zearalenone (ZEA, powder) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ammonium acetate and fumonisins (individual stock solutions of 50 mg/L of both FB1 and FB2 in acetonitrile:water) were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). Stock solutions of DON (20mg/L) and ZEA (200 mg/L) were prepared in acetonitrile. Two working standard solutions were prepared weekly by dilution of the stock solutions. The first one contained DON and ZEA (15 mg/L each) in acetonitrile and the second one FB1 and FB2 (15 mg/L each) in acetonitrile:water (1:1, v/v). All solutions were stored under dark conditions at -20 °C and were brought to room temperature before use.

2.2. Apparatus

The LC–MS system used was an Agilent MSD Trap XCT Ultra mass spectrometer coupled to a 1200 liquid chromatograph with an electrospray interface operating both in positive and negative ion mode (LC-ESI-IT-MS, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The stationary phase used was a Synergi™ Fusion-RP 80A column (50x2mm, 4 µm) from Phenomenex (Torrance, California). A Retsch MM301 mixer mill (Haan, Germany), a vortex shaker REAX Top equipped with an attachment for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350 R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 ml from MPW Med-Instruments (Warschaw, Poland) were used for sample treatment.

2.3. Synthesis of the oleic acid-based SUPRAS-RAM

The SUPRAS was synthesized by adding 9.5 mL of 10 mM aqueous hydrochloric acid to a solution of oleic acid (1 g) in THF (19.5 mL). The mixture, in a 50 mL-glass centrifuge tube, was magnetically stirred for 2 min, time in which the SUPRAS spontaneously formed into the bulk solution by water-induced self-assembly of oleic acid. Then, the suspension was centrifuged at 3500 rpm for 10 min to speed up SUPRAS separation, which was less dense than the bulk solution. Next, it was withdrawn using a 10 mL-syringe, transferred to a hermetically close storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4°C. Under these conditions, the solvent produced was stable for at least one month. The volume of SUPRAS obtained was

around 14 mL. Before using it as extractant or solvent calibration, the SUPRAS was made 1% (v/v) in acetic acid by adding the required volume of glacial acetic acid.

2.4. Determination of Fusarium toxins in cereals

2.4.1. Sample preparation and preservation

The cereal samples analysed were kindly supplied by the Department of Agronomy and Genetic Improvement of the Spanish National Research Council in Córdoba (Spain) and consisted of two durum wheat (*Triticum durum* Desf), two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and a yellow maize (*Zea mays* L.). Aliquots of 25 g samples were ground and blended in a Retsch MM301 mixer mill, in two steps (2 min each), at a vibrational frequency of 28 s^{-1} . This procedure gives particle sizes below $50\text{ }\mu\text{m}$. Milled samples were vacuum-packaged in foil-laminate pouches, heat-sealed and stored at -4°C until their analysis.

2.4.2. SUPRAS-based microextraction

Extraction of Fusarium toxins from cereals was performed by adding 0.6 mL of acidified SUPRAS to a sample aliquot (300 mg) into a 2 mL polypropylene centrifuge microtube. Five glass balls (3 mm diameter) were added to the microtube to accelerate and enhance sample extraction. The samples were vortex-shaken for 15 min and then centrifuged (8500 g, 10°C , 15 min) to clarify the supernatant. Aliquots of this supernatant (200 μL) were diluted with 200 μL of SUPRAS and then transferred to autosampler glass vials with inserts and subjected to LC/MS analysis. Fig. 1 shows a schematic of the sample treatment and microextraction procedure.

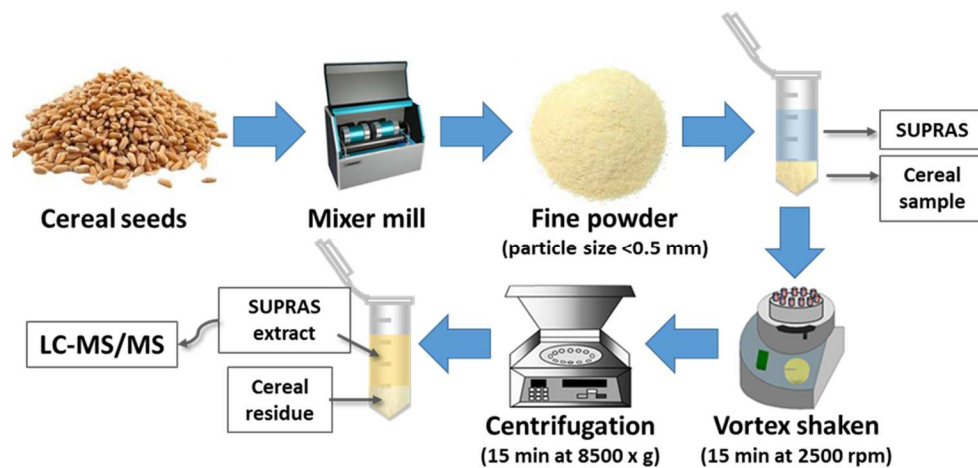


Fig 1. Schematic of the sample treatment proposed for the extraction of Fusarium toxins from cereals.

2.4.3. Quantitation by LC/ESI-IT-MS

Separation and quantification of Fusarium toxins were carried out by LC/ESI-IT-MS. The mobile phase consisted of solvent A [water/glacial acetic acid, 99/1 (v/v)] and solvent B [methanol/water/glacial acetic acid, 97/2/1 (v/v/v)], both containing 5mM ammonium acetate.

Table 2. Precursor, product ions and ion trap-MS parameters used in the analysis of the Fusarium toxins in cereals

	Fusarium toxin			
	DON	FB ₁	FB ₂	ZEA
Precursor ions (m/z)	355.1	722.8	706.6	317.1
	[M+CH ₃ COO] ⁻	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Quantifier ions (m/z)	265.0	704.5	688.5	273.1
Qualifier ions (m/z)	295.0	334.4	336.3	299.0
Octopole voltage (V)	-8	9	10	-9,79
Skimmer cone voltage (V)	-29,5	68,5	40	-26
Capillary exit voltage (V)	-100,3	200	150	-183,3
Trap Drive	42	60,3	51	61,7
Fragmentation Amplitude (V)	1,5	0,86	0,67	0,75
ICC (ion-charge control)	70000	500000	500000	70000
Maximal accumulation time (ms)	60	50	50	60

The elution program was: isocratic conditions (50% of B) for 1.5 min, then linear gradient until reaching 100% of B at 5.75 min, next isocratic conditions until 10 min, and then reverting to initial conditions at 10.1 min allowing 3.9 min for stabilization. The injection volume was 10 μ L and the flow rate 0.25 mL min⁻¹. Mass spectrometric analysis of Fusarium toxins was carried out in both negative (DON and ZEA) and positive (FB₁ and FB₂) ESI modes with the following settings: capillary voltage \pm 3500 V, source temperature 350°C, drying gas 9 L min⁻¹ and nebulizer gas 30 psi. The precursor ions of analytes (see Table 2) were isolated and fragmented into the ion trap. Excitation of the ions was accomplished through collision with helium. The isolation width was set at 4 m/z units. The chromatogram was segmented into different retention time periods to isolate the precursor ions (DON, 1.08–1.82 min; FB₁, 5.19–5.79 min; FB₂, 5.79–6.17 min; ZEA, 6.17–6.44 min). Out the specified segments, the eluent flow was diverted to waste. The values

for the different MS operating parameters as well as the quantifier (Q) and qualifier (q) ions selected for each of the Fusarium toxins are shown in Table 2. Identification was performed according the tolerance ranges established for Q/q ratios and retention times as compared with standards⁵⁰. For solvent-based calibration, a multi-analyte stock solution was freshly prepared by mixing the two working solutions (150 μL of each) and 300 μL of the SUPRAS (see section 2.3). This solution was further diluted with SUPRAS to obtain appropriate concentrations. Correlation between peak areas and concentration of Fusarium toxins (12.5–3750 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DON and ZEA and 6.2–3750 $\mu\text{g L}^{-1}$ for FB1 and FB2) were determined by linear regression (1/x weighted) and were in the range 0.996–0.9992.

3. Results and discussion

3.1. Solubilization and restricted access properties of oleic acid-based SUPRASs

Molecules of oleic acid spontaneously self-assemble and coacervate as inverted hexagonal aggregates in mixtures of THF and acid aqueous solutions, with the polar groups surrounding aqueous cavities and the hydrocarbon chains dissolved in THF. Fig. 2 shows the structure of these aggregates as well as the phase diagram for the ternary mixture of oleic acid, THF and aqueous hydrochloric acid (0.01M). The pH of the water used in the synthesis was kept below 4 to prevent oleic acid from deprotonation ($\text{pK}_a = 4.8 \pm 0.2$), and consequently, from solubilization in the hydro-

⁵⁰ Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Union, Vol. L221, 8-36.

organic phase in equilibrium with the SUPRAS. The solid line in the phase diagram depicts the boundary for the regions where two isotropic liquids and a single isotropic solution are formed. As it is shown, the formation of the SUPRASs requires percentages of THF in the synthetic solutions below 60-70%, depending of the amount of oleic acid used in the synthesis.

Both, the two microenvironments and mixed-mode mechanisms offered by the hexagonal aggregates make them suitable to solubilize analytes in a wide polarity range. The expected driving forces for microextraction of Fusarium toxins (Table 1) are Van der Waals interactions between the hydrocarbon chains of the oleic acid and the hydrocarbon framework of toxins, and hydrogen bonds between the acceptor and donor groups of analytes and the polar head-groups of the surfactant and/or water in the aqueous cavity.

The volume of SUPRAS produced in the self-assembly process was linearly dependent on the amount of oleic acid and exponentially dependent on the percentage of THF in the bulk solution according to the Eq. 1:

$$y = (1.03 \pm 0.02) a e^{(0.0473 \pm 0.0009) b} \quad (1)$$

where y is the volume (mL) of SUPRAS, a the amount (g) of oleic acid and b the THF percentage (v/v). This equation indicated that both the global composition of the SUPRAS and the size of the aqueous cavities can be tailored by controlling the THF:water ratio in the solution where the molecules of oleic acid self-assemble. Thus, the SUPRASs obtained from a constant concentration of oleic acid and increasing THF/water ratios gradually contained more THF and water and

consequently became increasingly diluted with respect to the surfactant. The higher content of water in the SUPRAS with increasing THF/water ratios also caused the aqueous core of the inverted hexagonal aggregates to increase and it opens the possibility of using these liquids as restricted access materials (Fig. 2).

Regarding cereals, they consist of 12-14 percent water, 65-75 percent carbohydrates, 2-6 percent lipids and 7-12 percent proteins. The principal carbohydrate of all cereals is starch while the major fatty acids are linoleic, oleic and palmitic. There are four protein fractions in cereals (i.e. albumins, globulins, prolamines, and glutelins) and their distribution varies among different cereal grains⁵¹.

⁵¹ N.H. Haard, S.A. Odunfa, C-H. Lee, R. Quintero-Ramirez, A. Lorecen-Quiñones, C. Wachter-Radarte. FAO Agricultural Services Bulletin No. 138, 1999, Chapter 1. Available on <http://www.fao.org/docrep/x2184e/x2184e04.htm>.

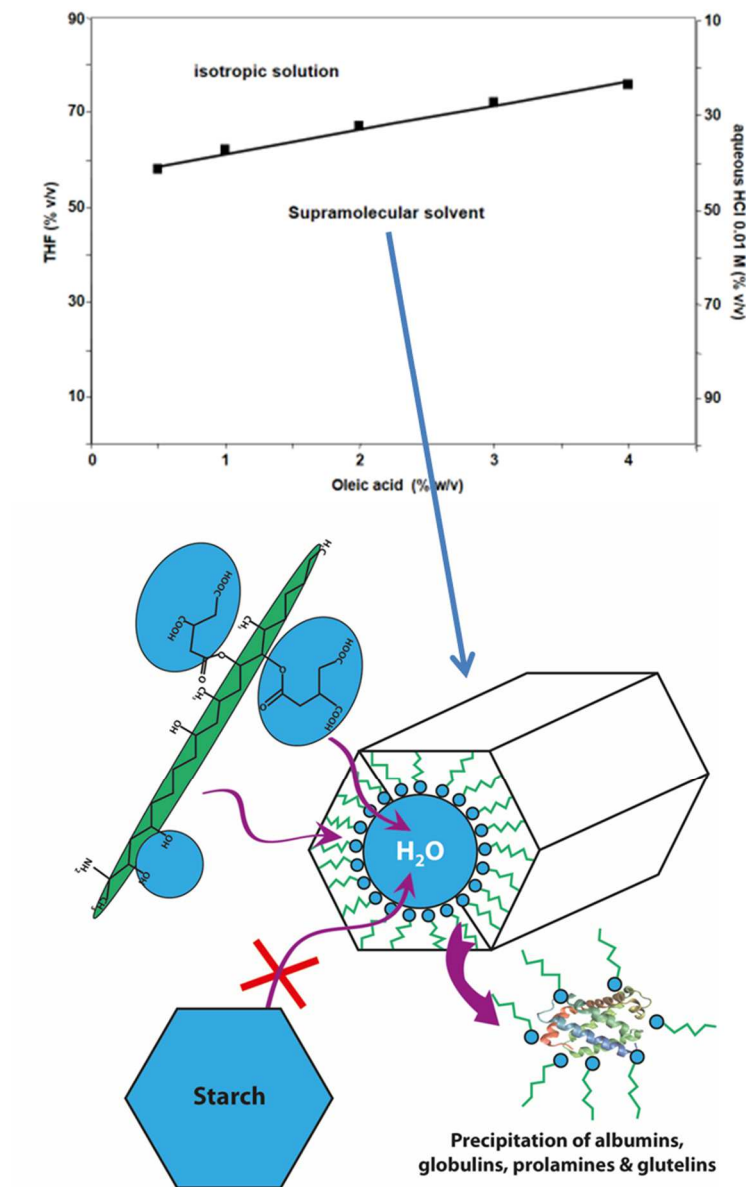


Fig. 2. Phase diagram for ternary mixtures of decanoic acid, THF and aqueous hydrochloric acid (0.01M) showing a schematic of the structure, types of interactions and restricted access properties of the supramolecular solvent.

The ability of oleic acid-based SUPRASs to exclude proteins and carbohydrates by both chemical and physical means, and consequently to achieve sample cleanup, was examined. Experiments were conducted by extracting 20 mg of pure standards of typical proteins and carbohydrates in 0.6 mL of SUPRAS obtained according to the procedure specified in Section 2.3.

Under SUPRAS extraction, aqueous solutions of albumin from bovine serum, albumin from chicken egg white and gluten from wheat gave a white precipitate that separated from the solvent as a thin layer upon centrifugation. Both THF and oleic acid were considered responsible for protein precipitation owing to the decrease of the dielectric constant of the solution⁵² and the formation of macromolecular complexes⁵³, respectively. An identical white layer was clearly observed between the insoluble matrix components and the SUPRAS after extraction and centrifugation of cereal samples. So, removal of proteins from cereals was carried out during extraction of *Fusarium* toxins.

The behavior of polysaccharides during extraction was evaluated by using starch. It was checked that this polymer did not incorporate to the SUPRAS. Extractions were also carried out under experimental conditions known to increase the solubility of starch (e.g. 40°C) but no extraction in the SUPRAS was observed. Therefore, the SUPRAS has the ability to act as a RAM for polysaccharides, probably because of size exclusion of these hydrophilic polymers from the aqueous cavity.

⁵² K.S. Schwenzler, S.E. Patent US4171204A

⁵³ V. Morais, H. Massaldi. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 59 (2012) 50-54.

3.2. Optimization of the microextraction of Fusarium toxins

Optimization was performed by extracting blank wheat samples (0.3 g) fortified with Fusarium toxins in acetonitrile. Extractions were carried out with oleic acid-based SUPRASs obtained from different water/THF ratios and using a variety of experimental conditions (e.g. various extraction and centrifugation times). The concentration of Fusarium toxins selected for fortification ($200 \mu\text{g Kg}^{-1}$) was within the range of maximum levels set by the European Commission for these toxins in foodstuffs (20-400, 200-1750 and 200-4000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for ZEA, DON and FB1+FB2, respectively)³⁶. Wheat samples were fortified 4 h before extraction. It was checked that equilibration between the Fusarium toxins and wheat matrix for a longer period of time (i.e. overnight) did not change the extraction efficiency. Experiments were made in triplicate. Selection of the optimal conditions was based on recoveries (R).

The influence of SUPRAS composition and structure on recovery of Fusarium toxins was investigated by synthesizing SUPRASs from a constant amount of oleic acid (1 g) and variable water/THF ratios from 60/40 to 30/70 (v/v). The volume of THF+water in the synthetic solution was 29 mL. Aliquots of 1200 μL of each type of SUPRAS were used for extraction. Table 3 shows the recoveries obtained along with their respective standard deviations.

Table 3. Mean recoveries and standard deviations for Fusarium toxins as a function of the water/THF ratio used for self-assembly and volume of SUPRAS

Variable	^a Recovery \pm ^b S (%)			
	DON	FB ₁	FB ₂	ZEA
^c Water/THF ratio (v/v)				
60/40	71 \pm 2	15.2 \pm 0.3	29 \pm 1	72 \pm 6
50/50	78 \pm 3	16 \pm 1	31 \pm 1	83 \pm 2
40/60	92 \pm 6	26 \pm 6	43 \pm 2	95 \pm 6
35/65	95 \pm 6	30 \pm 1	53 \pm 1	105 \pm 5
30/70	97 \pm 4	43 \pm 1	66 \pm 3	101 \pm 4
^d Volume of SUPRAS (μ L)				
450	88 \pm 3	82 \pm 5	84 \pm 3	90 \pm 2
600	98 \pm 2	91 \pm 3	101 \pm 1	102 \pm 3
900	101 \pm 6	93 \pm 4	104 \pm 4	100 \pm 5
1200	98 \pm 1	90 \pm 2	99 \pm 4	103 \pm 4

^a300 mg of wheat spiked with 200 μ g Kg⁻¹ of each toxin, extraction time: 15 min.
^bStandard deviation, n=3.
^cVolume of SUPRAS: 1200 μ L.
^dSUPRAS synthesized from a 35/65 water/THF, v/v, and made 1% in acetic acid.

The recoveries were strongly dependent on the water/THF ratio in the synthetic solution and hence on the size of the aqueous cavities of the SUPRAS formed. The size of these vacuoles increased with increasing content of THF in the solution. Quantitative recoveries for DON and ZEA were only obtained with SUPRAS synthesized from around 30/70 and 35/75 water/THF (v/v) ratios, respectively (Table 3), which gave vacuoles large enough to allow these analytes to efficiently diffuse through them. Their considerable difference in polarity (see the corresponding values for log K_{ow} in Table 1) scarcely influenced the extraction behavior of DON and ZEA. It seems that hydrogen bond interactions between these analytes and the polar region of the SUPRAS were strong enough to efficiently drive their extraction.

Regarding the low recoveries obtained for FB1 and FB2, as compared with those got for DON and ZEA, they cannot be explained on the basis of their differences in polarity or capacity to establish hydrogen bonds with the SUPRAS (Table 1). So, both molecular weights and ionization constants were expected to be responsible for this behavior. It has been previously known that recoveries for SUPRAS made up of alkanols are strongly dependent on the molecular weight of analytes¹⁵. Thus, only the SUPRAS with the highest vacuoles (i.e. the highest percentages of THF) are able to extract quantitatively compounds with molecular weights around 700 (e.g. Acid Red 97, MW = 698.6, in sludge) while they do not afford complete recovery of compounds with molecular weights around 800 (e.g. maximal recovery for Brilliant Blue G, MW = 825.9, in sludge is about 54%)¹⁵. So, on the basis of their molecular weights, the recoveries for FB1 and FB2 (MW 721,82 and 705,83) were expected to be higher than those experimentally obtained as extracted with SUPRAS synthesized in solutions containing 70% of THF (Table 3).

The pH for extraction was then considered for optimization since fumonisins bear carboxylic acid groups that are probably deprotonated as extracted with the SUPRAS (pKa = 3.49, Table 1) and this could negatively affect their extraction efficiency. So, the influence of adding acetic acid to the SUPRAS on the recoveries of fumonisins was investigated. Recoveries increased with increasing percentages of acetic acid in the SUPRAS and they were 90±2% and 99±4% for FB1 and FB2, respectively, for SUPRAS synthesized in 35/65 water/THF solutions and then made 1% in acetic acid. Under these conditions, recoveries for DON and ZEA were also high, 98±1% and 103±4% respectively, so they were selected as optimal for microextraction of *Fusarium* toxins.

The influence of the volume of SUPRAS on the extraction efficiency of *Fusarium* toxins is shown in Table 3. Recoveries were nearly constant for SUPRAS volumes equal or above 600 μL . On the other hand, deficient solvation of the sample was observed for SUPRAS volume/sample amount ($\mu\text{L}/\text{mg}$) ratios below 2. A volume of 600 μL was selected as optimal in order to keep detection limits as low as possible.

The extraction procedure has two steps, namely vortex shaken and centrifugation. First, the time required to reach extraction equilibrium conditions, under vortex shaken of the wheat sample/SUPRAS mixture at 2500 rpm, was investigated in the interval 5-30 min. Equilibrium conditions were reached after 15 min; recoveries kept constant at higher extraction times and decreased at the lower ones. Once the extraction was completed, samples were centrifuged at different rotation rates and times to separate the material suspended in the supramolecular extract. Effective separation was achieved after centrifugation at 8.500 g for 15 min.

3.3. Analytical performance

Calibration curves were run by analysing standard solutions in SUPRAS containing the analytes at ten concentration levels. The maximum concentration tested was 3750 $\mu\text{g L}^{-1}$. The slopes of the calibration curves were $342 \pm 6 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ for DON, $17333 \pm 285 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ for FB1, $11317 \pm 348 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ for FB2 and $1717 \pm 81 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ for ZEA. Correlation between peak areas and *Fusarium* toxin concentrations was determined by linear regression. Correlation coefficients were in the range 0.996–0.9992, indicating good fits.

Instrumental detection (IDL) and quantitation (IQL) limits were calculated from the lower concentrations of SUPRAS-based standards giving a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. IDLs and IQLs were $3.7 \mu\text{g L}^{-1}$ and $12.5 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, for DON and ZEA and $2 \mu\text{g L}^{-1}$ and $6.2 \mu\text{g L}^{-1}$ for fumonisins. Method detection (MDL) and quantification (MQL) limits were calculated from ten independent complete determinations of blank wheat samples by using a signal to noise of 3 and 10, respectively. MDLs and MQLs were $15 \mu\text{g Kg}^{-1}$ and $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively, for DON and ZEA and $8 \mu\text{g Kg}^{-1}$ and $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for fumonisins. These values were far below the maximum levels set by the European Commission for these toxins in foodstuffs³⁶.

The possible interference from matrix components was investigated by comparison of the slopes of the calibration curves obtained from standards in SUPRAS with those run from wheat and maize spiked with known amounts of *Fusarium* toxins within the linear range analysed using the whole recommended procedure. The slopes of the calibration curves obtained for the wheat and maize and those obtained from standards in SUPRAS were not statistically different by applying a Student's t-test. The experimental t-values were in the range 0.15–1.49 and were below the critical t-value (2.58), the significance being established at 0.01 levels. Therefore, matrix components were not expected to interfere in the determination of the target compounds under the proposed conditions and SUPRAS-based calibration curves are proposed for quantification.

The role of the surfactant aggregates making up the SUPRAS in the removal of matrix effects was investigated by extracting 300 mg of durum wheat, bread wheat and yellow maize according to the procedure described in Section 2.4.2 but using

0.6 mL of a mixture of THF:10 mM aqueous hydrochloric acid (65:35, v/v) as the solvent. An aliquot of the supernatant (200 μL) was spiked with 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ of ZEA, DON, FB1 and FB2 and then diluted with 200 mL of the solvent and subjected to LC/MS analysis. Calibration was carried out from standards solutions prepared in THF:10 mM aqueous hydrochloric acid. The values found for signal suppression/enhancement (SSE, %) for DON, ZEA, FB1 and FB2 were 28%, 28%, 230% and 490%, respectively, in durum wheat; 32%, 44%, 436% and 546%, respectively, in bread wheat, and 29%, 16%, 115% and 760%, respectively, in maize. So, strong ion suppression was observed for DON and ZEA in the matrices investigated using external calibration, while a notable ion enhancement occurred for FB1 and FB2. This means that the aggregates making up the SUPRAS were essential to remove matrix effects.

The precision of the method was evaluated by extracting 11 independent fortified (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) wheat and maize samples. The values, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 3 and 8% for all the *Fusarium* toxins.

3.4. Analysis of cereal samples

The proposed method was applied to the determination of the legislated *Fusarium* toxins in bread wheat, durum wheat and yellow maize. Both native and fortified (MQL, 100 and 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) cereal samples were quantified. None of them contained the toxins at detectable levels. Table 4 shows the recoveries obtained, expressed as the mean value of three independent determinations, along with their corresponding standard deviations. Recoveries were between 87% and 105% with relative standard deviations ranging from 1% to 7%.

Table 4. Mean recoveries and the respective standard deviations obtained for Fusarium toxins in the analysis of cereal samples using the proposed method

Samples	Recovery \pm ^b S (%)			
	DON	FB ₁	FB ₂	ZEA
Wheat				
Durum 1	90 \pm 6 ^b	104 \pm 5 ^b	105 \pm 4 ^b	99 \pm 7 ^b
	88 \pm 4 ^c	96 \pm 4 ^c	99 \pm 1 ^c	104 \pm 6 ^c
	96 \pm 1 ^d	97 \pm 4 ^d	98 \pm 4 ^d	95 \pm 1 ^d
Durum 2	93 \pm 6 ^b	102 \pm 7 ^b	105 \pm 6 ^b	89 \pm 5 ^b
	93 \pm 7 ^c	90 \pm 2 ^c	88 \pm 1 ^c	99 \pm 3 ^c
	95 \pm 1 ^d	87 \pm 3 ^d	91 \pm 5 ^d	92 \pm 5 ^d
Bread 1	90 \pm 4 ^b	92 \pm 7 ^b	95 \pm 5 ^b	103 \pm 5 ^b
	96 \pm 1 ^c	97 \pm 5 ^c	98 \pm 2 ^c	103 \pm 2 ^c
	95 \pm 3 ^d	94 \pm 6 ^d	98 \pm 6 ^d	92 \pm 2 ^d
Bread 2	98 \pm 7 ^b	88 \pm 5 ^b	103 \pm 6 ^b	91 \pm 4 ^b
	92 \pm 5 ^c	95 \pm 6 ^c	98 \pm 8 ^c	99 \pm 7 ^c
	93 \pm 2 ^d	90 \pm 5 ^d	88 \pm 3 ^d	93 \pm 3 ^d
Maize				
Yellow	89 \pm 1 ^b	91 \pm 5 ^b	102 \pm 7 ^b	94 \pm 4 ^b
	100 \pm 1 ^c	99 \pm 1 ^c	99 \pm 6 ^c	96 \pm 3 ^c
	96 \pm 7 ^d	90 \pm 4 ^d	89 \pm 2 ^d	92 \pm 3 ^d

^a Standard deviation, n=3; 300 mg of sample spiked at.
^b MQL
^c 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$
^d 400 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of each toxin

The chromatograms obtained from standard solutions (37.5 and 375 $\mu\text{g L}^{-1}$) of the Fusarium toxins in the supramolecular solvent as well as those got from two samples (bread wheat and yellow corn) fortified with these toxins at three concentration levels (MQL, 100 and 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) are shown in Fig. 3 (a–c).

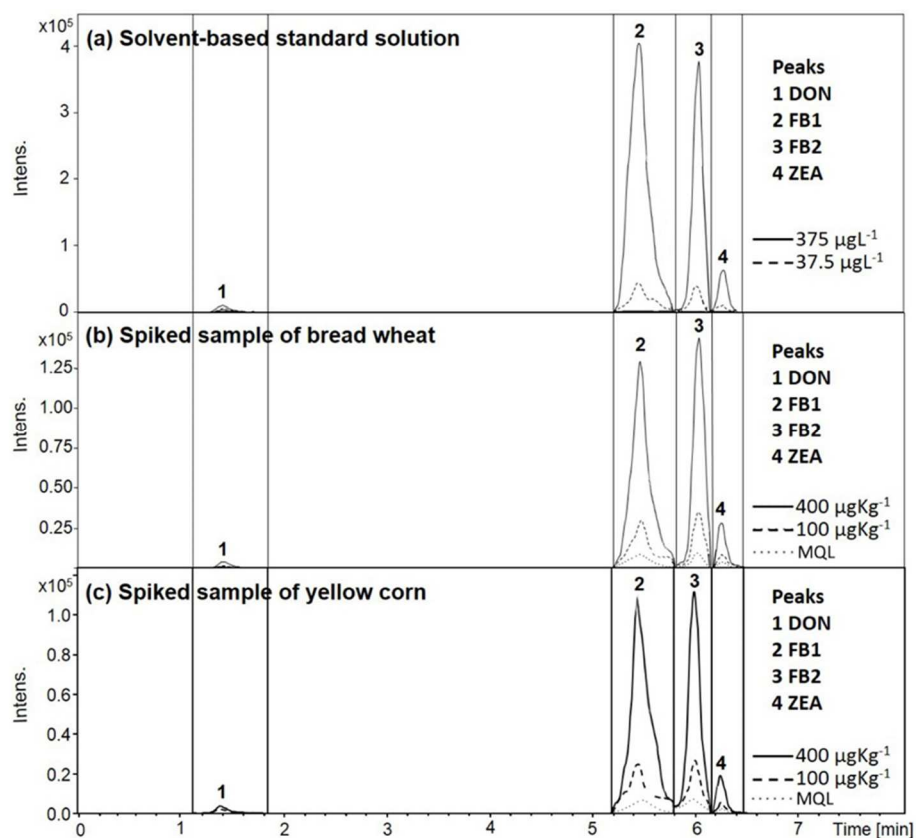


Fig. 3. LC-ESI-IT-MS selected ion chromatograms for Fusarium toxins obtained from (a) solvent-based standard solutions (37.5 and $375 \mu\text{g L}^{-1}$) and (b) bread wheat and (c) maize samples, both spiked with Fusarium toxins at three different concentrations (MQL, 100 and $400 \mu\text{g kg}^{-1}$). MQL = $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ for DON and ZEA and $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ for FB1 and FB2.

Table 5. Comparison of LC-MS methods for the determination of DON, ZEA, FB1 and FB2 in cereals

Sample type (size)	Sample treatment	Separation/detection	R (%)	*MQL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	%SSE (%)	Ref.
Wheat and maize (0.3g)	SUPRAS extraction (0.6mL) for 15 min, centrifugation and dilution (2-fold)	LC-10n TRAP-MS (External calibration)	87-105	DON=ZEA=50 FB1=FB2=25	98-101	This paper [20]
Maize, wheat and barley (4 g)	QuEChERS extraction (7.5 mL 0.1% formic acid + 10 mL AcN) for 3 min. Addition of 1 g NaCl + 4 g MgSO ₄ , stirring, centrifugation and dilution (2-fold)	UHPLC-TOF-MS (Matrix matched standard calibration and 13C isotopically labeled surrogates)	Matrix matched calibration: 60-113 (isotopically labeled surrogates: 94-108)	DON=50 FB1=25 FB2=ZEA=10	63-95	[26]
Rice (10 g)	QuEChERS extraction (10 mL 10% formic acid + 10 mL AcN) for 1h. Addition of 1 g NaCl + 4 g MgSO ₄ + 1 g sodium citrate tribasic dehydrate + 0.5 g sodium citrate dibasic sesquihydrate, stirring for 1 min and centrifugation. Cleanup with 1.2 g MgSO ₄ + 0.25 g C18 + 0.25 g Al-N + 0.4 g PSA, centrifugation, evaporation to dryness and reconstitution in mobile phase	UHPLC-QQQ-MS (Matrix matched standard calibration)	62-95	DON=16.7 FB1=3.3 FB2=ZEA=1.7	84-143	[26]
Pseudocereals (buckwheat, quinoa And amaranth), spelt and rice (2 g)	QuEChERS extraction (8 mL water + 10 mL 5% formic acid in AcN and 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g sodium citrate + 0.5 g di sodium Hydrogen citrate sesquihydrate) for 1 min and centrifugation. Evaporation to dryness and reconstitution in methanol:water	UHPLC-QQQ-MS (Matrix matched standard calibration)	62.8-99.7	ZEA=22.7 DON=18.2 FB2=1.01 FB1=0.65	73-86	[27]
Wheat (12.5 g)	Solvent extraction (50 mL AcN:water, 84:16, v/v) for 1 hour.	HPLC-QQQ-MS (matrix matched standard calibration)	69-87	ZEA=5	N.R.	[30]
Wheat, oats, rye, barley and spelt (5 g)	Evaporation (4 mL) to dryness, reconstitution in water:methanol Solvent extraction (25 mL AcN:water, 84:16, v/v) for 1h. Centrifugation and evaporation (5 mL) to dryness.	HPLC-QQQ-MS (matrix matched standard calibration)	93-95	DON=1 DON=10 ZEA=5	N.R.	[31]
Rice, wheat, oat, barley and maize (10 g)	Reconstitution in methanol:water Solvent extraction (40 mL AcN:water:acetic acid, 79:20:1) for 60 min. Centrifugation and dilution (2-fold)	HPLC-QQQ-MS (matrix matched standard calibration)	85.9-89.6	FB1=FB2=40 DON=20	N.R.	[54]
Maize (10 g)	Solvent extraction (40 mL AcN/water, 84/16, v/v) for 90 min. Cleanup on MycoSeps #2.26 columns. Evaporation to dryness of eluates and reconstitution in methanol 20/80, v/v, containing 5 mM ammonium acetate	HPLC-QQQ-MS (external calibration for DON, internal standard for ZEA)	79-99	ZEA=1 ZEA=3.2 DON=2.7	N.R.	[43]
Maize (10 g)	Accelerated solvent extraction (45 mL AcN/water 75/25, v/v and 3g diatomaceous earth). Two solid-phase cleanup steps on strong anion exchange resin and MycoSep column	HPLC-QQQ-MS (isotopically labeled internal standard)	40-90	DON=FB1=50 ZEA=10	N.R.	[44]
Maize (5 g)	Solvent extraction in two steps (first 20 mL AcN/water/formic acid, 80/19.9/0.1, v/v/v for 60 min and the residue extracted with 20 mL AcN/water/formic acid, 20/79.9/0.1, v/v/v) for 30 min	UHPLC-QQQ-MS (isotopically labeled internal standard)	88-103	DON=11 FB1=4.3 FB2=3.9 ZEA=2.9	49-356	[49]
Maize (5 g)	Solvent extraction (20 mL of AcN:water:acetic acid, 79:20:1) for 60 min. Centrifugation and dilution (2-fold)	HPLC-QQQ-MS (external calibration and correction for recoveries)	51-104	FB1=21.6 DON=18.2 FB2=6.3 ZEA=0.7	82-121	[47]
Wheat and maize (0.5 g)	Solvent extraction (2 mL AcN:water:acetic acid, 79:20:1, v/v/v) for 90 min. Centrifugation and dilution (2-fold)	HPLC-QQQ-MS	41-108	N.R.	97-107	[22]

Abbreviations: N.R. not reported.
 * Recovery.
 † Method quantification limit.
 ‡ Signal suppression/enhancement.

4. Conclusions

The results here obtained prove the capability of SUPRAS-RAM to efficiently extract analytes in a wide polarity range, including highly polar (i.e. $\log K_{o/w} = -0.7$), and remove macromolecules such as carbohydrates and proteins from samples. These properties are of great value for simplifying sample treatment in multi-residue analysis by LC-MS. Also, extends the use of RAM to the direct treatment of solid samples.

Table 5 shows the analytical features of representative LC-MS methods reported for the determination of the target analytes in cereals. Although some of these methods were intended to multi-mycotoxin determination, only data concerning to DON, ZEA, FB1 and FB2 have been considered for comparison with the method here developed. Regarding sample treatment, conventional solvent extraction and QuEChERS extraction have been by far the most used approaches for isolation of Fusarium toxins in cereals.

The mixture AcN:water gives acceptable recoveries for extraction of DON and ZEA^{30,31,43}, but an acid medium (e.g. AcN:01–10% formic acid [20,26,27,49] or AcN:1% acetic acid^{22,47,54}) is required for extraction of FB1 and FB2. Acid conditions (i.e. 1% acetic acid) are also required for SUPRAS extraction of FB1 and FB2. Although sample clean up is often carried out to obtain cleaner extracts^{26,43,44}, a great effort is being put into the use of dilute and shoot methods in order to reduce sample treatment to a minimum. Evaporation to dryness and reconstitution in

⁵⁴ F. Soleimany, S. Jinap, F. Abas. FoodChem. 130 (2012) 1055–1060.

methanol:water is a frequent step^{26,27,30,31,43}. Triple quadrupole has been, almost exclusively, the mass analyzer used for determination of mycotoxins, although high resolution MS has been also proposed²⁰. Signal suppression/enhancement produced by matrix components continues as one of the biggest problems associated to these methods, so the use of matrix matched calibration or isotopically labeled internal standards becomes essential for reliable quantitation (see Table 5). External calibration and correction of the results on the apparent recoveries of the respective toxins has been also proposed⁴⁷.

The most valuable asset of the method here reported is the absence of matrix effects without the need for further clean up, that permitting reliable quantitation using external calibration. Additional advantages include faster extraction (e.g. SUPRAS extraction takes 15 min while most of the reported methods take between 1 and 1.5 h^{22,26,30,31,43,47,49,54}); less solvent volume/sample amount ratio (e.g. 2 for SUPRAS and between 4 and 9 for the reported methods) and better general recoveries^{22,26,27,30,44,47}). A disadvantage is that the methods using LC-QQQ-MS give lower quantitation limits than the method here reported, which is based on LC-Ion TRAP-MS, although many of them include an evaporation step (Table5). Anyway, the SUPRAS-based method can be used for the routine control of Fusarium toxins in cereals below the legal limits established by the European Directives. On the other hand, the number of targeted mycotoxins addressed by the methods included in Table 5 are, in general, higher than that addressed in this paper, so further research is required to extend this method to multi-mycotoxin determination.

Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MINECO (Project CQT 2011-23849) and FEDER. They specially thank to Department of Agronomy and Genetic Improvement of Córdoba for kindly providing the cereal samples. S.García-Fonseca Acknowledges the Spanish MEC for the postgrad fellowship award (BES-2006-12643).

PARTE I
CAPÍTULO 4

**RESTRICTED ACCESS SUPRAMOLECULAR
SOLVENTS FOR INTERFERENCES REMOVAL IN
ENZYME-LINKED IMMUNO-SORBENT ASSAY OF
MYCOTOXINS IN FOOD**

Restricted access supramolecular solvents for interferences removal in enzyme-linked immuno-sorbent assay of mycotoxins in food

Enviado a publicar en (2016)

Sergio García-Fonseca, Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio

Abstract

A restricted access supramolecular solvent (SUPRAS-RAM) made up of tetradecanoic acid reverse micelles was here proposed for the first time as a generalized and low-cost strategy for the treatment of agrifood samples prior to enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The approach was evaluated by determining ocratoxin A in wine and spices and aflatoxin B1 in cereals, which were selected as models because they require immunoaffinity column-based sample cleanup prior to ELISA. These samples have great difference in matrix composition and some of them (e.g. spices) are classified as difficult or unique commodities. Parameters affecting extraction efficiency were optimized. Macromolecules such as proteins and carbohydrates were excluded from extraction by chemical and physical mechanisms, so analyte extraction and sample cleanup were carried out in a single step. Removal of the surfactant by precipitation made the extract compatible with ELISA. Certified reference materials were used for method validation. Recoveries for OTA ranged between 83% and 96% for several kind of wines (with relative standard deviation (R.S.D.) of about 10%) and 81% and 93% for different

spices (R.S.D.= 7%) while recoveries for AFB1 in wheat ranged from 75% to 85% for wheat samples (R.S.D.= 8%). The detection limits were all below the maximum levels established for OTA and AFB1 by EU directives. This method offers a simple, fast and low-cost alternative to the immunoaffinity column-based cleanup of complex samples prior to ELISA.

1. INTRODUCTION

Mycotoxins are toxic and ubiquitous secondary metabolites produced by a great variety of filamentous fungi on agrarian-origin commodities, in both the field and the storage stage, under different environmental and climatic conditions¹. Around 400 mycotoxins have been described so far, although aflatoxins and ochratoxin A (OTA) have received the most attention due to their adverse effects (liver and kidney toxicity, teratogenicity and carcinogenicity)². Both types of mycotoxins constitute a growing threat for animal and human health, and also provoke high economic losses associated to crop production. These threats have been recognized by international organizations (European Commission (EU)³, US Food and Drug

¹ N. Magan, M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, 2004.

² John L. Richard, Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview, *International Journal of Food Microbiology* 119 (2007) 3-10.

³ Commission regulation (EC) No 1881/2006.

Administration (FDA)⁴, World Health Organisation (WHO)⁵ and Food and Agriculture Organisation (FAO)⁶ which have established regulatory limits for the most relevant mycotoxins. In the last decade, around 25% of total notifications in The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) were due to aflatoxins and ochratoxin A⁷.

A wide variety of methods have been proposed for the determination of both individual and major classes of mycotoxins in different food commodities. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (MS)^{8,9,10}, diode array (DAD)^{8,11,12,13} or fluorescence (FL)^{13,14,15} has become a standard technique for this purpose. Because of the complexity of food matrices, sample preparation (extraction, concentration and clean-up) is an essential step in

⁴ FDA - CAST, 2003. Mycotoxins — risks in plant, animal and human systems, Task Force Report, No.139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, pp. 1–191.

⁵ JECFA 2007. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 68th Meeting, Geneva 18-29 June 2007.

⁶ Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>.

⁷ European Commission. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Available from: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.

⁸ S. Kirinčič, B. Škrjanc, N. Kos, B. Kozolc, N. Pirnat, G. Tavčar-Kalcher, *Food Control*, 50 (2015) 157.

⁹ C. Juan, L. Covarelli, G. Beccari, V. Colasante, J. Mañes, *Food Control*, 62 (2016) 322.

¹⁰ N. Arroyo-Manzanares, J. F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A. M. García-Campaña, *Food Chem.*, 177 (2015) 274.

¹¹ N. Sebastià, G. Meca, J.M. Soriano, J. Mañes, *Food Control*, 25 (2012) 631.

¹² D.R. Katerere, S. Stockenström, G.S. Shephard, *Food Control*, 19 (2008) 389.

¹³ N. Ndube, L. van der Westhuizen, I. R. Green, G. S. Shephard, *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 2239.

¹⁴ F. Hepsag, O. Golge, B. Kabak, *Food Control*, 38 (2014) 75.

¹⁵ M. Ibáñez-Vea, L. A. Corcuera, R. Remiro, M. T. Murillo-Arbizu, E. González-Peñas, E. Lizarraga, *Food Chem.*, 127 (2011) 351.

mycotoxins analysis. Also due to the chemical and structural diversity of mycotoxins it is not possible to use a single strategy for this purpose.

Solvent extraction with acidified chloroform or toluene, mixtures of water and acetonitrile, methanol, acetone and ethylacetate, is routinely used for extraction of aflatoxins and OTA in solid food matrices^{15,16,17,18}. The volume of organic solvent consumed per sample is relatively high (50-250mL) and after extraction, further clean-up is usually needed. Immunoaffinity columns (IAC) are the most widely used for this purpose because they have demonstrated high selectivity, good reproducibility and applicability to a wider range of matrices than other methods¹⁹.

Nowadays effective solutions are increasingly being required for the detection of mycotoxins which should be simpler, faster and cheaper too. Also it would be desirable that they could be used by non-scientific personnel. In this context, screening methods based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are the most used. ELISA kits are commercially available for many important mycotoxins²⁰. They are usually based on a competitive assay format where an antibody specific for the analyte is immobilized and exposed to the enzyme-labelled analyte and unknown (or standard) analyte. The amount of enzyme-labelled analyte bound to the antibody can be determined

¹⁶ P. Zöllner, B. Mayer-Helm, J. Chromatogr. A, 1136 (2006) 123-169.

¹⁷ D.R. Katerere, S. Stockenström, G.S. Shephard, Food Control, 19 (2008) 389.

¹⁸ C. Juan, C.M. Lino, A. Pena, J.C. Moltó, J. Mañes, I. Silveira, Talanta, 73 (2007) 246.

¹⁹ H. Z. Şenyuva, J. Gilbert, J. Chromatogr. B, 878 (2010), 115.

²⁰ European Mycotoxins Awareness Network (EMAN). Available: <http://eman.leatherheadfood.com/>.

by reaction with a chromogenic substrate to give a measurable result. Main advantages of ELISA kits are speed, high specificity, portability and ease to use. However, they can be expensive and suffer of cross-reactivity and interferences from matrix components which causes overestimation^{21,22}. Removal of interferences is carried out with commercially available immunoaffinity columns. IACs help to simplify protocols, improve selectivity and, thus, performance characteristics. However, IACs are not recyclable, have a limited storage time (commonly 12 months)²³ and would put up the price for analysis even more.

In this paper, we propose for the first time supramolecular solvents with restricted access properties for the simultaneous extraction of mycotoxins and removal of food matrix components prior to their ELISA determination. For this purpose, SUPRASs made up of inverted hexagonal aggregates of tetradecanoic acid in mixtures of THF and water were selected²⁴. These investigations aimed to explore the potential of SUPRAS-RAM for the development of generalized sample treatments when matrix composition varies in a wide range (e.g. percentage of protein, fat, carbohydrates, water, etc.) and when complex matrices are involved (e.g. spices have high content in pigmentation and essential oil compounds, which interfere with the extraction of mycotoxins, high concentration of carbohydrates, and some of them, high fat content (e.g. nutmeg)). Traditionally, these matrix-dependent

²¹ R.D. Josephs, R. Schuhmacher, R. Krska, *Food Addit. Contam.*, 18, 2001, 417.

²² R. Schuhmacher, R. Krska, M. Grasserbauer, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 359 (1997) 510.

²³ B. Zimmerli, R.J. Dick, *J. Chromatogr. B*, 666 (1995) 85.

²⁴ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

methods require differentiated sample extraction and/or purification procedures. By developing matrix-independent sample treatment procedures, food quality control is greatly simplified.

Ochratoxin A (OTA) in wines and spices and aflatoxin B1 (AFB1) in cereals were selected as models in this investigation. Extraction of OTA and AFB1 was based on both hydrophobic and hydrogen bonds analyte:extractant interactions. The developed methodology was simple, fast and inexpensive for the routine control of these contaminants in different food samples and constitutes a valuable alternative for the immunoaffinity columns-based pre-treatments prior to ELISA determination.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical-reagent grade and employed as supplied. Tetradecanoic acid was obtained from Aldrich (Milwaukee, WI). Tetrahydrofuran (THF), HPLC-grade acetonitrile, methanol and acetic acid glacial were supplied by Panreac (Sevilla, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). OchratoxinA (OTA) and Aflatoxin B1 (AFB1) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The reference materials OWW-3 (OTA in white wine; 3.0 ± 0.5 ppb) and ORW-5 (OTA in red wine; 5.0 ± 0.8 ppb) were obtained from R-Biopharm (Glasgow, Scotland). Stock standard solutions of 10 mg L^{-1} of

OTA and AFB1 were prepared in methanol and stored under dark conditions at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Working solutions were prepared by dilution of the stock solutions with methanol.

2.2. Instrumentation

A Spectra System SCM1000, (ThermoQuest, San Jose, CA, USA) consisting of a P2000 binary pump, a FL3000 fluorescence detector and an AS3000 autosampler was used for optimisation of extraction parameters. The stationary-phase column utilized for analysis was a 15 cm Kromasil C18 5 μm column, with 4.6 mm I.D., from Análisis Vínico (Tomelloso, Spain). Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA): RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 and RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 (R-Biopharm, Germany). A 1420 Multilaber counter Victor 3V microplate reader (Perkin Elmer and Analytical Sciences, Wallac Oy, Turku, Finland) was used to perform photometry measurements. The intensity of the resulting yellow colour was measured at 450 nm. A Mixtasel Selecta and a High Speed Brushless (MPW-350R) centrifuges were employed for sample preparation. Centrifuge tubes with narrow necks, used for liquid samples, were designed by authors in order to make easier the measurement and collection of the supramolecular solvent after microextraction. Pobel S.A. (Madrid, Spain, web page: www.pobel.com) constructed them from commercial heavy-duty glass cylindrical centrifuge tubes with round-bottom (ref. 159050) by keeping their basic structure at the bottom (34 mm of outside diameter) but reducing the diameter from a specified height, which depended on the required tube capacity.

2.3. Supramolecular solvent extraction of mycotoxins in food prior to ELISA determination

2.3.1. Extraction of OTA in wine

Tetradecanoic acid (300 mg) was dissolved in THF (2 mL) in a specially designed glass centrifuge tube with a narrow neck. Then, 8 mL of red or white wine (pH 3–3.5, adjust with 1.0 M HCl) were added. Sweet wines were previously two-fold diluted with distilled water. The SUPRAS spontaneously formed and separated from the bulk solution. The mixture was stirred (5 min, 1500 rpm) to favour OTA extraction and then centrifuged at 3000 rpm for 7 min to accelerate complete separation of the SUPRAS phase. Then, the volume of SUPRAS, which was standing at the neck of the glass tube, was measured with a digital calliper. The small internal diameter of the tube neck (~ 8.0 mm) facilitated the extraction of the volume of SUPRAS obtained (675–690 μ L) and the accuracy of the measurements. Afterwards, 340 μ L of SUPRAS extract were withdrawn with a microsyringe and introduced into a centrifuge tube with a magnetic bar. The solvent was stirred at 300 rpm under N₂ stream in order to evaporate THF, which caused precipitation of tetradecanoic acid. The solid residue was suspended in 2.5 mL of phosphate buffer (pH 7.0, 0.04 M NaH₂PO₄·H₂O and 0.092 M Na₂HPO₄·2H₂O) and the mixture was stirred for 5 min at 1500 rpm and centrifuged at 3200 rpm for 7 min. Finally, 0.5 mL of the supernatant (previously microfiltered; Nylon, 22 μ m) were diluted with 3.5 mL of phosphate buffer (pH 8.0, 2.65 mM NaH₂PO₄·H₂O and 0.0711 M Na₂HPO₄·2H₂O) and an aliquot of 50 μ L was subjected to ELISA.

2.3.2. Extraction of OTA in spices and AFB1 in wheat

Wheat grains (25g aliquots) were ground and blended in a Retsch MM301 mixer mill, in two steps (2 min each), at a vibrational frequency of 28 s⁻¹. This procedure gave particle sizes below 50 µm, which permitted to get representative 300mg subsamples. If not immediately analysed, the samples were vacuum-packaged in foil-laminate pouches, heat sealed and stored at -4 °C. Spices were purchased in local supermarkets and subjected to extraction (300 mg) without further treatment.

The SUPRAS-RAM was spontaneously produced by solubilizing tetradecanoic acid (0.3 g) in THF (2 mL) under addition of 10⁻³M HCL aqueous solution (8mL) and then withdrawn with a syringe and stored (at 4°C in dark conditions) until use. Spices (300 mg of paprika, black pepper and nutmeg) or wheat (300 mg) were mixed with 640 µL or 800 µL, respectively, of SUPRAS-RAM in a 2 mL-eppendorf tube. The mixture was stirred with a magnetic bar at 1500 rpm for 15 min and centrifuged at 3500 rpm for 15 min. Next, 320 µL of spice extract or 400 µL of wheat extract were transferred to a centrifuge tube (10mL) with a magnetic bar and subjected to THF evaporation and mycotoxin solubilisation similarly to the procedure described for wines. Finally 50 µL-aliquots were used for each microwell of the plate in the analysis by ELISA.

2.3.3. Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay of OTA and AFB1

The samples were analysed for OTA and AFB1 using the procedures described by R-Biopharm in the commercially available ELISA kits. RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in several foodstuffs and feed. RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15, which was provided by R-Biopharm, is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Aflatoxin B1 in cereals and feed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The potential of SUPRAS-RAM to simultaneously extract analytes and remove interferences from food prior to ELISA was evaluated by extracting ochratoxin A (OTA) and aflatoxin B1 (AFB1) in wine, spices and wheat A. The physico-chemical properties of the selected mycotoxins are very different (e.g. the log KOW is 4.6 and 0.45 for OTA and AFB1, respectively, and water solubility is 19 and 0.34 g L⁻¹, respectively, at pH around 7), so that the results can be extrapolated to other mycotoxins. Similarly, the samples selected included liquid and solid food encompassing a wide range of compositions regarding matrix components (viz. percentage of carbohydrates, fats, proteins, etc). SUPRAS-RAM were made of carboxylic acids in THF²⁴.

The incompatibility of surfactants with immunoassays is well known, because they block the sites available for analytes²⁵. So, we investigated the influence of dodecanoic acid, as representative of carboxylic acids, in the determination of OTA by ELISA. Concentrations of dodecanoic acid between 0.05 and 0.5 mM had a strong influence in the response obtained and the system was completely saturated for values above 0.5 mM. Thus, concentrations of surfactant below 0.05 mM are required in order to combine SUPRAS-RAM and ELISA. Typical concentrations of surfactant in SUPRASs made-up of reverse micelles of carboxylic acids are about 2700 mM. So, SUPRAS extracts have to be treated in order to remove the surfactant prior ELISA.

SUPRAS-RAM are made up of molecules of carboxylic acid arranged in inverted hexagonal aggregates, with aqueous cavities surrounded by the polar groups and the hydrocarbon chains dissolved in THF. Removal of THF produces the precipitation of carboxylic acids with hydrocarbon chain lengths above ten because of their low solubility in water, so evaporation of THF can be used for surfactant removal and buffered aqueous solutions could be used for mycotoxin solubilization.

3.1. Optimization

Optimization of the extraction of mycotoxins in food and removal of the surfactant prior to quantification by ELISA was carried out by extracting

²⁵ O.L. Goldrin, *Immunoassay Technol.*, 2 ((1986) 189.

OTA in wines and applying the optimized conditions to the extraction of AFB1 and other matrices. Studies were carried out using white wine fortified with 1 μgL^{-1} of OTA. Experiments were made in triplicate. Selection of the optimal conditions was based on recoveries and quantification of OTA was performed by liquid chromatography coupled to fluorescence detection.

3.1.1. SUPRAS-RAM based extraction of mycotoxins

Carboxylic acids offer a variety of interactions for solubilisation of solutes (van der Waals, hydrogen bonds, and polar interactions). The forces expected to drive the extraction of OTA by the carboxylic acid-based SUPRAS-RAMs are van der Waals interactions between the hydrocarbon chains of the carboxylic acid and the OTA aromatic framework, and hydrogen bonds, on account of the acceptor and donor groups of the analyte.

SUPRAS-RAMs made up of different carboxylic acids (C12-C18) were tried as extractant of OTA from wine. Shorter alkyl chains were not considered in this study because of their higher solubility in water which should make more difficult surfactant removal prior ELISA. SUPRAS-RAMs were synthesized by dissolving 300 mg of carboxylic acid in THF (1 mL for C12, 2 mL for C14 and 3 mL for C16 and C18) and adding the solution to wine (total volume of the mixture = 10 mL). Recoveries obtained were 99 ± 4 , 95 ± 3 , 82 ± 4 and 77 ± 2 for C12, C14, C16 and C18, respectively. The extraction efficiency for OTA in wine was similar to that obtained in water (viz. 97 ± 1 , 97 ± 2 , 81 ± 2 and 78 ± 5 for C12, C14, C16 and C18, respectively), so matrix components did not interfere in OTA extraction. The increase in recoveries

for the shorter alkyl chain carboxylic acids has been previously reported for other polar analytes²⁶ and it has been explained on the basis of the increase of the strength of the hydrogen bond as the length of the hydrocarbon chain decreases. According these results, dodecanoic and tetradecanoic acids were selected for further studies.

Table 1 shows the influence of the amount of carboxylic acid used for the synthesis of the SUPRAS-RAM on the recovery of OTA. Maximal extraction efficiency was obtained from 200 mg of dodecanoic acid and 300 mg of tetradecanoic acid, which represents 1 and 1.3 millimoles, so the shorter alkyl chain carboxylic acid was more efficient for OTA extraction, probably because the same reasons given above.

Table 1. Mean percent recoveries and standard deviations obtained for ochratoxin A in white wine using different amounts of dodecanoic and tetradecanoic acid

Carboxylic acid (mg)	Recoveries, ^a R ± ^b S (%)	
	Dodecanoic acid ^c	Tetradecanoic acid ^d
50	84 ± 1	50 ± 5
100	92 ± 1	66 ± 4
200	97 ± 2	84 ± 2
300	99 ± 4	95 ± 3

^arecoveries
^bstandard deviation, n=3
^c10% THF
^d20% THF

²⁶ F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 109.

Table 2. Mean percent recoveries and standard deviations obtained for ochratoxin A in white wine using different volumes of tetrahydrofuran

Tetrahydrofuran (%, v/v)	Recoveries, ^a R ± ^b S (%)	
	^c Dodecanoic acid	^d Tetradecanoic acid
7,5	95 ± 1	Precipitate
10	97 ± 2	Precipitate
15	89 ± 2	Precipitate
20	88.2 ± 0.2	95 ± 3
25	84 ± 3	92 ± 2
30	79 ± 4	87 ± 1
40	61 ± 2	53 ± 3
^a recoveries		
^b standard deviation, n=3		
^c 200 mg; ^d 300 mg		

The volume of THF used for the synthesis of carboxylic acid-based SUPRASs influences their composition (viz. the molar ratio carboxylic acid/THF/water) and the size of the aqueous cavities of the inverted hexagonal aggregates making up them, and accordingly their RAM properties. Table 2 shows the recoveries obtained for OTA for the two carboxylic acids under study at percentages of THF in the interval 7.5-40%. Tetradecanoic acid requires at least 20% of THF in the mixture wine/THF to be soluble and produce the SUPRAS. The solubility of dodecanoic acid in water is higher and consequently SUPRAS can be produced a lower percentages of THF. Maximal extraction efficiency was obtained at the lower percentages of THF for both carboxylic acids, probably because of the higher solubility of OTA in the equilibrium solution as the volume of THF increased. So, 10 and 20% of THF

was selected for the synthesis of SUPRAS-RAMs from dodecanoic and tetradecanoic acids, respectively. Extraction equilibrium was quickly reached; maximal recoveries were obtained after stirring the sample at 1500 rpm for 5 min.

The conditions optimized for dodecanoic and tetradecanoic acids were applied to the extraction of OTA in red and sweet wines, nutmeg, paprika and black pepper and AFB1 in wheat. In the case of solid samples, the SUPRAS-RAMs were synthesized in water, withdrawn with a syringe and added directly to the sample (300 mg).

Recoveries for OTA in red wine using SUPRAS-RAMs were very similar to those obtained for white wine. However, recoveries for this mycotoxin in sweet wines decreased up to about 50% and the volume of SUPRAS-RAM formed increased, which suggested that matrix components (e.g. glucose, glycerol, etc) incorporated into the SUPRAS. It was checked that 2-fold dilution of the sweet wine with distilled water was enough to reduce its viscosity and extract efficiently OTA.

The volume of SUPRAS required for the extraction of OTA and AFB1 in solid samples was tested in the interval 300-900 μ l (sample/SUPRAS ratio from 1:1 to 1:3). Quantitative recovery of OTA in the selected matrices was obtained from 640 μ L of SUPRAS, while the extraction of AFB1 in wheat required 800 μ l. The extraction equilibrium was reached in all the samples after 15 min of stirring at 1500 rpm.

3.1.2. Removal of the surfactant in the SUPRAS-RAM extract

Removal of the surfactant (dodecanoic and tetradecanoic acids) was carried out by evaporation of the THF making up the SUPRAs with a stream of nitrogen, which caused precipitation of the carboxylic acid. Solubilization of OTA from this residue was tried with phosphate buffer at pH values in the range 5.5-8. Table 3 shows the values of recoveries obtained. Values of pH about 7 gave recoveries above 70% for both dodecanoic and tetradecanoic acids. Solubilization of carboxylic acids in the buffer increased with the pH and because of its higher solubility, the concentration of dodecanoic acid in the buffer was greater compared to that of tetradecanoic acid. Similar results were obtained for AFB1, so, phosphate buffer at pH 7 and SUPRAS-RAM made up of tetradecanoic acid were selected for further studies. Concentrations for both $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in this buffer were 0.04 M and 0.092 M, respectively.

Table 3. Mean percent recoveries and standard deviations obtained for ochratoxin A from the residue as a function of the pH of the buffer solution

buffer pH	Recoveries, ^a R ± ^b S (%)	
	Dodecanoic acid	Tetradecanoic acid
5.5	61 ± 6	61 ± 2
6	64 ± 3	63 ± 4
6.5	68 ± 5	66 ± 2
7	73 ± 4	70 ± 1
7.5	76 ± 3	72 ± 2
8	74 ± 4	73 ± 1

^arecoveries

^bstandard deviation, n=3

dodecanoic acid=200 mg; THF percentage=10%; wine sample=9mL

tetradecanoic acid=300 mg; THF percentage=20%; wine sample=8mL

volume of buffer=2 mL

The influence of the volume of buffer on the recovery of OTA and AFB1 from the residue was investigated in the interval 2-10 mL. Table 4 shows, as an example, the recoveries obtained for OTA. They were above 90% for volume of SUPRAS-RAM equal or higher than 5 mL, which was the volume chosen. Extraction equilibrium was reached after 5 min of stirring at 1500 rpm.

Table 4. Mean percent recoveries and standard deviations obtained for ochratoxin A from the residue as a function of the volume of buffer

Volume of buffer (mL)	Recoveries, ^a R ± ^b S (%)
	Tetradecanoic acid
2	70 ± 1
3	72 ± 3
4	79 ± 1
5	92 ± 4
6	95 ± 3
8	96 ± 2
10	101 ± 4

^arecoveries
^bstandard deviation, n=3
tetradecanoic acid=300 mg
THF percentage=20%
wine sample=8mL
buffer pH=7.0

3.2. Analytical performance

The analytical characteristics of the method here developed (SUPRAS-RAM extraction/cleanup + ELISA) for OTA and AFB1 in different matrices were compared to those obtained with the commercial kits provided by R-biopharm for this purpose (solvent extraction+ immunoaffinity column + ELISA). Table 5 shows the results obtained. Identical or similar linear ranges and detection limits were obtained for the mycotoxins and matrices investigated. These results proved that the strategy here developed decreases the consumption of organic solvents and avoid the use of immunoaffinity columns.

Table 5. Analytical performance of the SUPRAS-RAM based method and the commercial Biopharm kit method.

Analyte/Matrix	SUPRAS-RAM/ELISA				Solvent extraction/IAC/ELISA			
	Sample size	Final extract volume (mL)	Linear range (µg/mL)	Detection limit (µg/mL)	Sample size	Final extract volume (mL)	Linear range (µg/mL)	Detection limit (µg/mL)
OTA								
White, red wines	8 mL	40	0.25-9	0.1	6 mL	30	0.25-9	0.1
Sweet wines	4 mL	40	0.5-18	0.2	6 mL	30	0.25-9	0.1
Spices	0.3 g	40	7-240	3.1	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable
AFB1								
Wheat	0.3 g	4	1-66	0.3	5 g	50	1-50	0.3

The ability of SUPRAS-RAM to remove matrix interferences and give accurate results was assessed by comparing the calibration curves obtained by standards provided by the Biopharm kit and water and food samples spiked with the target mycotoxins to give concentrations within the linear range (n=6). Table 6 shows the results obtained for OTA in white and red wine. The difference between the slopes was found to be not statistically significant by applying an appropriate Student t-test. The calculated t-values were below the critical t-value (3.71) being significance established at 0.05 levels. Similar results were obtained for other matrices and AFB1 in wheat. Therefore, matrix

components were not expected to interfere in the determination of the target compounds in the selected matrices.

Additional validation of the method was carried out by using certified reference materials for red and white wine, supplied by R-Biopharm. These materials were analysed by applying both the method here proposed and the protocol recommended by R-Biopharm to quantify OTA in wines, which makes use of an IAC prior to ELISA. Table 7 depicts the obtained results. Aliquots analysed by the Biopharm method resulted in overestimation of OTA. Quantification by the SUPRAS-RAM-ELISA method gave concentrations within the range certified for the materials analysed.

The precision of the method for the determination of mycotoxins was evaluated by extracting independent fortified samples and applying the whole procedure, namely 12 samples of wine (4 of red wine, 4 of white wine and 4 of sweet wine), 12 samples of spices (4 of paprika, 4 of black pepper and 4 of nutmeg) and 12 samples of wheat (3 of triticum durum, 3 of triticum aestivum, 3 of tritordeum variety and 3 more of triticales variety). Relative standard deviations for OTA in wines and spices were 9.2% and 6.9%, respectively, while that for AFB1 in wheat was 7.4%.

3.3. Analysis of agrifood samples

Different samples of wine (white, red and sweet) and spices (paprika, nutmeg, black pepper), purchased in local supermarkets, were analysed for their OTA content by the SUPRAS-RAM-ELISA method. Also, four varieties

of wheat were analysed by the same method for AFB1 content. Fortified samples were also subjected to the same procedure and the recoveries calculated. All the experiments were performed in triplicate. Table 8 shows the results obtained.

The concentration of OTA in wines produced in different regions in Spain were all below the detection limit, except for a sweet wine, although the concentration found ($0.65 \mu\text{gL}^{-1}$) was below the threshold limit set by the EU directive ($2.0 \mu\text{gL}^{-1}$). The concentration of OTA fit well with that obtained from the analysis of the same sample by LC/FL (see the LC chromatogram in Figure 1). Recoveries for wine fortified with $1 \mu\text{gL}^{-1}$ of OTA ranged in the interval 87-96% with relative standard deviations ranging from 4 to 8%.

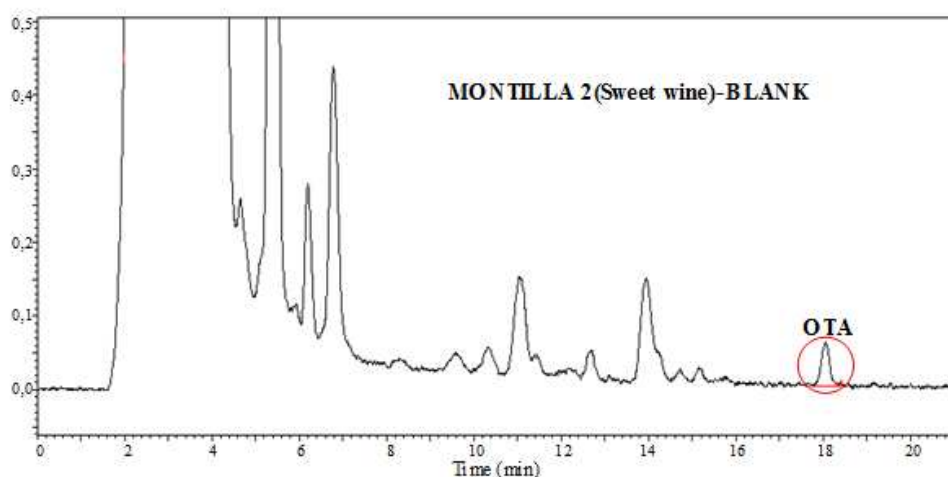


Figure 1. LC chromatogram obtained for a sample of sweet wine naturally contaminated with OTA.

OTA was detected in two out of three spices analysed (Table 8). The analysis of sample extracts by LC/FL was not sensitive enough for determining OTA at these concentrations, so we cannot compare both techniques. Recoveries ranged in the interval 84-93% with relative standard deviations ranging from 2 to 4%.

AFB1 was not detected in any of the wheat varieties analysed (i.e. triticum durum, triticum aestivum and two hybrids, tritordeum and triticales). Recoveries for samples fortified with 3.0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of AFB1 were between 85 and 93%, with standard deviations ranging from 2 to 4%.

CONCLUSIONS

SUPRAS-RAMs have proved to be a valuable strategy for sample cleanup of food prior to ELISA determination of mycotoxins. They offer a simple, fast and inexpensive alternative to sample treatments based on solvent extraction and IAC cleanup. The optimized procedure can be applied to a variety of liquid and solid food samples, encompassing a broad range of matrix compositions, so it can be considered a generalized sample treatment, which is highly desirable for its application in quality control laboratories. Accuracy was proved by comparison of the calibration curves obtained from solvent calibration and the standard addition method and analysing certified reference materials. Recoveries for spiked samples were between 84% and 96%. The sample treatment does not require special equipment, it is robust, and the synthesis of the solvent is spontaneous and to the everyone's reach.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MINECO (Project CTQ2014-53539R) and FEDER. S. García-Fonseca acknowledges the Spanish MEC the doctoral fellowship awarded (BES-2006-12643).

PARTE II

DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES BASADOS
EN VESÍCULAS DE ÁCIDOS
ALQUILCARBOXÍLICOS PARA EL CONTROL DE
LA CONTAMINACIÓN ACUÁTICA

PARTE II

CAPÍTULO 5

GREEN VESICULAR SUPRAMOLECULAR
SOLVENTS FOR SIMULTANEOUS REMOVAL OF
IONIC, POLAR AND HYDROPHOBIC ORGANIC
POLLUTANTS IN WASTEWATER.

**Green Vesicular Supramolecular Solvents for Simultaneous Removal of Ionic,
Polar and Hydrophobic Organic Pollutants in Wastewater**

Enviado a publicar en (2016)

Sergio García-Fonseca, Noelia Caballero-Casero, Loreto Lunar, Soledad
Rubio

Abstract

Wastewaters treatment continues to be challenging because the removal of the different types of pollutants they contain requires different technologies and therefore large investment in infrastructures and long processing times. Here, we report green supramolecular solvents (SUPRASs) able to simultaneously and efficiently extract ionic, polar and hydrophobic organic compounds. They were synthesized by spontaneous self-assembly and coacervation of mixtures of alcanoic acids and alcanoates, induced by tetraalkylammonium ions. The SUPRASs were characterized by SEM, TEM and FF-TEM and consisted of large unilamellar vesicular aggregates bridged by tetraalkylammonium ions via hydrophobic interactions between their alkyl chains. Different sites and mechanisms of interactions were offered by SUPRASs for the simultaneous solubilization of anionic and cationic dyes and PAHs. The length of the alkyl chain of the ammonium ions influenced both the physical properties and ability of removal of pollutants of SUPRASs. Variables influencing the extraction of efficiency of SUPRASs were

investigated. Overall, its facile and green synthesis, efficient extraction performance indicate that vesicular SUPRASs have potential for practical applications in integrative and efficient treatment of coexistent toxic pollutants.

INTRODUCTION

Water treatment technologies based on the design and application of engineered nanomaterials (e.g. zero-valent iron¹, carbon nanotubes², graphene³, titanium dioxide⁴, dendrimers⁵, cyclodextrin polymers⁶, cellulose⁷, magnetic nanoparticles⁸, etc.) have proved unique features compared to the conventional ones^{9,10}. Interesting emerging applications have been developed based on nanomembranes and nanosized adsorbents, mainly because of their potential to remove multiple pollutants in a single process¹¹. However, specific

¹ Mueller, N. C.; Braun, J.; Bruns, J.; Cernik, M.; Rissing, P.; Rickerby, D.; Nowack, B. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2012, 19, 550-558.

² Yang, K.; Wu, W.; Jing, Q.; Jiang, W.; Xing, B. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44, 3021-3027.

³ Shen, Y.; Chen, B. *Sci. Technol.* 2015, 49, 7364-7372.

⁴ Paramasivam, I.; Jha, H.; Liu, N.; Schmuki, P. *Small* 2012, 8, 3073-3103.

⁵ DeFever, R. S.; Geitner, N. K.; Bhattacharya, P.; Ding, F.; Ke, P. C.; Sarupria, S. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 4490-4497.

⁶ Zhao, F.; Repo, E.; Yin, D.; Meng, Y.; Jafari, S.; Sillanpaa, M. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 10570-10580.

⁷ Carpenter, A. W.; de Lannoy, C.-F.; Wiesner, M. R. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 5277-5287.

⁸ Zhu, J.; Wei, S.; Chen, M.; Gu, H.; Rapole, S. B.; Pallavkar, S.; Ho, T. C.; Hopper, J.; Guo, Z. *Adv. Powder Technol.* 2013, 24, 459-467.

⁹ Ghasemzadeh, G.; Momenpour, M.; Omidi, F.; Hosseini, M. R.; Ahani, M.; Barzegari, A. *Front. Env. Sci. Eng.* 2014, 8, 471-482.

¹⁰ Soler, L.; Sanchez, S. *Nanoscale* 2014, 6, 7175-7182.

¹¹ Das, S.; Sen, B.; Debnath, N. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2015, 22, 18333-18344.

issues (e.g. membrane fouling and high energy consumption in membrane operation^{12,13}) and general concerns (e.g. environmental, health and safety risks^{14,15,16}) have limited the use of engineered nanomaterials in field-scale applications¹⁷.

Engineered nanosystems for water purification have mostly involved nanostructured solids and little attention has been given to the design and synthesis of nanostructured solvents for this application. Nanostructured or supramolecular solvents (also named cloud point extraction (CPE), coacervate, L₃, anomalous and sponge phases¹⁸) are produced by spontaneous and reversible self-assembly and coacervation of amphiphilic molecules in aqueous or hydro-organic solutions¹⁹. Self-assembly allows the energyless synthesis of SUPRASs and provides an invaluable bottom-up approach for the obtaining of the ordered structures in the solvent²⁰. Coacervation (viz. the separation of colloidal systems into two liquid phases, colloid-rich and colloid-poor, which are in equilibrium²¹) has been long known in colloidal science¹⁸

¹² Fane, A. G.; Wang, R.; Hu, M. X. *Angew. Chem. Int. Edit.* 2015, 54, 3368-3386.

¹³ Pendergast, M. M.; Hoek, E. M. V. *Energ. Environ. Sci.* 2011, 4, 1946-1971.

¹⁴ Maynard, A. D. *Nat. Nanotechnol.* 2014, 9, 159-160.

¹⁵ Batley, G. E.; Kirby, J. K.; McLaughlin, M. J. *Accounts Chem. Res.* 2013, 46, 854-862.

¹⁶ Linkov, I.; Bates, M. E.; Canis, L. J.; Seager, T. P.; Keisler, J. M. *Nat. Nanotechnol.* 2011, 6, 784-787.

¹⁷ Bates, M. E.; Grieger, K. D.; Trump, B. D.; Keisler, J. M.; Plourde, K. J.; Linkov, I. *Environ. Sci. Technol.* 2016, 50, 349-358.

¹⁸ Evans, F.; Vennerström, H. *The colloidal domain. Where physics, chemistry, biology, and technology meet*; 2nd, ed.; Wiley-VCH: New York, U.S., 1999.

¹⁹ Ballesteros-Gomez, A.; Dolores Sicilia, M.; Rubio, S. *Anal. Chim. Acta* 2010, 677, 108-130.

²⁰ Steed, J.W.; Turner, R.D.; Wallace, K.J. *Core concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*; John Wiley&Sons: Chichester, England, 2007.

²¹ IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1997.

and constitutes a well implemented bottom-up approach for the production of nanocapsules to entrap bioactive compounds²². Supramolecular assemblies (e.g. aqueous and reversed micelles, vesicles, etc) have been reported to undergo coacervation, which can be induced by agents such as the temperature, electrolytes, pH, a non-solvent for the colloid, etc²³.

Application of SUPRASs to water purification has almost invariably been based on the coacervation of micellar solutions of nonionic surfactants (alcohol and alkylphenol polyethoxylates) induced by heating²⁴. Efficient removal of dyes (e.g. direct yellow²⁵, reactive blue²⁶, eosin²⁷, malachite green^{28,29}, chrysoidine³⁰, etc.), humic acids³¹, and phenol, benzyl alcohol, cutting oils, silk-screen printing oils²⁴, etc, has been obtained by extraction with polyethoxylate-rich liquid phases. SUPRASs have unique properties that render them promising nanosystems for water purification, but great efforts

²² Ezhilarasi, P. N.; Karthik, P.; Chhanwal, N.; Anandharamakrishnan, C. *Food Bioprocess Tech.* 2013, 6, 628-647.

²³ Pramauro, E.; Pelezetti, E. *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media.* Volume XXXI of Weber, S.G., Ed. *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, 1996.

²⁴ Haddou, B.; et al. Use of cloud point extraction with ethoxylated surfactants for organic pollution removal. In *The role of colloidal systems in environmental protection*, Monzer Fanun, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2014.

²⁵ Tatara, E.; Materna, K.; Schaadt, A.; Bart, H. J.; Szymanowski, J. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 3110-3115.

²⁶ Melo, R. P. F.; Barros Neto, E. L.; Moura, M. C. P. A.; Castro Dantas, T. N.; Dantas Neto, A. A.; Oliveira, H. N. M. *Sep. Purif. Technol.* 2014, 138, 71-76.

²⁷ Purkait, M. K.; Banerjee, S.; Mewara, S.; DasGupta, S.; De, S. *Water Res.* 2005, 39, 3885-3890.

²⁸ Pourreza, N.; Elhami, S. *Environ.Chem. Lett.* 2010, 8, 53-57.

²⁹ Chen, J.; Mao, J.; Mo, X.; Hang, J.; Yang, M. *Colloids Surf. A* 2009, 345, 231-236.

³⁰ Purkait, M. K.; DasGupta, S.; De, S. *J. Hazard. Mater.* 2006, 137 (2), 827-835.

³¹ Ghouasa, H.; Haddoua, B.; Kamechea, M.; Derrichea, Z.; Gourdonb, C. *J. Hazard. Mater.* 2012, 205– 206, 171– 178.

to design and synthesize engineered SUPRAS intended to surpass current limitations have to be conducted.

One unique property of SUPRASs is the different polarity regions existing in the ordered structures in which the amphiphiles self-organize, that providing distinct microenvironments for the simultaneous solubilization of a wide polarity range of pollutants. Also valuable is the high concentration of amphiphiles in the SUPRAS, usually in the range 0.1-1 mg/ μ L¹⁹, that giving multiple sites for pollutant binding and as a result high extraction efficiencies using small solvent volumes. From a practical point of view, it is valuable the ease with which SUPRASs can be produced (i.e. natural and synthetic amphiphiles are commercially available at low cost and the synthetic procedures are energyless, spontaneous and within everyone's reach), their non-volatility and non-flammability, which permits safer treatments, and the possibility of scaling up the extraction processes^{25,32}.

Major limitations of the SUPRAS made up of polyethoxylated surfactants in their application to water purification have been related to the high temperature required for operation (e.g. 75-90 °C)²⁵⁻³⁰, the high concentration of salt (0.2-1M) needed to enhance extraction efficiencies for polar and medium polar pollutants²⁴⁻³¹, and the loss of surfactant in the treated water. This loss occurs because the ordered structures in the SUPRAS are dynamic entities in equilibrium with surfactant monomers, at the critical micelle concentration (cmc), in the aqueous phase. These equilibria are

³² Trakultamapatam, P.; Scamehorn, J. F.; Osuwan, S. *Sep. Sci. Technol.* 2004, 39, 501-516.

reversible and environment-responsive and they are influenced by variables such as the temperature, type and concentration of electrolytes, etc¹⁸. Some polyethoxylated compounds such as the alkylphenols, that have been the surfactants most investigated so far for water purification²⁴⁻³¹, are toxic and should be removed from the treated water once the pollutants have been extracted.

In this manuscript, we aimed to develop green, less environment-responsive and multifunctional SUPRASs able to efficiently extract, at room temperature, the most common types of pollutants in wastewater. They were spontaneously synthesized from aqueous vesicular solutions of mixtures of alkanolic acids and alkanooates using tetrabutyl-, tetrapentil- and tetrahexil-ammonium as coacervating agents. Increase of the kinetic stability of the nanostructures in the SUPRASs was sought in order to make self-assembly less environment-responsive. It was tried by bringing together two strategies; using vesicles as the supramolecular assemblies for coacervation, and involving the strongest types of non-covalent interactions (e.g. ionic and hydrogen bonds), in addition to the van der Waals interactions and hydrophobic effects, as the driving forces for nanostructure formation. These SUPRASs offer multiple interactions (e.g. ionic, dipolar, hydrogen bond, cation- π interactions and van der Waals) for pollutant solubilization and thus they have the potential to be multifunctional. A number of anionic and cationic dyes (Figure 1 and 2) and PAHs (anthracene and benzo[α]pyrene) were selected as model pollutants to study the removal effects and mechanisms of solubilization of the tailored SUPRASs.

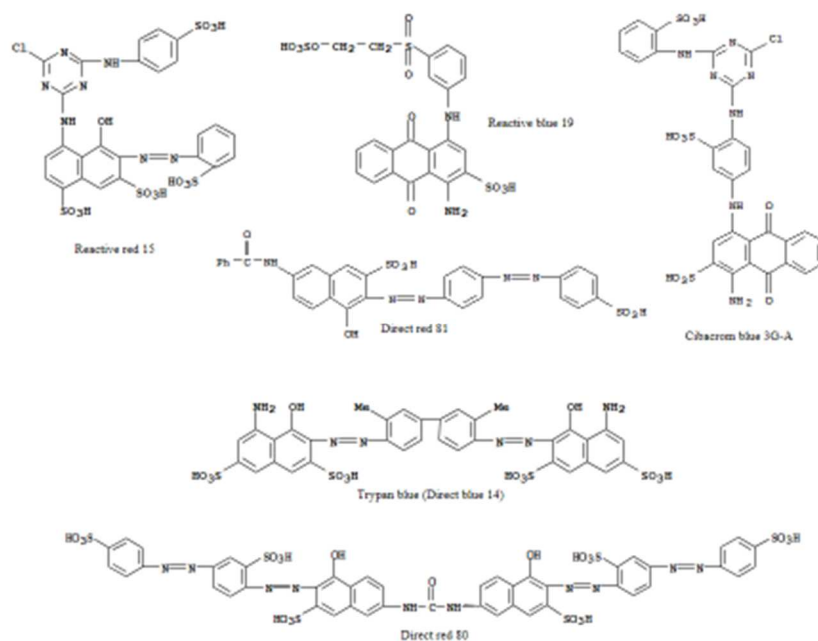


Figure 1. Chemical structures of anionic dyes selected as model pollutants

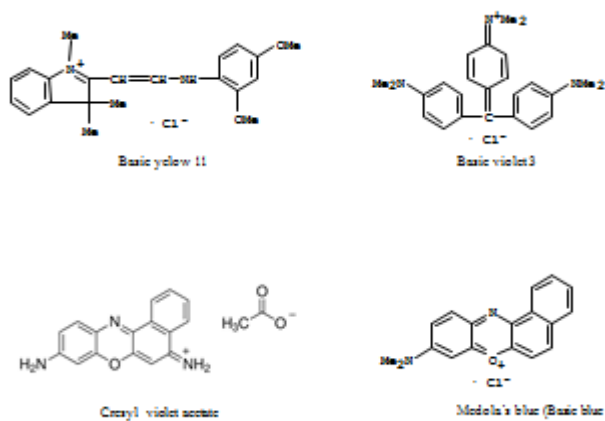


Figure 2. Chemical structures of cationic dyes selected as model pollutants

Dyes are widely used in dyestuffs, textile, paper and plastics industries. There are more than 100.000 kinds of commercially available dyes and over

7×10^5 tons are produced annually³³. The total dye consumption in the textile industry worldwide is more than 10,000 tons/year and approximately 100 tons/year of dyes is discharged into water streams³⁴. The anionic dyes more extensively used belong to the direct and reactive classes while all the cationic ones are classified as basic dyes. Reactive dyes are extensively used in the textile industry, fundamentally due to the capacity of their reactive groups to bind on fibres by formation of covalent bonds. These dyes represent an important fraction of the commercialized synthetic pigments used (approximately 12% of the worldwide production)³⁴. Direct dyes have higher molecular weight than reactive ones and they bind on fibre by hydrogen bonding, although ionic interactions are also possible. The primary mechanism of staining of cationic dyes is also by ionic bonding. Given that both anionic and cationic simultaneously exist in the equalization tank of a dye-house, it is of fundamental importance to remove both of them. On the other hand, dyes are also classified according to their chemical structure; the most common group being the azo type, which makes up to 60-70 % of all the textile dyes produced, followed by the anthraquinone type³³. We selected several azo (reactive red 15, trypan blue, direct red 81 and direct red 80) and anthraquinone (cibacrom blue 3G-A and reactive blue 19) dyes for our studies (Figure 1). Also we selected four cationic dyes corresponding to three chemical classes, cyanide (basic yellow 11), arylmethane (basic violet 3) and benzo(a)phenoxazinium (medola 's blue and cresyl violet acetate) (Figure 2).

³³ Kyzas, G.Z.; Kostoglou, M. *Materials*. 2014, 7, 333-364.

³⁴ Yagub, M. T.; Sen, T.K.; Afroze, S.; Ang, H.M. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014, 209, 172-184.

In the following sections, we will describe the experimental results showing the structures of the SUPRASs obtained by TEM, SEM and FF-TEM and demonstrating its removal effects and mechanisms toward various pollutants.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All chemicals were of analytical-reagent grade and employed as supplied. Octanoic acid (caprylic) (C8) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Decanoic (capric) (C10) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH; 40% in water), Tetrapentylammonium hydroxide (TPAOH; 20% in water), Tetrahexylammonium hydroxide (THAOH; 40% in water) were obtained from Sigma-Aldrich. Sodium Chloride, sodium hydroxide and calcium chloride were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). The different dyes investigated were obtained from Sigma-Aldrich (basic yellow 11, CAS 4208-80-4; basic violet 3, CAS 548-62-9; cresyl violet acetate, CAS 10510-54-0; medola's blue, CAS 7057-57-0; reactive red 15, CAS 12238-01-6; cibacrom blue 3G-A, CAS 84166-13-2; reactive blue 19, CAS 2580-78-1 and direct red 81, CAS 2610-11-9) and Fluka (trypan blue, CAS 72-57-1 and direct red 80, CAS 2610-10-8). Stock solutions of these dyes of concentration 500 mg/L (except for basic yellow 11, 200 mg L⁻¹) were prepared in desionised water. These solutions were stable at least for two weeks. Ochratoxin A (OTA) was

obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). A stock standard solution of 10 mgL⁻¹ of OTA was prepared in methanol and stored under dark conditions at -20 °C. Working solutions were prepared by dilution of the stock solution with methanol. Benzo(a)pyrene (BaP) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), while anthracene was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Stock standard solutions containing individual PAHs at a concentration of 100 mg L⁻¹ were prepared in acetonitrile and stored under dark conditions at 4°C. Working solutions containing a mixture of PAHs were made by appropriate dilutions of the stock solutions with acetonitrile. The pesticide difenzoquat methyl sulfate was obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). A stock standard solution of 10 mg L⁻¹ of difenzoquat was prepared in acetonitrile and stored under dark conditions at -20 °C. Working solutions were prepared by dilution of the stock solution with acetonitrile.

Synthesis of supramolecular solvents

We need an alkanolic acid/alkanoate/tetralkylammonium molar ratio of 1:1:1 for synthesis of vesicular SUPRASs. Therefore, we should add twice molar amount of alkanolic acid relative to tetralkylammonium hydroxide, so that half of alkanolic acid is neutralized.

SUPRASs were synthesized by adding, in order and at proper amounts, the following reagents: alkanolic acid, distilled water and, finally, tetralkylammonium hydroxide. The mixtures, in 10 mL-glass centrifuge tubes, were centrifuged for 10 min at 3500 rpm. Then, tubes were gently shaken by

hand and centrifuged again. These steps should be repeated until we obtain two clear phases.

Phase diagrams

Phase diagrams which represent the colloidal aggregates produced by the decanoic acid-decanoate system as a function of pH were built for each SUPRAS. Thus, 1 mmol of sodium decanoate was weighted in a centrifuge tube. Next, 1 mmol of tetralkylammonium hydroxide and water were added. The pH of the resultant mixture was above 12 for all cases. To build the phase diagram, very small amounts of hydrochloric acid (0.03-0.24 mmol) were added to the solution. Then, the pH was measured and annotations about appearance of the mixture were taken. Titration curves were built by representing the pH of the mixture versus the mole fraction of decanoic acid (α_{decanoic}).

Characterization

Scanning electron micrographs (SEM) were obtained using a modification of the malachite green fixation technique described by Ishii et al.³⁵. Briefly, pieces of filter paper (Whatman 2) were immersed in the vesicular SUPRAS and then removed rapidly. Vesicular SUPRAS adsorbed on the filter paper was fixed by immersion for 2 hours in 1%(v/v) glutaraldehyde and 1%(w/v) malachite green-mixed phosphate buffer solution (pH 7.4). After

³⁵ Ishii, F.; Takamura, A.; Ishigami Y. *Langmuir* 1995, 11, 483-486.

fixation, the SUPRAS was briefly washed in buffer solution and let it dry for 24 hours. The fixed SUPRAS were mounted on a sample stage with double-sided adhesive tape, vacuum coated with gold, and viewed in a JEOL JSM-6300 scanning electron microscope.

Transmission electron micrographs (TEM) were taken on a EM10C Carl Zeiss operated at 80 kV. Preparation of vesicular SUPRAS for negative staining was as follows. 50 μ L of SUPRAS was deposited on a copper grid coated with a formvar film and incubated for about 4 minutes. Then the grid was rinsed with ultrapure water (2 x 1 min) and the contrast agent (phosphotungstic acid 2%, pH 7.6) was added for 1 min. Finally the grid was wiped with filter paper and observed by TEM.

To visualize the vesicular SUPRAS by freeze-fracture technique with subsequent transmission electron microscopy, samples were frozen in melting nitrogen (about 63 K), freeze fractured at 173K and 5×10^{-6} bar in a BAF 060 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain) and shadowed with platinum carbon at an angle of 45°. Each replica were cleaned in water. After cleaning, the obtained replica were observed with a transmission electron microscope (JEM-2011, Jeol, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 80 kV.

Alkanoic/alkanoate amount incorporated to each type of vesicular SUPRAS was determined using liquid chromatography coupled to a diode-array detector (HPLC/DAD). Thus, equilibrium solutions after SUPRAS formation were analysed by HPLC/DAD. The liquid chromatographic system used consisted of a TermoQuest Spectra System (San Jose, CA, USA) furnished

with a P4000 quaternary pump, a SCM 1000 vacuum membrane degasser, an AS3000 autosampler and a UV6000 LP diode-array detector. The stationary-phase column was a Hypersil ODS C8 (5 μ m 150mm \times 4.6mm) from Analisis Vinicos (Tomelloso, Spain). The mobile phase used consisted of acetonitrile:water (55:45) at a flow rate of 1.3 mL min⁻¹. Calibrations were performed by injecting the proper alkanolic acid in methanol in the range 0.1–20 g L⁻¹. Alkanolic acid concentration was quantified by measuring the peak areas obtained at 210 nm.

Water content was measured with a coulometric Karl-Fisher titrator (KF 831model, Methrom, Herisau, Switzerland). An aliquot of SUPRAS (100 μ L) was weighted and dissolved in methanol (25 mL) and then it was submitted to titration. Experiments were made in triplicate for each SUPRAS.

Optimization of pollutant removal

A typical extraction procedure consisted in the mixture of a certain volume of SUPRAS and 10 mL of an aqueous solution containing the pollutants. The mixture was stirred for 5 min and then centrifuged for 15 min to accelerate phase separation. Next, the absorbance of the aqueous solution was measured, directly or after dilution in water, to determine the concentration of the remaining pollutant. Optimal conditions for the extraction of each pollutant were studied by changing each variable in turn while keeping the others constant.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization and Properties of Vesicular Supramolecular Solvents

Alkanoic acids form a variety of colloidal aggregates in aqueous solutions as a function of their protonation degree^{36,37}. Thus, alkanoates give micelles, mixtures of alkanoic acids and alkanoates produce vesicles (e.g. at the mole fraction of decanoic acid³⁶ $\alpha_{\text{decanoic}} = 0.12-0.75$) and alkanoic acids precipitate or give a water immiscible oil phase depending on the nature of the alkanoic acid (solid or liquid, respectively). The exchange process of a surfactant molecule between the vesicle and the equilibrium solution takes much longer (viz. hours or days) than for micelles (viz. from nanoseconds to microseconds)^{36,38}, so the former are expected to produce more kinetically stable SUPRASs. On the other hand, the concentration of non-associated monomers in equilibrium with vesicles (critical vesicular concentration, *cvc*) is usually between 5-10 times lower than for monomers in equilibrium with micelles (*cmc*)^{36,37}.

We have previously reported the synthesis of SUPRASs from vesicular solutions of mixtures of alkanoic acids (C₈-C₁₈) and alkanoates using tetrabutyl ammonium as the coacervating agent³⁹. The kinetic stability of these SUPRASs

³⁶ Morigaki, K.; Walde, P.; Misran, M.; Robinson, B. H. *Colloids Surf. A* 2003, 213, 37-44.

³⁷ Morigaki, K.; Walde, P. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2007, 12, 75-80.

³⁸ Patist, A.; Kanicky, J. R.; Shukla, P. K.; Shah, D. O. J. *Colloid Interface Sci.* 2002, 245, 1-15.

³⁹ Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. Tetrabutylammonium-induced coacervation in vesicular solutions of alkyl carboxylic acids for the extraction of organic compounds. *Anal. Chem.* 2006, 78, 7229-7239.

was enough to be used in single-drop microextraction of pollutants prior to their chemical analysis⁴⁰. Thus, a SUPRAS drop (30 μ L) could be applied to the direct extraction of chlorophenols from 30 mL of wastewater, groundwater and superficial water, and this opens the door to their application in water purification. We proved that these assemblies were vesicular but the role of tetrabutyl ammonium in stabilizing them was not elucidated. Although alkanolic acids/alkanoates are harmless, and these SUPRASs are considered green solvents, their solubility in water (e.g. around 2 g/L for SUPRASs made up of decanoic acid/decanoate³⁹) should decrease in order to reduce to a minimum the loss of amphiphile during water treatment.

Here we synthesized SUPRASs from alkanolic acids and alkanoates by tetraalkyl (butyl, pentyl and hexyl) ammonium-induced self-assembly and we studied the role of the coacervating agent in the kinetic stability and properties of the nanostructured liquid phases produced as well as their applicability to the removal of ionic and neutral organic compounds and metals from different water systems. The decanoic acid-decanoate system was selected as a model for most of these studies and only SUPRAS formed at room temperature were considered. According to the structure of the reagents involved, the binding forces driving their self-assembly should be multiple (viz. multimediated assembly²⁰) and they should involve a wide range of interaction energies, namely 200-300 KJ/mol for ion-ion (viz. carboxylate-ammonium); 4-120 KJ/mol for hydrogen bonding (viz. carboxylic acid-

⁴⁰ López-Jiménez, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography. Theoretical and practical considerations. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1195, 25-33.

carboxylate); and <5 KJ/mol for van der Waals interactions (viz. between the hydrocarbon chains of the amphiphile). The fact that the strength of ionic interactions are comparable with covalent interactions (150-450 KJ/mol) and that all the interactions involved in these self-assembly processes can work in a cooperative manner, should lead to the formation of very stable supramolecular assemblies.

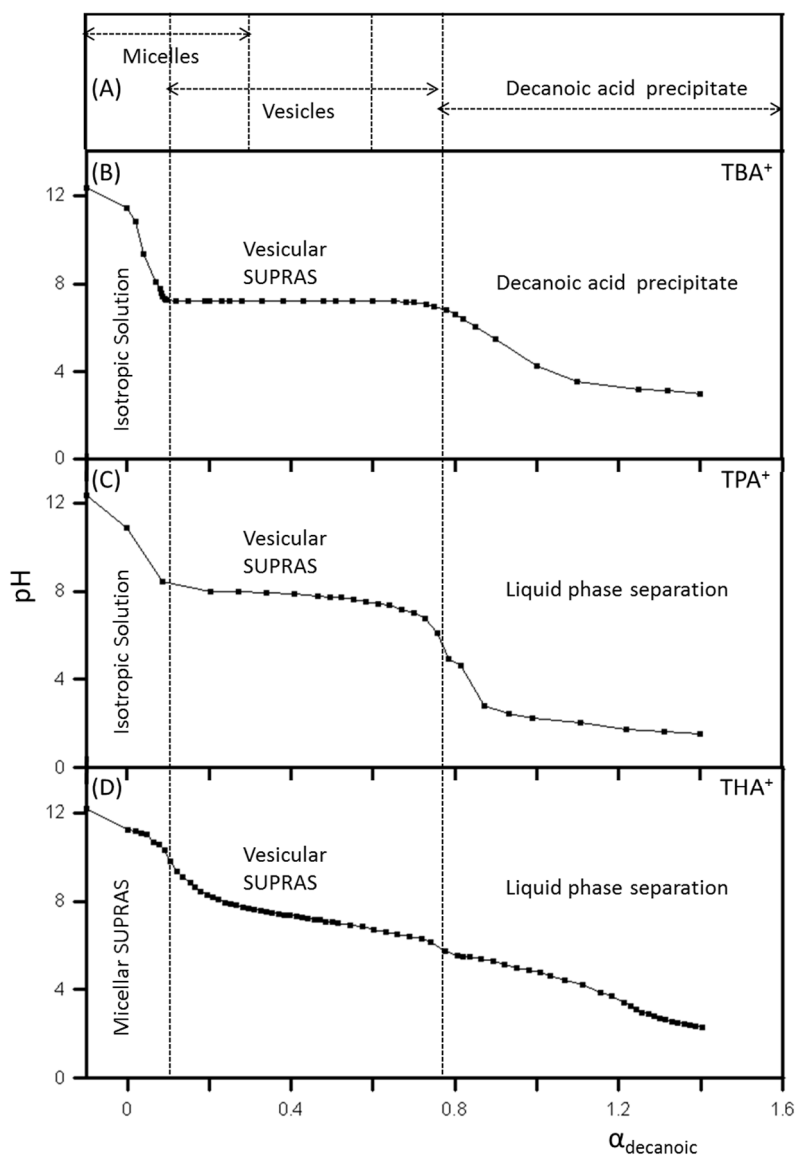


Figure 3. Titration curves for 0.1 M mixtures of (B) decanoate and tetrabutyl ammonium hydroxide; (C) decanoate and tetrapentyl ammonium hydroxide and (D) decanoate and tetrahexyl ammonium hydroxide. Hydrochloric acid 1 M was used as the titration agent. The regions for the formation of micelles, vesicles and insolubilized decanoic acid in water³⁵ are given in (A).

Figure 3 (B-D) shows the curves obtained for the titration of equimolar mixtures of decanoate and tetraalkyl ammonium hydroxides (TBAOH,

TPAOH, THAOH) with hydrochloric acid. The colloidal aggregates produced by the decanoic acid-decanoate system as a function of pH³⁶ were also represented in Fig. 3A to help discussion. Three regions were always observed in the titration curves according to the values of the mole fraction of decanoic acid (α_{decanoic}). The boundaries for these regions were roughly similar for the three coacervating agents (TBA⁺, TPA⁺ and THA⁺) and they approximately agreed with those for the decanoic acid-decanoate system in aqueous solution (Figure 3).

Vesicular SUPRASs were the most thermodynamically stable assemblies for values of α_{decanoic} in the interval around 0.1-0.75. The pH for the equilibrium solutions in this interval ranged from 7.75 to 7.20 for TBA⁺, from 8.91 to 6.08 for TPA⁺ and from 9.82 to 6.13 for THA⁺. The pH range for the formation of the SUPRASs widened with increased hydrocarbon chain length of the tetraalkyl ammonium salt, so the structure of the coacervating agent influenced the stability of the supramolecular assemblies produced. A lot of strategies have been previously reported to extend the pH range at which aqueous vesicles form (e.g. pH 6.4-7.8 for decanoic acid-decanoate), including the addition of linear alcohols, surfactants with sulfate or sulfonate groups, etc.³⁷ Our results prove that the pH for formation of vesicular SUPRAS from common vesicular solutions (e.g. decanoic acid-decanoate) can be also extended by proper selection of the coacervating agent. The enhanced stability provided by THA⁺ also resulted in decreased solubility of the SUPRASs in water (e.g. 2, 0.6 and 0.03 g/L for SUPRASs produced from $\alpha_{\text{decanoic}} = 0.5$ and TBA⁺, TPA⁺ and THA⁺, respectively).

Micellar solutions of decanoate ($\alpha_{\text{decanoic}} < 0.1$) only coacervated in the presence of THA^+ (Figure 3, B-D). It has been previously reported that tetrabutylammonium alkyl (C_{12} - C_{28}) carboxylate surfactants form very small micelles that do not coacervate^{41,42}, in contrast to TBA alkylsulfates,^{42,43} and the same results were found here for tetrabutyl- and tetrapentyl-ammonium decanoate. The self-association behavior of carboxylate surfactants with TBA^+ counterions was explained on the basis of the large size and the hydrophobicity of the TBA^+ ions. In our study, only THA^+ was able to produce phase separation of decanoate micelles, which occurred at room temperature. So, coacervation was essentially produced thanks to the higher hydrophobicity of THA^+ compared to TBA^+ and TPA^+ . The hydrophobicity of the ammonium counterions was also the reason for the different behavior found in aqueous solutions of decanoic acid. At values of $\alpha_{\text{decanoic}} > 0.75$ - 0.8 , decanoic acid precipitated in the presence of TBACl but underwent phase separation in the presence of TPACl and THACl .

Vesicular SUPRASs were selected for further studies because of the reasons given above. The coacervation of vesicles of decanoic acid-decanoate, induced by $\text{TBA}^+/\text{TPA}^+/\text{THA}^+$ appeared to be due to the neutralization of the anionic charge of the carboxylate in the surface of the aggregates and the formation of bridges of tetraalkyl ammonium between these aggregates. Because of the geometric constraint makes it difficult for all the four alkyl

⁴¹ Zana, R. *Langmuir*, 2004, 20, 5666-5668.

⁴² Zana, R.; Schmidt, J.; Talmon, Y. *Langmuir*, 2005, 21, 11628-11636.

⁴³ Din, D.; Sharma, D.; Khan, Z.A.; Aswal, V.K.; Kumar, S. J. *Colloid Interface Sci.* 2006, 302, 315-321.

chains to penetrate into the aggregate core, two directions may be chosen for bending these alkyl chains: one is toward the water phase and the other towards the core of the aggregate. The alkyl chains toward the water phase may have the chance to interact with the alkyl chains of other counterions attached to other aggregates. As a consequence, the vesicles may experience closer contact and may be responsible for the coacervation.

The volume of vesicular SUPRAS obtained from aqueous solutions at the mole fraction $\alpha_{\text{decanoic}} = 0.5$ and decanoate:tetraalkylammonium molar ratio = 1, linearly depended on the amount of decanoic acid+decanoate and the molecular weight of the tetraalkylammonium ion (Fig. 4, A and B), which indicated that the composition of the SUPRAS, for a given amphiphile-coacervating agent proportion, kept constant. The volume of SUPRAS linearly decreased as the value of α_{decanoic} decreased for decanoate:tetraalkylammonium molar ratios =1 and constant amount of decanoic acid+decanoate (Figure 4C), which means that the composition of the SUPRAS varied.

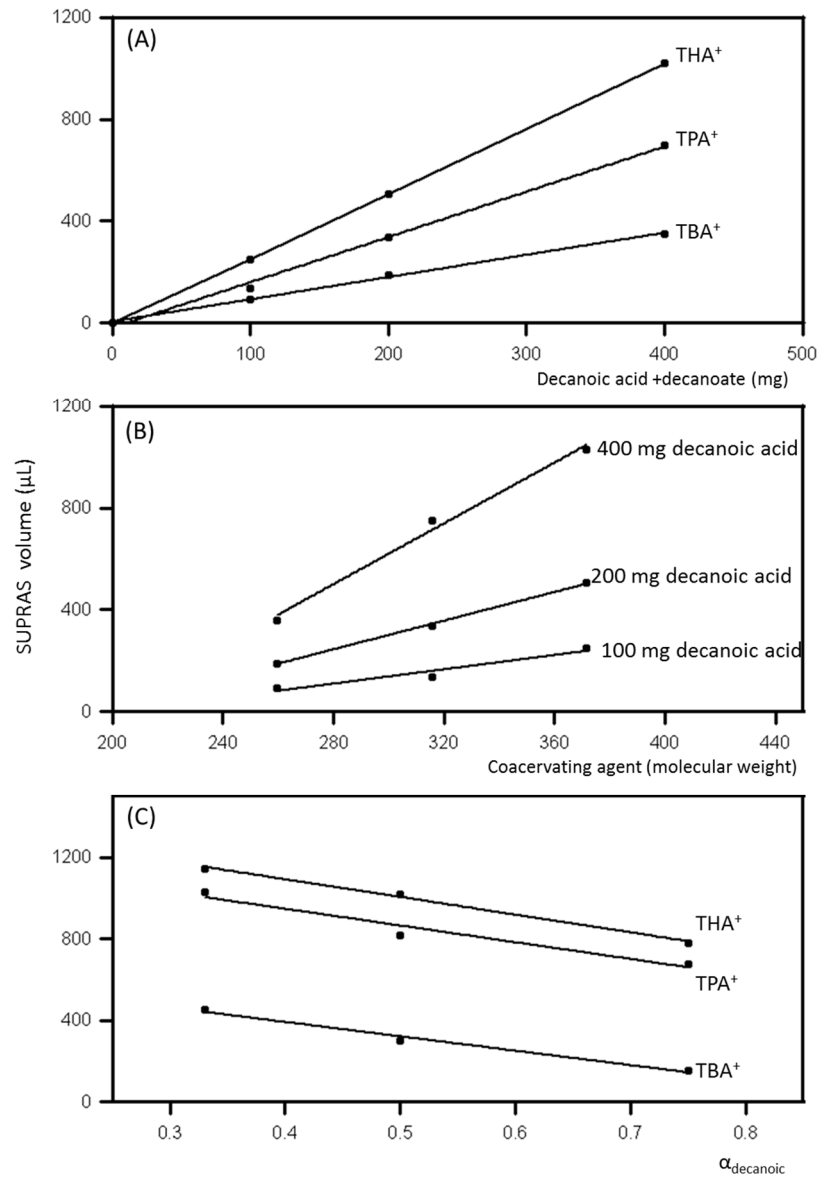


Figure 4. Dependence of the volume of SUPRAS obtained as a function of (A) amount of decanoic acid + decanoate; (B) the molecular weight of the coacervating agent, and (C) α_{decanoic} .

The molar composition found for SUPRASs (amphiphile:coacervating agent:water), under the conditions of maximum stability for vesicles ($\alpha_{\text{decanoic}} = 0.5$, decanoate:tetraalkylammonium molar ratio = 1), was 7:1:10, 2.5:1:10 and

2.5:1:10 for TBA, TPA and THA, respectively. Considering that tetraalkylammonium ions only accommodate in the outer surface of the vesicles, the approximate calculations indeed suggest the existence of a second outer layer of bound TXA⁺ around the vesicles. The intervesicular interaction may therefore be mediated by TXA⁺ ions located in this second layer and/or by TXA⁺ ions bound to this layer and thus still farther out in the solution. Multiple bridging will increase until the occurrence of phase separation.

Solvent properties of SUPRASs such as density, viscosity and surface tension were assessed. All the studies were carried out under the following conditions: $\alpha_{\text{decanoic}} = 0.5$, decanoate:tetraalkyl ammonium molar ratio = 1. The density was 0.919, 0.907, 0.898 g/mL for SUPRASs induced by TBA⁺, TPA⁺ and THA⁺ ions, respectively. So, they separated from the bulk solution as a layer in the surface which will make easier water treatment. The values for the surface tension were 0.0315, 0.0333 y 0.0322 N/m for SUPRASs produced from TBA⁺, TPA⁺ and THA⁺ ions, respectively. Considering that the value of surface tension for the liquid decanoic acid (40°C) is 0.0331 N/m, this reflex the high concentration of surfactant in the coacervative phases and their capabilities to reduce the surface tension of water. These values are about 2.2 times lower than the water one (0.0728 N/m). All the vesicular SUPRASs had high dynamic viscosity (97.5, 121.5 y 143 mPa·s for SUPRASs synthesized from TBA⁺, TPA⁺ and THA⁺ ions, respectively) compared to that of decanoic acid (4.95 mPa·s). All the SUPRASs were stable at temperatures in the range 4-70 °C, and in the presence of NaCl at concentrations in the interval 0.1-1 M.

One of the factors that have limited the application of aqueous fatty acid vesicles is their sensitivity with respect to the presence of counter ions. For example, divalent cations such as Ca^{2+} or Mg^{2+} cause precipitation of vesicles at the concentrations they are found in surface waters. We evaluated the effect of these ions on the different SUPRASs synthesized under the following conditions: $\alpha_{\text{decanoic}} = 0.5$, decanoate:tetraalkyl ammonium molar ratio = 1. All the SUPRASs precipitated in the presence of a mixture of Ca^{2+} and Mg^{2+} at the maximum concentrations they are usually found in sea water (0.5 g/L Ca^{2+} and 1.4 g/L Mg^{2+}). In order to remove this interference, SUPRASs were synthesized in the same way as usual but in the presence of different amounts of ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA/C10 molar ratios in the range 0.3-0.9). EDTA incorporated to the structure of the SUPRAS as it was suggested by the progressive increase in the volume of solvent obtained as the amount of EDTA raised. Stable SUPRAS were obtained for EDTA/C10 molar ratios around 0.9, 0.7 and 0.5 for TBA, TPA and THA⁺.

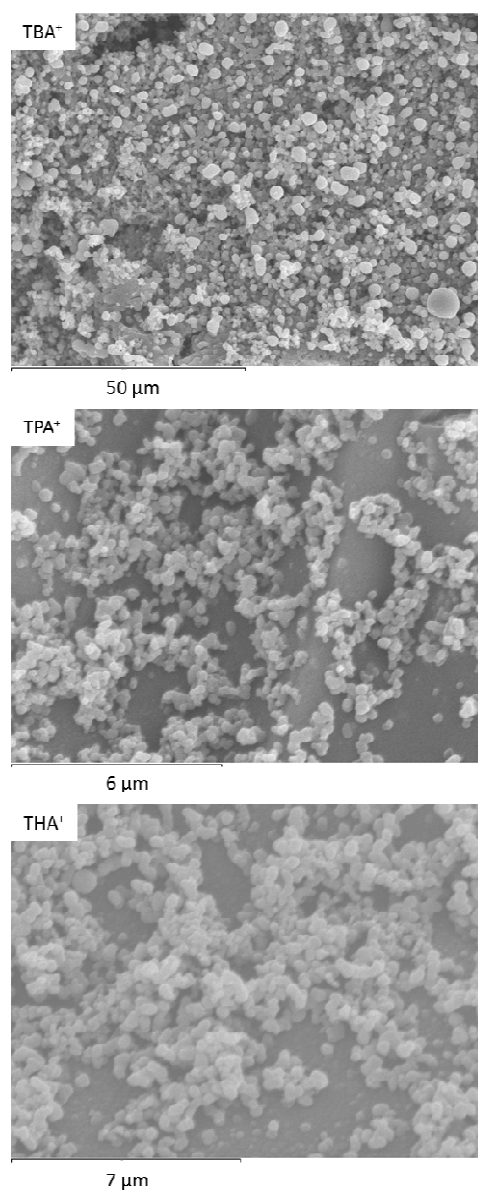


Figure 5. SEM imaging of SUPRASs synthesized from α decanoic = 0.5 and decanoate:alkylammonium molar ratio = 1, induced by TBA, TPA and THA ions.

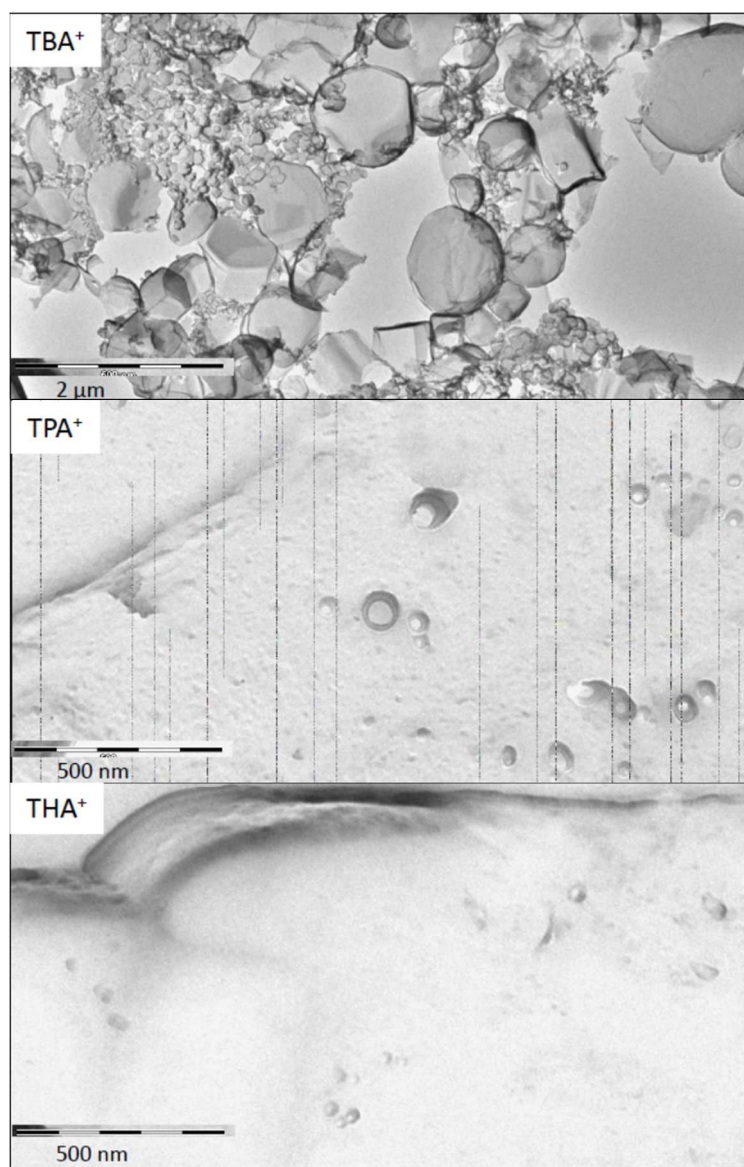


Figure 6. FF-TEM imaging of SUPRASs synthesized from α decanoic = 0.5 and decanoate:alkylammonium molar ratio = 1, induced by TBA, TPA and THA ions.

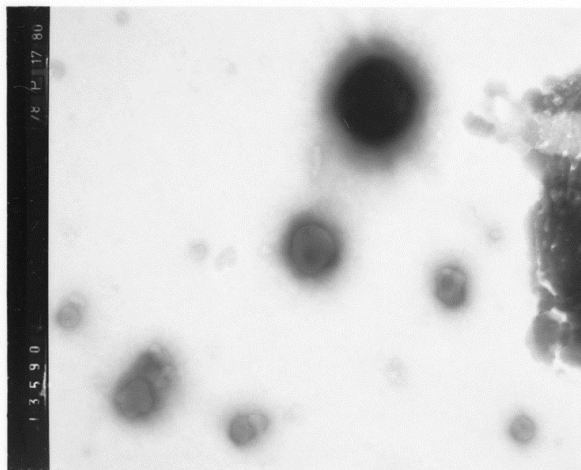


Figure 7. TEM imaging of SUPRASs synthesized from α decanoic = 0.5 and decanoate:alkylammonium molar ratio = 1, induced by TBA ions.

Elucidation of the structure of the SUPRASs ($\alpha_{\text{decanoic}} = 0.5$, decanoate:tetraalkyl ammonium molar ratio = 1) was tried using scanning electron microscopy (SEM) and freeze-fracture transmission electron microscopy (FF-TEM). Figures 5 and 6 show representative results obtained from SEM and FF-TEM. SUPRASs were made up of large unilamellar vesicles, as it can be seen by FF-TEM. Some experiments carried out with TEM also showed the presence of these types of vesicles (e.g. Figure 7 for SUPRASs induced by TBA⁺). The coacervating agent was essential for determining the size and dispersity of vesicles. Thus, SUPRASs synthesized from TBA⁺ consisted of vesicles in a wide range of sizes (e.g. around 100 nm–3 μm) while those produced from TPA⁺ and THA⁺ were smaller and less poly disperse (e.g. 30–400 nm).

Extraction efficiency

The ability of vesicular SUPRASs to remove ionic, and nonpolar toxic pollutants in wastewater was investigated. Pollutants considered in the different studies here included were anionic and cationic dyes and PAHs. First, their removal efficiency was investigated at two fractional SUPRAS volumes (Table 1).

Table 1. Percentages of removal for anionic, cationic dyes and neutral pollutants using SUPRASs produced from different tetraalkyl ammonium salts at different fractional solvent volumes

Pollutant	Coacervating agent	Fractional SUPRAS volume	
		0.01	0.1
^a Trypan Blue	TBA ⁺	13±1	16±1
	TPA ⁺	98±2	99±3
	THA ⁺	94±3	97±2
^a Basic Violet 3	TBA ⁺	98±3	98±1
	TPA ⁺	86±2	99±3
	THA ⁺	57±1	87±2
^b Anthracene	TBA ⁺	99±2	102±3
	TPA ⁺	101±1	99±2
	THA ⁺	98±3	99±1
^c Benzo[α]pyrene	TBA ⁺	98±2	99±3
	TPA ⁺	97±3	102±1
	THA ⁺	101±2	103±2

$\alpha_{\text{decanoic}} = 0.5$, decanoate:tetraalkylammonium molar ratio = 1; room temperature; extraction time: 5 min; stirring rate: 800 rpm; concentration of pollutants: ^a200 mg/L; ^b0.15 $\mu\text{g/L}$; ^c 0.1 $\mu\text{g/L}$

Trypan Blue and Basic Violet 3 were selected as models for anionic and cationic dyes, respectively, while anthracene and benzo[α]pyrene were selected as representative of PAHs. The results obtained showed the complete

removal of the two PAHs, at the two fractional volumes investigated, by the three types of SUPRAS under study. These results were in agreement with the fact that PAHs are expected to solubilize in the hydrophobic region of the vesicular aggregates which should be very similar, independently of the tetraalkyl ammonium ion used for coacervation. Contrarily, the percentage of removal of anionic and cationic dyes strongly depended on the coacervating agent used. Thus, extraction of anionic dyes was poor in SUPRASs synthesized from TBA⁺ and practically quantitative as the hydrophobicity of the coacervating agent increased. This behavior suggests that anionic dyes were preferentially solubilized through ionic and hydrophobic interactions in the TXA ions bringing the vesicular aggregates. As the hydrophobicity increased also anionic dye retention did. We carried out additional experiments involving the extraction of organic compounds bearing anionic functional groups different to those of dyes (viz. sulfonic groups) and the results were similar (e.g. the percentage of removal found for 4 µg/L ochratoxin A, that bears carboxylate groups, was 47±3%, 65±1% and 84±1% for SUPRASs synthesized from TBA⁺, TPA⁺ and THA⁺, respectively, at a fractional solvent volume of 0.03).

In the case of cationic dyes, better extraction efficiency was obtained for SUPRASs produced from the shorter alkyl chains of the ammonium ions, which was clearly observed at low fractional SUPRAS volumes (Table 1). This behavior suggests that the removal of the cationic dye from water by the SUPRASs is mainly controlled by the electrostatic interactions between it and the carboxylate head groups of the surfactant. Thus, this process may be thought of as a phenomenon based purely on ion-exchange reactions between

the dye and the surfactant in the vesicle. As the counterion is bulkier, the selectivity coefficient decreases for the dye and also extraction efficiency. This behavior was also checked for other organic cations different from dyes (e.g. the percentage of removal found for 2 mg/L of the pesticide difenzoquat was $73\pm 2\%$, $12\pm 1\%$ and $6\pm 1\%$ for SUPRASs synthesized from TBA^+ , TPA^+ and THA^+ , respectively, at a fractional solvent volume of 0.03).

Removal of anionic dyes by SUPRASs produced from TBA^+ greatly improved by decreasing the length of the carboxylic acid, while the removal efficiency for cationic dyes was similar. Table 2 compares the results obtained for SUPRASs made up of octanoic and decanoic acid. The increase observed for octanoic acid could be explained on the basis of the higher concentration of TBA ions needed to bring the vesicular aggregates compared to those produced from decanoic acid. Because the most probable site for solubilization of anionic dyes is in the TBA^+ ions bridging the vesicles, increased concentration of TBA molecules in this site should increase their removal efficiency.

Table 2. Percentages of removal for anionic and cationic dyes using SUPRASs produced from octanoic and decanoic acids

Type	Dye	Removal (%)	
		C8	C10
Anionic	Trypan Blue	60±2	8.6±0.5
	Reactive Blue 19	97±1	47±1
	Cibacrom Blue 3GA	63±1	53±1
	Direct Red 80	93±3	11±1
	Reactive Red 15	10±1	2.1±0.3
	Direct Red 81	96±2	38±2
Cationic	Medola 's Blue	82±1	82±2
	Basic Violet 3	100±3	96±3
	Cresyl Violet Acetate	97±3	94±2
	Basic Yellow 11	95±1	97±2

$\alpha_{\text{carboxylic acid}} = 0.5$, carboxylate:TBA molar ratio = 1, Fractional SUPRAS volume: 0.02
 [Dye]=200 mgL⁻¹; room temperature; extraction time: 5 min; stirring rate: 1500 rpm

The effect of some variables on the removal of anionic and cationic dyes using SUPRASs made up of vesicles of octanoic acid-octanoate, induced by TBA ions, was investigated in order to elucidate which are the key parameters for solubilization by ion-exchange mechanisms and interactions into the TBA bridges. Table 3 shows the percentages of removal for the target compounds as a function of the fractional SUPRAS volume. Ion exchange was an efficient mechanism for extraction of most of the cationic dyes as it can be shown from their high percentage of extraction by using minute volumes of SUPRAS (e.g. fractional SUPRAS volume: 0.0025).

Table 3. Percentages of removal of anionic and cationic dyes as a function of the fractional solvent volume

Type	Dye	Fractional SUPRAS volume			
		0.0025	0.005	0.01	0.03
Anionic	Trypan Blue	28±1	36±1	64±1	82±3
	Reactive Blue 19	43±2	71±3	84±2	98±2
	Cibacrom Blue 3GA	60±2	62±1	66±3	69±3
	Direct Red 80	40±2	70±1	91±1	97±3
	Reactive Red 15	-	-	7.1±0.2	12.7±0.3
	Direct Red 81	55±2	77±2	96±2	98±2
Cationic	Medola 's Blue	50±3	61±1	72±2	85±1
	Basic Violet 3	96±1	100±3	99±2	99±3
	Cresyl Violet Acetate	96±1	97±1	99±2	98±2
	Basic Yellow 11	94±2	98±4	98±3	98±2

$\alpha_{\text{octanoic}} = 0.5$, octanoate:TBA molar ratio = 1, Concentration of dye: 200 mg/L; room temperature; extraction time: 5 min; stirring rate: 1500 rpm

A fractional SUPRAS volume of 0.01 gave acceptable removal for most of the dyes except for the anionic trypan blue and reactive red 15. Kinetics for extraction of dyes were fast and extraction equilibria were achieved after 5 min for most of the target dyes at stirring rates of 1500 rpm (Table 4). The influence of the pH was studied in the range 5-10 because the pH of effluents from industries connected with dyes (textile, leather, printing ink, etc.) is usually in this interval. No influence of this variable on the percentage of removal of dye was observed due that the charge of the functional groups of the dyes investigated (viz. sulfonic, quaternary ammonium) were pH independent.

Table 4. Percentages of removal of anionic and cationic dyes as a function of the stirring rate

Type	Dye	Stirring rate (rpm)			
		300	600	1050	1500
Anionic	Trypan Blue	27±1	65±1	64±1	66±3
	Reactive Blue 19	30±2	84±3	85±2	85±2
	Cibacrom Blue 3GA	45±2	61±1	68±3	69±3
	Direct Red 80	27±2	70±1	89±1	91±3
	Reactive Red 15	-	2.4±0.2	6.8±0.2	7.1±0.3
	Direct Red 81	25±2	86±2	91±2	97±2
Cationic	Medola 's Blue	39±3	64±1	69±2	72±1
	Basic Violet 3	48±1	77±3	99±2	99±3
	Cresyl Violet Acetate	89±1	98±1	99±2	99±2
	Basic Yellow 11	66±2	93±4	98±3	98±2

$\alpha_{\text{octanoic}} = 0.5$, octanoate:TBA molar ratio = 1, Fractional SUPRAS volume 0.01. Concentration of dye: 200 mg/L; room temperature; extraction time: 5 min

Textile bath effluents contain salts (0.005-0.3 M) that are used to favor the absorption of dyes by the fabric. So the effect of salts on the percentage of removal of dyes was investigated. The extraction efficiency for cationic dyes was independent of the concentration of salts up to the maximal concentration tested (i.e. 0.3 M NaCl). On the other hand, at 0.3 M NaCl, the extraction efficiency for anionic dyes was seriously affected (e.g. reduction of the percentage of removal of around 85% for trypan blue and 97% for direct red 80), increased (e.g. 33% for cibacrom blue 3GA) or kept almost constant (e.g. reactive blue 19 and direct red 81). Textile bath effluents can also contain divalent cations such as Ca^{+2} and Mg^{+2} that could result in carboxylate precipitation. It was checked that these ions, at concentrations below 200 mg/L did not affect the extraction efficiency of dyes, except for trypan blue,

nor precipitation of octanoate. The effect of the temperature, in the interval 20-45°, on the extraction of dyes was negligible. High concentration of dyes can be removed from effluents using fractional SUPRAS volumes as low as 0.01 (Table 5).

Table 5. Percentages of removal as a function of the concentration of dye

Type	Dye	Concentration (mg/L)			
		50	200	350	500
Anionic	Trypan Blue	72±1	57±1	45±1	37±2
	Reactive Blue 19	83±2	85±2	82±2	88±1
	Cibacrom Blue 3GA	92±1	88±1	86±3	77±3
	Direct Red 80	93±2	87±2	76±1	84±3
	Reactive Red 15	5.0±0.3	3.0±0.3	3.0±0.2	2.5±0.3
	Direct Red 81	98±3	94±2	88±2	83±2
Cationic	Medola's Blue	73±3	65±1	68±3	61±1
	Basic Violet 3	99±1	100±1	100±2	100±3
	Cresyl Violet Acetate	92±3	97±1	97±1	98±2
	Basic Yellow 11	97±2	97±4	99±3	98±2

$\alpha_{\text{octanoic}} = 0.5$, octanoate:TBA molar ratio = 1, Fractional SUPRAS volume: 0.01; room temperature; extraction time: 5 min; stirring rate: 1500 rpm

CONCLUSIONS

In summary, we describe here nanostructured solvents able to simultaneously extract a variety of compounds by reversible capture mediated by controllable noncovalent bonding interactions in different sites of the nanostructures. This is the first demonstration of green solvents applied as advanced assemblies, and highlights the material's platform potential for a

truly tailored approach for next generation water treatment and separation technologies.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MINECO (Project CTQ2014-53539-R) and FEDER. S. García-Fonseca acknowledges the Spanish MEC for the postgrad fellowship award (BES-2006-12643) and N. Caballero-Casero acknowledges the Spanish MINECO for the postgraduate fellowship (BES-2012-052170).

CONCLUSIONES

Las investigaciones que se recogen en la Memoria de esta Tesis Doctoral han demostrado la capacidad de los disolventes supramoleculares para el desarrollo de metodologías innovadoras en las dos áreas de estudio seleccionadas: tratamiento de muestras para el análisis químico de micotoxinas en matrices agroalimentarias y purificación de aguas residuales industriales.

Las conclusiones más relevantes relacionadas con el tratamiento de muestras para el análisis químico de micotoxinas en matrices agroalimentarias se enumeran a continuación.

1. Los SUPRAS formados a partir de ácido carboxílicos en mezclas de THF y agua pueden excluir macromoléculas mediante mecanismos químicos y físicos y por lo tanto tienen propiedades de acceso restringido (RAM). Esto ha permitido la integración de la etapa de extracción de micotoxinas y eliminación de los macrocomponentes de las matrices agroalimentarias y, como resultado, el desarrollo de metodologías simples y rápidas para el tratamiento de muestras en el análisis químico de micotoxinas.

2. Los SUPRAS-RAM investigados, formados a partir de ácidos decanoico, tetradecanoico y oleico, tienen la capacidad de extraer eficazmente micotoxinas en un amplio intervalo de polaridad ($\log P$ -0.5-4.6) tanto de muestras líquidas como sólidas. Los porcentajes de recuperación obtenidos en nuestros estudios se encuentran en el intervalo 84-105%. Esta capacidad es consecuencia de la elevada concentración de compuesto anfifílico en los SUPRAS investigados (0.2-0.7 mg/ μ L), los diferentes microambientes de polaridad presentes en los agregados hexagonales inversos, y los mecanismos mixtos de interacción ofrecidos por el SUPRAS para solubilización de los compuestos (interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones polares).

3. La combinación de la elevada eficacia de extracción y propiedades RAM de los SUPRAS ha permitido el desarrollo de 4 metodologías para la determinación de ocratoxina en vinos y cereales combinando SUPRAS-RAM con cromatografía de líquidos y detección fluorescente, zearalenona, desoxinivalenol, fumonisina B1 y fumonisina B2 en cereales mediante la combinación de SUPRAS-RAM con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas y ocratoxina A en vinos y especias y aflatoxina B1 en cereales combinando SUPRAS-RAM, previa eliminación del ácido carboxílico, con métodos inmunoquímicos.

4. Todas las metodologías desarrolladas cumplen con los criterios de funcionamiento requeridos, en términos de sensibilidad, selectividad, precisión, etc, para la determinación de las micotoxinas para las que se han validado, y por tanto pueden utilizarse para el control de las mismas en productos agroalimentarios. Dadas las características de estas metodologías, los SUPRAS-RAM son idóneos para el desarrollo de procedimientos generalizados de tratamiento de muestras.

5. Los procedimientos de extracción desarrollados para las diferentes muestras analizadas son rápidos (5-15 min) y utilizan bajos volúmenes de disolvente. Ello se debe a que los SUPRASs están constituidos por microgotas y por lo tanto, durante la extracción se forma una microemulsión que facilita la transferencia de fase de los solutos. Son por tanto idóneos para reducir los tiempos de análisis y costes en el control de calidad de productos agroalimentarios.

6. Todos los procedimientos de extracción pueden ser implementados utilizando material comúnmente presente en cualquier laboratorio de análisis químico (agitadores vórtex, centrifugas, etc.) y los SUPRAS se obtienen espontáneamente a través de procedimientos sintéticos muy simples.

Las conclusiones más relevantes relacionadas con la purificación de aguas residuales industriales se enumeran a continuación.

1. Se ha demostrado el potencial de los SUPRAS vesiculares formados a partir de mezclas de ácidos carboxílicos y carboxilatos en presencia de sales de tetraalquil amonio para el desarrollo de tecnologías innovadoras no destructivas para la concentración de contaminantes orgánicos, de diferente naturaleza química, en aguas residuales industriales, como una etapa previa a su posterior reciclado o destrucción.

2. Las propiedades físico-química de los SUPRAS (miscibilidad con agua, densidad, viscosidad, tensión superficial), estabilidad cinética, capacidad de respuesta a las condiciones ambientales, capacidad de extracción de compuestos iónicos, polares e hidrófobos, etc puede modificarse variando la longitud de la cadena hidrocarbonada de la sal de amonio utilizada como agente coacervante.

3. Los SUPRAS están constituidos por agregados vesiculares unidos por sales de tetraalquilamonio a través de las interacciones hidrófobas de las cadenas alquilo.

4. Los SUPRAS vesiculares presentan diferentes regiones para la solubilización de solutos y distintos tipos de interacciones (van der Waals, puentes de hidrógeno, polares, iónicas y π -catión). Las regiones más probables para la solubilización de los diferentes tipos de contaminantes son: (A) las sustancias hidrófobas en las cadenas hidrocarbonadas del ácido carboxílico; (B) los compuestos polares mediante interacción con los grupos polares del ácido carboxílico; (C) los compuestos orgánicos catiónicos mediante interacción con el grupo carboxilato, y (D) los compuestos orgánicos aniónicos mediante interacción con el ion amonio cuaternario que enlazan las vesículas.

5. Los SUPRAS vesiculares son extractantes idóneos para la purificación de aguas residuales que contienen compuestos químicos en un

amplio intervalo de polaridad, pueden considerarse por tanto extractantes multifuncionales.

ANEXO 1:

Publicaciones científicas derivadas de la Tesis
Doctoral

Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral

1. **Coacervative extraction of Ochratoxin A in wines prior to liquid chromatography/fluorescence determination.**

Sergio García-Fonseca, Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito; Analytica Chimica Acta 617 (2008) 3– 10 (Featured article category).

Factor de impacto (posición revista/nº total revistas); Área Química Analítica, 2014 (JCR): 4,513 (5/74, 1º Cuartil).

2. **Supramolecular solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat prior to liquid chromatography-fluorescence determination.**

Sergio García-Fonseca, Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito; Journal of Chromatography A 1217 (2010) 2376–2382.

Factor de impacto (posición revista/nº total revistas); Área Química Analítica, 2014 (JCR): 4,169 (6/74, 1º Cuartil).

3. **Restricted access supramolecular solvents for removal of matrix-induced ionization effects in mass spectrometry: Application to the determination of Fusarium toxins in cereals.**

Sergio García-Fonseca, Soledad Rubio; Talanta 148 (2016) 370-379.

Factor de impacto (posición revista/nº total revistas); Área Química Analítica, 2014/2015 (JCR): 3.545 (12/74, 1º Cuartil).

4. **Supramolecular solvent extraction of mycotoxins in food prior to their determination by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).**

Sergio García-Fonseca, Soledad Rubio; Enviado a publicación (Marzo 2016)

5. **Green Vesicular Supramolecular Solvents for Simultaneous Removal of Ionic, Polar and Hydrophobic Organic Pollutants in Wastewater.**

Sergio García-Fonseca, Noelia Caballero-Casero, Loreto Lunar, Soledad Rubio; Enviado a publicación (Marzo 2016)

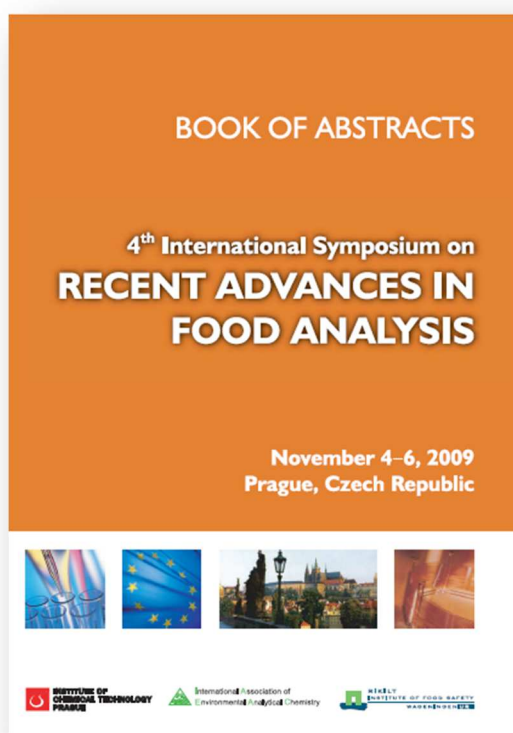
ANEXO 2:

Comunicaciones realizadas en congresos
nacionales e internacionales

Oral internacional

Supramolecular Solvent microextraction of mycotoxins in food prior to ELISA determination

*4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis.
Praga, República Checa. Del 4 al 6 de noviembre 2009.*

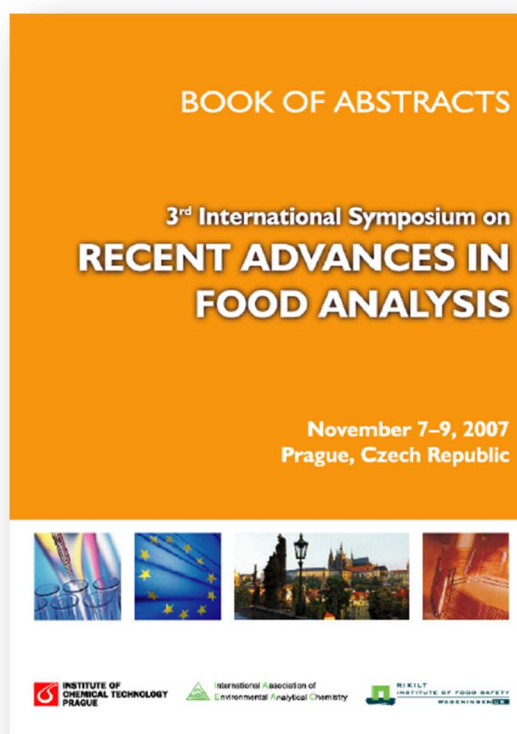


Póster internacional

Coacervative extraction of ochratoxin A in wines prior to liquid chromatography/fluorescence determination

3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis.

Praga, República Checa. Del 7 al 9 de noviembre 2007.



Supramolecular solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat prior to liquid chromatography/fluorescence

The World Mycotoxin Forum: The Fifth Conference.

Noordwijk, Países Bajos. Del 7 al 9 de noviembre 2008.



Oral nacional

Supramolecular Solvent microextraction of mycotoxins in food prior to ELISA determination

I Congreso Científico de Investigadores en Formación.

Córdoba, España. 15 y 16 de octubre 2009.



Póster nacional

Nanostructured-solvent for the extraction of ochratoxin A in Andalusian wines

&

Microextraction of ochratoxin A in raw wheat with supramolecular solvents

II Encuentro sobre nanociencia y nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba (NanoUCO).

Córdoba, España. 14 de enero 2010.

