



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA PRESENCIA DE  
MICOTOXINAS EN PIENSOS COMERCIALIZADOS EN  
ESPAÑA MEDIANTE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS  
MULTIDETECCIÓN Y ALTA RESOLUCIÓN OPTIMIZADOS**

Memoria presentada para optar al grado de  
Doctor, presentada por  
**David Romera Ureste**

Dirigida por  
**Dra. Misericordia Jiménez Escamilla**  
**Dr. Jose Vicente Gimeno Adelantado**  
**Dr. Rufino Mateo Castro**

Valencia, 2016





# VNIVERSITATIS VALÈNCIA

La Dra. Misericordia Jiménez Escamilla, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología, el Dr. Jose Vicente Gimeno Adelantado, Catedrático del Departamento de Química Analítica, y el Dr. Rufino Mateo Castro, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica, todos de la Universidad de Valencia, como directores de la Tesis Doctoral **“Evaluación del riesgo de la presencia de micotoxinas en piensos comercializados en España mediante métodos cromatográficos multidetección y alta resolución optimizados”** realizada por David Romera Ureste, autorizan la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, en octubre de 2016.

Fdo. Dr. Rufino Mateo Castro

Fdo. Dr. Jose Vte. Gimeno Adelantado

Fdo. Dra. Misericordia Jiménez Escamilla



A mis padres y mi hermano

A Eva

A mis hijos Andrea y David



## Agradecimientos

---

Cuando surgió hace ya seis años la idea de desarrollar un proyecto de investigación sobre la presencia de micotoxinas y sus hongos en piensos, jamás pensé en las vicisitudes, problemas, y al final la satisfacción que me proporcionaría. Por ello, me gustaría expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, y muy especialmente:

A la profesora Dra. Misericordia Jiménez Escamilla. Es muy difícil reflejar en unas palabras, mi profunda gratitud por brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis, así como su paciencia, conocimientos, tiempo y apoyo personal y profesional durante su realización, sin la cual esta no hubiera sido posible. Gracias de corazón por ser un ejemplo de profesionalidad, de generosidad y de humanidad.

A los profesores codirectores de esta Tesis, Dr. Rufino Mateo Castro y Dr. Jose Vicente Gimeno Adelantado por su generosidad, orientación y consejos en la dirección de esta Tesis y su valiosa contribución a través de sus aportaciones y sugerencias.

Me gustaría agradecer a mis compañeros de Departamento, Francisco Manuel Valle y Eva Mateo por su ayuda y disposición. De igual forma, deseo agradecer a María Sales Galletero, del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Valencia, las facilidades y colaboración proporcionadas durante el trabajo realizado con los equipos de espectrometría de masas, y de igual forma a los miembros de los Departamentos de Genética y Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid, especialmente a las profesoras: Dra. María Teresa González, Dra. Covadonga Vázquez y Dra. Belén Patiño por su inestimable colaboración en la realización de la parte relacionada con la caracterización molecular de los hongos contaminantes de las muestras de piensos estudiadas.

A mis amigos Martín y Jose por estar siempre ahí y por su comprensión y ánimos para seguir adelante durante todo este tiempo. De igual forma, gracias también a mi compañera Susana, por su apoyo y ánimos durante la fase final de trabajo de la realización de esta Tesis.

Gracias a mi familia por su apoyo y paciencia que han hecho posible la superación de los obstáculos hasta llegar aquí. A la memoria de mis abuelos, para los que hubiera sido motivo de satisfacción y orgullo haber tenido esta Tesis entre sus manos.

A mi mujer Eva, porque sin su apoyo incondicional, ánimos y paciencia, esta tesis jamás habría sido posible. De igual forma y a su manera, gracias a mis hijos Andrea y David por su alegría, ternura y cariño.

El trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral ha sido desarrollado en el ámbito de los proyectos AGL2010-22181-C04-03/ALI y AGL2014-53928-C2-1R financiados por el el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) por lo que manifiesto mi agradecimiento.



## Resumen

---

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por determinados hongos, y son contaminantes frecuentes de alimentos y piensos. Producen enfermedades, denominadas micotoxicosis, que pueden ser tanto agudas como crónicas en personas y animales. A nivel de salud humana afectan fundamentalmente al hígado, los riñones y el sistema inmune, mientras que sus efectos en salud animal son más variados, dependiendo de otros factores como la especie, la edad, etc. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer ("International Agency for Research on Cancer", IARC) ha clasificado las aflatoxinas como uno de los compuestos naturales con mayor potencial cancerígeno y teratógeno que existen en la naturaleza, incluyéndolas dentro del grupo I de su clasificación, mientras que ha clasificado a otras micotoxinas, como la ocratoxina A, el deoxinivalenol y las fumonisinas dentro del grupo de posibles cancerígenos (grupo 2).

Debido a su importancia en salud pública, se han establecido límites legales en los niveles de concentración de micotoxinas en alimentos y piensos comercializados dentro de la Unión Europea y se han establecido además requisitos tanto en la toma de muestras como en los métodos de análisis aplicados al control de micotoxinas. Además, y debido, por una parte, a la extraordinaria variedad química y posibles efectos toxicológicos que pueden tener las micotoxinas, y por otra, a factores externos como el cambio climático, las instituciones sanitarias mantienen, como una de sus principales líneas de trabajo relacionada con el control de contaminantes ambientales, la constante monitorización y estudio toxicológico de micotoxinas, para determinar sus posibles efectos en la salud humana o animal. Por ello, la legislación alimentaria europea relacionada con micotoxinas se encuentra en constante evolución, incluyendo nuevos productos alimenticios, nuevos niveles de concentración para las micotoxinas ya legisladas, o realizando nuevas incorporaciones como ha ocurrido recientemente con la citrinina o los tricotecenos.

La producción ganadera ocupa un lugar muy importante en la cadena alimentaria. La presencia de la micotoxina aflatoxina M en la leche animal, producto de la metabolización en el hígado animal de la aflatoxina B<sub>1</sub>, o la presencia de ocratoxina A en huevos y carne de cerdo o aves, son ejemplos de la importancia del control, dentro de la seguridad alimentaria, de los niveles de

---

concentración de micotoxinas presentes en los piensos que ingieren los animales. Dado el gran número de micotoxinas existentes, y la falta de datos relativos a su toxicidad y efectos en la salud humana y animal para la gran mayoría de ellas, puede presuponerse como factible la aparición de otras micotoxinas en productos de origen animal en el futuro. Por ello, la tendencia presente y futura es el aumento del control de la presencia de micotoxinas en piensos, estableciendo niveles de concentración más restrictivos en las ya conocidas y la inclusión de otras nuevas, así como la generalización de los criterios en los planes de muestreo y análisis establecidos en alimentos para micotoxinas.

Los piensos destinados a alimentación animal constituyen matrices complejas desde un punto de vista analítico, debido, por una parte, a la gran variedad de posibles ingredientes que pueden formar parte de su composición y por otra, al estado de conservación en el que se pueden encontrar. Por ello, mientras que, para otras matrices como la de los cereales, la metodología analítica ha tenido un gran desarrollo en la literatura, los piensos no han tenido el mismo interés. Por ello, los datos relativos a la incidencia de la contaminación de piensos por micotoxinas son menos abundantes que en alimentos, tal y como ha quedado de manifiesto en la literatura científica, en varios informes realizados por las instituciones sanitarias europeas, y por las numerosas solicitudes para la aportación de datos realizada a los Estados miembros por parte de la Comisión Europea.

Conscientes de la problemática actual, **el primer objetivo** de esta Tesis Doctoral se dirige a la optimización y validación de métodos analíticos basados en cromatografía líquida para la determinación de las principales micotoxinas actualmente legisladas en piensos. Para el desarrollo de dicha metodología se ha tenido en cuenta los criterios de calidad aceptados y aplicables a métodos de ensayo, los criterios específicos establecidos para métodos de ensayo para el control de micotoxinas en alimentos establecidos en la legislación europea, y su posible transferencia práctica a laboratorios de control. Dado que habitualmente, los recursos humanos y materiales de los laboratorios de control de micotoxinas son limitados, la selección del equipamiento, materiales y reactivos se ha realizado teniendo también en cuenta su viabilidad económica.

Durante los últimos años el uso de la espectrometría de masas en métodos de ensayo aplicados a la determinación de micotoxinas en alimentos ha tenido un gran desarrollo debido a su sensibilidad, reproducibilidad y su capacidad de determinar, en un único análisis, un importante número de micotoxinas diferentes químicamente. En piensos, sin embargo, el desarrollo de la citada metodología ha

sido más limitado. Por ello, y como **segundo y tercer objetivos**, se ha desarrollado y validado un método analítico que combina dos de las técnicas de detección que más desarrollo están teniendo actualmente, la espectrometría de masas acoplada en tándem y la espectrometría de tiempo de vuelo, que supone un enfoque novedoso en la determinación del nivel de contaminación de micotoxinas en piensos. Mediante el uso de la espectrometría de masas en tándem, el método analítico desarrollado permite la cuantificación, ajustada a los actuales límites de concentración establecidos en la legislación, de las principales micotoxinas reguladas en piensos, y la inclusión de otras posibles micotoxinas que pudieran establecerse en un futuro. De forma complementaria, y mediante el uso de la técnica espectrométrica cuadrupolo tiempo de vuelo, el método desarrollado permite la identificación de 245 posibles micotoxinas y otros metabolitos fúngicos o bacterianos presentes en las muestras, permitiendo obtener una visión más completa del nivel de contaminación por micotoxinas presentes en las muestras. Al igual que la metodología de rutina desarrollada comentada en el apartado anterior, este método también se ha desarrollado y validado cumpliendo los criterios generales de calidad y específicos para métodos de ensayo de micotoxinas, comúnmente aceptados internacionalmente y establecidos en la legislación europea.

Como **objetivo cuarto** de esta Tesis Doctoral, se ha aplicado toda la metodología analítica desarrollada en los objetivos anteriores al análisis de un conjunto de 62 muestras comerciales de piensos, seleccionadas en función de los distintos tipos de piensos comerciales actualmente existentes en el mercado español ganadero con el objeto de conocer su grado de contaminación con micotoxinas.

Finalmente, el **quinto objetivo** de la Tesis se dirige al estudio de la microbiota potencialmente productora de las micotoxinas encontradas en las muestras de piensos analizadas en el objetivo cuarto. Se emplean para ello métodos convencionales basados en el estudio de la morfología macro- y microscópica de los hongos y métodos de PCR específicos de especie basados en regiones multicopia. Los resultados obtenidos indican que, en general, existe una fuerte correlación entre la presencia de micotoxinas en muestras y la presencia de especies productoras de las mismas. Las especies fúngicas más destacables y frecuentes han sido *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* spp. del agregado *niger*, *A. ochraceus*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* y *F. graminearum*.

En su conjunto, el trabajo de investigación realizado permite disponer de una metodología analítica optimizada, transferible y de fácil implementación en

---

laboratorios de control de micotoxinas en piensos. A través del método combinado basado en espectrometría de masas, se ha desarrollado y optimizado una metodología novedosa para la cuantificación de las principales micotoxinas recogidas en la legislación y la identificación de otras posibles presentes en piensos.

Finalmente y mediante la aplicación de la metodología analítica desarrollada en combinación con el estudio de la posible micobiota toxigénica presente en las muestras de piensos, se han recopilado un conjunto de datos que puede servir como punto de partida para futuros trabajos de investigación relacionados con las interacciones de los distintos factores que afectan al crecimiento fúngico en piensos y sus materias primas, la posible producción posterior de micotoxinas, y el diseño de medidas preventivas del crecimiento fúngico y producción de micotoxinas a lo largo de la cadena alimentaria animal, y en definitiva, una menor exposición de la población, tanto humana como animal a estos metabolitos tóxicos de origen fúngico.

---

**Índice**

---

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Introducción General.....	3
1.1. Micosis y micotoxicosis. Micotoxinas.....	3
1.2. Evolución histórica .....	5
2. Características y taxonomía de los hongos .....	10
3. Factores determinantes en la producción fúngica de micotoxinas.....	13
3.1. Actividad de agua .....	15
3.2. Temperatura .....	16
3.3. Concentración de iones hidrógeno (pH) .....	17
3.4. Composición de la atmósfera.....	18
3.5. Características del sustrato .....	19
3.6. Prácticas agrícolas: uso de fungicidas .....	19
3.7. Interacciones microbianas .....	20
3.8. Presencia de insectos. Control de plagas .....	21
4. Principales micotoxinas .....	22
4.1. Aflatoxinas.....	22
4.2. Ocratoxina A.....	30
4.3. Zearalenona .....	34
4.4. Fumonisinias .....	38
4.5. Tricotecenos.....	43
4.6. Otras micotoxinas emergentes .....	56
5. Legislación sobre micotoxinas .....	58
5.1. Aspectos generales .....	58
5.2. Legislación sobre micotoxinas en la Unión Europea .....	65
6. Piensos destinados a alimentación animal.....	72
6.1. Tipos de piensos y clasificación.....	72
6.2. Sector de la producción de piensos en España .....	76
7. Sistema APPCC para la prevención y control de micotoxinas en piensos .....	78
7.1. Aplicación del sistema APPCC en la fabricación de piensos para ganadería.....	85
7.2. Aplicación del sistema APPCC en el cultivo y cosecha de cereales .....	90
8. Modelos de predicción de crecimiento fúngico y producción de micotoxinas en alimentos y piensos.....	92
9. Determinación de micotoxinas.....	97

---

9.1. Muestreo .....	97
9.2. Preparación de la muestra: extracción y purificación.....	98
9.3. Determinación convencional de micotoxinas.....	101
9.4. Metodologías de cribado rápido de micotoxinas .....	103
9.5. Métodos multimicotoxinas por espectrometría de masas .....	105
10. Determinación de hongos productores.....	111
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>115</b>
<b>III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>119</b>
1. Optimización de la metodología analítica, para la determinación de micotoxinas en piensos mediante cromatografía líquida de alta resolución.....	121
2. Optimización de la metodología analítica para la determinación de las principales micotoxinas legisladas a nivel europeo y de otras micotoxinas de interés toxicológico mediante UHPLC-MS/MS.....	136
3. Optimización de la metodología para la identificación de otras micotoxinas de interés presentes en piensos mediante UHPLC-QTOF-MS.....	142
4. Caracterización de la microbiota productora de micotoxinas contaminante de las muestras de piensos .....	146
4.1. Identificación mediante cultivo en placa de posibles especies fúngicas productoras de micotoxinas .....	146
4.2. Identificación mediante PCR de especies fúngicas descritas como productoras de micotoxinas en las muestras de piensos .....	147
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>149</b>
1. Optimización y validación de métodos cromatográficos para la determinación de las principales micotoxinas legisladas a nivel europeo en piensos mediante HPLC-FLD y HPLC-DAD.....	151
1.1. Optimización y validación del método de cuantificación de aflatoxina B1 por HPLC-FLD.....	152
1.2. Optimización y validación del método de cuantificación de zearalenona por HPLC-FLD.....	158
1.3. Optimización y validación del método de cuantificación de deoxinivalenol por HPLC-DAD .....	164

---

1.4. Optimización y validación del método de cuantificación de fumonisinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> por HPLC-FLD .....	168
1.5. Optimización y validación del método de cuantificación de toxinas T-2 y HT-2 por HPLC-FLD.....	174
2. Optimización y validación de un método cromatográfico multimicotoxinas para el análisis de piensos mediante UHPLC-MS/MS .....	180
3. Optimización y validación de un método cromatográfico multimicotoxinas para el análisis de piensos mediante UHPLC-Q-TOF-MS 191	
4. Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de piensos comerciales.....	197
4.1. Selección y homogeneización de la muestra .....	197
4.2. Aplicación de la metodología desarrollada por HPLC-FLD y HPLC-DAD en la determinación de micotoxinas en piensos comerciales .....	198
4.3. Aplicación de la metodología desarrollada por UHPLC-MS/MS y UHPLC-Q-TOF-MS en la determinación de micotoxinas en piensos comerciales .....	202
4.4. Micobiota potencialmente productora de micotoxinas en las muestras de piensos .....	221
<b>V. CONCLUSIONES FINALES .....</b>	<b>227</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>231</b>





---

**Lista de figuras**


---

F.1	Una sección del calendario romano “Fasti Praenestini”, con la referencia a la festividad de Robigo (inferior derecha de la imagen).....	6
F.2	Cornezuelo del centeno (esclerocios).....	7
F.3	Retablo de Isenheim Matthias Grünewald (1512-1516). Individuo afectado por ergotismo.....	9
F.4	Colonias de <i>A. flavus</i> (A) y <i>A. parasiticus</i> (B) en medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) 10 días a 25 °C. Conidios de <i>A. flavus</i> (C) y (D).....	24
F.5	Estructura química de aflatoxina B1 (A), aflatoxina B2 (B) aflatoxina G1 (C), aflatoxina G2 (D) y aflatoxina M1 (E). ....	25
F.6	Biosíntesis de las aflatoxinas B (1, 2), G (3, 4), y M (5, 6).....	26
F.7	Aspecto que presenta una mazorca de maíz y nueces por contaminación con <i>A. flavus</i> .....	30
F.8	Estructura química de la ocratoxina A.....	30
F.9	Estructura química de: zearalenona (A), 17- $\beta$ -estradiol (B), $\alpha$ -zearalenol (C), $\beta$ -zearalenol (D), $\alpha$ -zearalanol (E) y $\beta$ -zearalanol (F)....	35
F.10	Colonias (A) y esporas (B) de <i>F. graminearum</i> . Espiga de trigo contaminada por <i>F. graminearum</i> (C). ....	35
F.11	Estructura química de fumonisina B1 (A), fumonisina B2 (B) y fumonisina B3 (C).....	39
F.12	Colonias (A) y esporas (B) de <i>F. verticillioides</i> . Aspecto de mazorca de maíz contaminada con <i>F. verticillioides</i> (C).....	39
F.13	Estructura química general de los tricotecenos (arriba), y principales tricotecenos (abajo).....	45
F.14	Ruta metabólica de la toxina T-2 en animales y humanos .....	48
F.15	Estructura química de: eniatina (A), eniatina A1 (B), eniatina B (C), eniatina B1 (D), fusaproliferina (E), beauvericina (F) y moniliformina (G).....	57
F.16	Efectos de la variación en el consumo diario de maíz en la población en el establecimiento de límites legales para DON.....	61
F.17	Curvas características de operación del funcionamiento de planes de muestreo que utilizan muestras de 1, 2 y 5 kg para detectar las	

---

	fumonisinias en lotes de maíz sin cáscara para un nivel máximo de 10 mg/kg.....	63
F.18	Tipos de piensos definidos en la normativa de la Unión Europea. ....	73
F.19	Evolución de cantidad de pienso producido durante 2014-2015 por CCAA (en toneladas métricas) .....	78
F.20	Árbol o secuencia de decisiones para identificar PCCs.....	84
F.21	Numero de notificaciones realizadas al RASFF 2014.....	85
F.22	Diagrama de flujo (DFP) de los procesos en la fabricación de piensos. ....	89
F.23	Diagrama de flujo de proceso (DFP) general de cultivo de cereales.....	91
F.24	Esquema de funcionamiento de la resonancia plasmón de superficie .....	105
F.25	Esquema de funcionamiento de un espectrómetro de masas QqQ en funcionamiento en modo MRM.....	110
F.26	Esquema de funcionamiento de un espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF).....	111
F.27	Cromatograma de un patrón de AFB1 en el LOD (0,05 ng/mL) .....	153
F.28	Cromatograma de un pienso blanco (porcino) utilizado para la determinación de LOD.....	156
F.29	Cromatograma de un pienso blanco (avícola) con adición de AFB1 en A) LOD (1 µg/kg), y B) LOQ (2 µg/kg).....	157
F.30	Cromatograma de un patrón de ZEA en el LOD (12,5 ng/mL) .....	160
F.31	Cromatograma de un pienso blanco (ovino) utilizado para la determinación de LOD.....	161
F.32	Cromatograma de un pienso blanco (porcino) con adición de ZEA en A) LOD (25 µg/kg), y B) LOQ (50 µg/kg).....	162
F.33	Cromatograma de un patrón de DON en el LOD (50 ng/mL). ....	165
F.34	Cromatograma de un pienso blanco (porcino) utilizado para la determinación de LOD.....	166
F.35	Cromatograma de un pienso blanco (avícola) con adición de DON en A) LOD (200 µg/kg, y B) LOQ (400 µg/kg) .....	167
F.36	Cromatograma de un patrón de fumonisinias B1 y B2 en el LOD (30 ng/mL y 10 ng/mL respectivamente). ....	170
F.37	Cromatograma de un pienso blanco (avícola) utilizado para la determinación de LOD.....	172
F.38	Cromatograma de un pienso blanco (porcino) con adición de FB1 y FB2 en A) LOD (600 µg/kg para FB1, 200 µg/kg para FB2), y B) LOQ (1800 µg/kg para FB1, 600 µg/kg para FB2).....	173

---

---

F.39	Cromatograma de un patrón de T-2 y HT-2 en el LOQ (60 ng/mL) para cada toxina (T-2 y HT-2). .....	176
F.40	Cromatograma de un pienso blanco (porcino) utilizado para la determinación de LOD.....	177
F.41	Cromatograma de un pienso blanco (avícola) con adición de T-2 y HT-2 en el LOQ (120 µg/kg c/u). .....	178
F.42	Cromatograma en una muestra de pienso fortificada en el LOQ para las micotoxinas reguladas en la UE: AFB1, OTA, DON, FB1, FB2, T2 y HT2, incluyendo las dos transiciones seleccionadas.....	189
F.43	Cromatograma en una muestra de pienso fortificada en el LOQ con las aflatoxinas (AFB2, AFG1 y AFG2) y los tricotecenos DAS, FUSX, 3-ADON y 15-ADON (suma) incluidas en el método UHPLC-MS/MS, incluyendo las dos transiciones seleccionadas.....	190
F.44	Ejemplo de identificación de una micotoxina acompañante (emodina) en una muestra comercial, basado tanto en la medición precisa de la masa tanto en modo MS como en modo MS/MS .....	196
F.45	Distribución de los piensos comerciales analizados según la especie ganadera a la que van destinados. ....	197
F.46	Cromatograma de un pienso para conejos contaminado con a) DON (837,7 µg/kg) y b) ZEA (59,5 µg/kg). .....	201
F.47	Distribución y niveles de concentración de las micotoxinas cuantificadas mediante UHPLC-MS/MS (en µg/kg) .....	205
F.48	Distribución de las micotoxinas detectadas y/o cuantificadas en piensos .....	205
F.49	Distribución de los resultados de otras micotoxinas presentes (purity score ≥70), en función del tipo de micotoxina (izquierda) o tipo de pienso (derecha).....	208
F.50	Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada [M-H] <sup>-</sup> . .....	212
F.51	Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada [M-NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> .....	214
F.52	Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada [M+Na] <sup>+</sup> . .....	215
F.53	Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada [M+H] <sup>+</sup> .....	218

---

F.54	Microbiota contaminante de las muestras de piensos destinados al sector ganadero comercializados en España .....	224
F.55	Especies toxigénicas detectadas en base a protocolos específicos PCR en las muestras de piensos destinados al sector ganadero comercializados en España.....	225
F.56	Cultivos en agar PDA y PDA con diclorán (H) de materia prima (cereales) para la fabricación de piensos para cereales (A y G), pienso para ovino/caprino (B, E y F), pienso para porcino (C, D y H).....	226

---

**Lista de tablas**


---

T.1	Fórmula molecular, peso molecular y punto de fusión de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1. ....	25
T.2	Presencia y niveles de OTA en alimentos dentro de la UE .....	33
T.3	Fumonisina B1 en muestras de alimentos dentro de la UE .....	42
T.4	Concentraciones de deoxinivalenol ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ 88 % materia seca) en piensos destinados al sector ganadero. ....	52
T.5	Concentraciones de toxinas T-2 y HT-2, expresados como suma de ambas, en $\mu\text{g}/\text{kg}$ sobre 88 % materia seca, en piensos .....	55
T.6	Criterios de precisión y exactitud para métodos de ensayo establecidos por el Reglamento N <sup>o</sup> 401/2006. ....	68
T.7	Límites máximos de concentración establecidos actualmente en la legislación europea para piensos y sus materias primas. ....	71
T.8	Distribución de piensos por especies (Informe SILUM 2015) .....	77
T.9	Disoluciones utilizadas durante la fase de extracción de los métodos .....	122
T.10	Programa de gradiente utilizado en la fase móvil para la determinación de T-2 y HT-2 por HPLC-FLD .....	134
T.11	Concentraciones de las micotoxinas en la disolución patrón multimicotoxinas. ....	137
T.12	Programa de gradiente utilizado en la fase móvil de UHPLC-MS/MS .....	138
T.13	Iones precursores, parámetros MS/MS optimizados e iones producto utilizados. ....	139
T.14	LOD, LOQ y rango de cuantificación lineal para cada micotoxina. ....	141
T.15	Programa de gradiente utilizado en la fase móvil para el método UHPLC QTOF-MS. ....	144
T.16	Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para AFB1. ....	158
T.17	Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para ZEA. ....	163
T.18	Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-DAD para DON. ....	168
T.19	Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para FB1 y FB2. ....	174

---

---

T.20	Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para T-2 y HT-2 .....	179
T.21	Resumen de los datos de precisión y exactitud del método UHPLC-MS/MS. ....	187
T.22	Resumen de los niveles de concentración de las muestras fortificadas utilizadas en las series analíticas, así como los niveles de recuperación aceptables establecidos en el Reglamento N° 401/2006. ....	199
T.23	Contenido en micotoxinas cuantificado en muestras comerciales mediante HPLC-FLD y HPLC-DAD .....	201
T.24	Resumen de los niveles de concentración de las muestras fortificadas utilizadas en las series analíticas mediante UHPLC-MS/MS, así como los niveles de recuperación establecidos en el Reglamento N° 401/2006. ....	203
T.25	Resumen de los datos de concentraciones obtenidos en el análisis por UHPLC-MS/MS (en µg/kg). ....	206
T.26	Distribución de otras micotoxinas presentes mediante UHPLC-Q-TOF-MS (purity score ≥70). ....	209
T.27	Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada [M-H] <sup>-</sup> . ....	211
T.28	Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> .....	213
T.29	Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada [M+Na] <sup>+</sup> .....	216
T.30	Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada [M+H] <sup>+</sup> .....	219
T.31	Incidencia de esporas viables de hongos potencialmente productores de micotoxinas en diferentes tipos de piensos destinados al sector ganadero en España. ....	222
T.32	Especies productoras de micotoxinas, detectadas e identificadas por protocolos de PCR específicos de especie en muestras de piensos destinadas al sector ganadero comercializadas en España. ....	223

---

## Acrónimos y abreviaturas

---

a.C.	Antes de Cristo
3-ADON	3-Acetil-deoxinivalenol
15-ADON	15-Acetil-deoxinivalenol
ADP	Adenosine diphosphate
AFB1	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB2	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG1	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG2	Aflatoxina G <sub>2</sub>
AFM1	Aflatoxina M <sub>1</sub>
AFPs	Amplified fragment length polymorphism/ Polimorfismo para la longitud de los fragmentos
AMFE	Análisis modal de fallos y efectos
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APPCC	Análisis de peligros y puntos de control críticos/Hazard analysis and critical control point
ASE	Accelerated solvent extraction
ATA	Alimentary toxic aleukia
ATP	Adenosine triphosphate
a <sub>w</sub>	Actividad de agua/Water activity
BPA	Buenas prácticas agrícolas/Good agricultural practices (GAP)
BPAL	Buenas prácticas de almacenamiento/Good storage practices
BPF	Buenas prácticas de fabricación/Good manufacturing practices
BPH	Buenas prácticas higiénicas/Good hygiene practices (GHP)
CCA	Comisión del Codex Alimentarius/Codex Alimentarius
CCAAC	Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes/ Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC)
DAD	Diode array detector/Detector de red de diodos
DAS	Diacetoxiescirpenol/Diacetoxyscirpenol
DFP	Diagrama de flujo del producto
DNA	Ácido desoxirribonucleico (ADN)/ Deoxyribonucleic acid
DON	Deoxinivalenol/Deoxynivalenol
EC	European Commission/Comisión Europea (CE)
ECD	Electron capture detector/Detector de captura de electrones
EFSA	European Food Safety Authority/Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (AESA)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays

---

EU	European Union
FAO	The Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización de las Naciones Unidas para la
FB1	Fumonisina B1/Fumonisin B1
FB2	Fumonisina B2/Fumonisin B2
FB3	Fumonisina B3/Fumonisin B3
FLD	Detector de fluorescencia/Fluorescence detector (FD)
FDA	Food and Drug Administration/Agencia Estadounidense de Alimentación y
FID	Flame ionization detector/Detector de ionización de llama
FUSX	Fusarenona X/Fusarenone X
GC	Gas-chromatography/Cromatografía de gases (CG)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography/Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)
HPLC-DAD	High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection/Cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos
HPLC-FLD	High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection/ Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia
HR	Humedad relativa
HT2	Toxina HT-2/HT-2 toxin
IAC	Immunoaffinity column/Columna de inmunoafinidad (CIA)
IARC	International Agency for Research on Cancer/Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
ICBN	Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas/ International Code of Nomenclature for algae,
IDA	Ingesta diaria admisible/Admissible daily intake (ADI)
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives/ Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en
LOD	Limit of detection/Límite de detección
LOQ	Limit of quantification/Límite de cuantificación
MEA	Malt extract agar/Agar extracto de malta (AEM)
MIP	Molecular imprinted polymers/Polímeros de impresión molecular
MRM	Multiple Reaction Monitoring/Monitorización de múltiples
MS	Mass spectrometry/Espectrometría de masas
MS/MS	Tandem mass spectrometry/Espectrometría de masas en tándem
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NIV	Nivalenol

---



---

OMS	Organización Mundial de la Salud/World Health Organization
OTA	Ocratoxina A/Ochratoxin A
OTB	Ocratoxina B/ Ochratoxin B
PAT	Patulina/Patulin
PCC	Puntos de control críticos /Critical control points
PCR	Polymerase chain reaction/Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Potato dextrose agar/Agar patata glucosa
PMP	Pathogen modeling program/ Modelos matemáticos aplicados a bases de datos para la predicción y gestión de patógenos
ppb	Partes por billón/parts per billion
ppm	Partes por millón/parts per million
PSA	Potato sucrose agar/Agar patata sacarosa
qPCR	Quantitative PCR/PCR cuantitativa
RAPD	Random amplified polymorphic DNA/DNA Polimórfico Amplificado
RASFF	European Community's Rapid Alert System for Food and Feed/Sistema de Alerta Rápida de la Comunidad Europea
rDNA	Ribosomal DNA (DNA sequence that codes for ribosomal RNA)/ DNA ribosómico
RFLPs	Restriction fragment length polymorphism/Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ribonucleic acid/Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction/Transcripción inversa cuantitativa por reacción en
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction/Transcripción inversa por reacción en cadena
SCF	Commission's Scientific Committee for Food
SFE	Supercritical fluid extraction/Extracción con fluidos supercríticos
SPE	Solid phase extraction/Extracción en fase sólida
SR	Superficies de respuesta/Response surfaces
T-2	Toxina T-2/Toxin T-2
TOF	Time of flight/ Tiempo de vuelo
tRNA	Transfer ribonucleic acid/ Ácido ribonucleico de transferencia
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias/Colony forming units (CFU)
UHT	Ultra high temperatura/Temperatura elevada
UK	United Kingdom
USDA	United States Department of Agriculture
UVD	Ultraviolet detector/Detector de ultravioleta



# I. INTRODUCCIÓN





## I. Introducción General

---

### I.1. Micosis y micotoxicosis. Micotoxinas

---

Durante las últimas décadas, la contaminación de alimentos y piensos por micotoxinas se ha convertido en uno de los principales temas de interés en salud pública y en seguridad alimentaria debido a sus posibles efectos agudos y crónicos en la salud tanto humana como animal. De acuerdo con una estimación realizada por la FAO (Cazzaniga et al., 2001), el 25% de la producción anual de cereales estaba afectada por la presencia de hongos toxigénicos.

En vertebrados, los efectos en la salud producidos por hongos se pueden clasificar en micosis y micotoxicosis. Se entiende por micosis al conjunto de patologías provocadas por el crecimiento del hongo en los vertebrados huéspedes. Las patologías incluidas dentro de las micosis incluyen desde afecciones leves como las dermatofitosis, siendo la más conocida el “pie de atleta” o tinea pedis, a afecciones muy graves como la aspergilosis o la cigomicosis.

Los hongos que causan micosis pueden dividirse en dos categorías según si pueden afectar a individuos con sistemas inmunes normales (patógenos primarios) o afectar a individuos con sistemas inmunes comprometidos (patógenos oportunistas), siendo estas últimas las micosis habituales en humanos. Aunque los mecanismos de patogénesis son complejos, la vía de entrada de la mayoría de micosis es a través del sistema respiratorio (Bennett et al., 2003).

Las micotoxicosis son el conjunto de enfermedades ocasionadas por la exposición a un conjunto grande y variado de metabolitos secundarios producidos por los hongos y denominados micotoxinas. Los metabolitos secundarios son compuestos que no son necesarios para el crecimiento y metabolismo de los hongos, como serían, entre otros, aminoácidos, proteínas o ácidos nucleicos. A diferencia de las micosis, la mayoría de las micotoxicosis se originan por ingestión de alimentos o piensos contaminados por micotoxinas y se caracterizan porque todas ellas tienen una gran variedad de efectos tóxicos, a través de diversas rutas metabólicas, en personas y

animales. Al ser compuestos muy solubles en lípidos, son fácilmente absorbibles por el organismo, siendo sus vías de entrada en el organismo la ingesta de alimentos y bebidas, la respiración y a través de contacto por la piel.

El origen del concepto de micotoxina, cuyo término proviene del griego *mikes* (hongo) y *toxikon* (veneno), hay que situarlo en una crisis alimentaria producida en 1962 en Londres (Inglaterra), en la que fallecieron en torno a 100000 crías de pavo al ingerir frutos secos contaminados con aflatoxinas, micotoxinas producidas por *Aspergillus flavus*. Esto originó el interés por el estudio de otros posibles metabolitos secundarios producidos, que pudieran afectar a la salud humana o animal, reconociéndose posteriormente otras micotoxinas como la patulina, o los alcaloides del conerzuelo del centeno. Desde entonces, y especialmente durante las décadas de los años sesenta y setenta del siglo XX, numerosos grupos de investigación centraron sus esfuerzos en la identificación de micotoxinas, conociéndose actualmente en torno a 400 de ellas (Atkins y Norman, 1998; Richard, 2007). Se considera que, entre las posibles funciones que tendrían las micotoxinas para sus hongos productores, estaría la de ejercer una función reguladora en su metabolismo y diferenciación y tener un papel ecológico al favorecer la competencia entre el hongo y las posibles bacterias presentes por los nutrientes del sustrato (Moss, 1996).

Todas las micotoxinas son compuestos de bajo peso molecular producidos por hongos filamentosos, que constituye un conjunto grande y heterogéneo que únicamente tienen en común su capacidad para producir enfermedades o la muerte en seres humanos y animales. Aunque todas las micotoxinas son metabolitos fúngicos tóxicos, no todos los metabolitos tóxicos producidos por hongos se consideran micotoxinas. Así, aquellos metabolitos tóxicos para bacterias se denominan antibióticos, y para plantas, fitotoxinas. Además, otro requisito para que un metabolito fúngico sea considerado micotoxina es que además de ser tóxico para vertebrados, debe serlo en bajas concentraciones. Por ejemplo, el etanol puede ser un metabolito secundario producido por hongos, pero no puede ser considerado micotoxina porque para provocar efectos tóxicos es necesario su ingestión en grandes dosis.

Actualmente existen distintas clasificaciones para las micotoxinas. Así, según el órgano afectado por ellas, las micotoxinas pueden clasificarse en hepatoxinas (hígado), nefrotoxinas (riñón), neurotoxinas (sistema nervioso) o

inmunotoxinas (sistema inmune). A nivel bioquímico también se pueden clasificar en teratógenas, mutágenas, carcinógenas o alérgenas.

## I.2. Evolución histórica

---

Las micotoxicosis han influido en la historia de la humanidad ocasionando cambios demográficos, políticos y culturales, aunque su aparición actualmente solamente afecta a pequeños grupos de población como escuelas, empresas, etc.

Existe la teoría de que la décima plaga bíblica, descrita en el Éxodo de la Biblia, pudo ser causada por micotoxinas. Esta teoría se basa en la erupción de un volcán y posterior explosión de su caldera, situado en la isla Santorini (Grecia) y producida en los siglos XVI o XV a.C. Dicho fenómeno afectó a una amplia zona del Mediterráneo y especialmente a Egipto.

Debido a la misma, se originaron una gran cantidad de cenizas ricas en sulfatos, lo que provocó una acidificación de las aguas del Nilo y que también adquirieran una coloración rojiza, que explicaría la primera de las plagas descritas en el Éxodo ("*Las aguas se convirtieron en sangre*"). El exceso nivel ácido de las aguas del Nilo provocó la muerte de la población de peces existentes y una alteración sustancial de la cadena trófica. Este hecho, junto con los efectos provocados por la explosión del volcán, explicaría las siguientes ocho plagas bíblicas. La explicación de la décima plaga descrita en el Éxodo como la muerte de los primogénitos en las familias egipcias, tendría su origen en la escasez de alimentos que se originó cuando los sedimentos del Nilo no pudieron fertilizar los campos de cultivo, fuente de alimento principal de la población. Esto provocó importantes pérdidas en las cosechas y la consiguiente aparición de hambrunas en la población.

Antiguamente existía la tradición de una especial protección para los hijos primogénitos de cada familia, al ser los herederos del patrimonio familiar. Esto implicaba que, en períodos de carestía de alimentos, estos tuvieran prioridad en el acceso a alimentos. Los primogénitos descritos en la décima plaga pudieron ser alimentados con las reservas de grano existentes y almacenadas durante largos periodos de tiempo, que muy posiblemente, y debido a las condiciones de temperatura y humedad existentes en los silos, estuvieran contaminados con altos niveles de micotoxinas, lo cual provocó su muerte por micotoxicosis aguda. Tras la muerte de los primogénitos, el faraón (posiblemente Ramsés II de la decimonovena dinastía, 1301-1234 a. C)

decidió la liberación del pueblo judío y su emigración a la tierra prometida (Mart y Maloy, 1996).

Aunque en la Biblia aparecen diversas normas de higiene relativas a la prevención de la contaminación de los alimentos por hongos, podemos considerar a los romanos como los precursores en su prevención. Debido a su preocupación por la contaminación de alimentos y cosechas por hongos, los romanos asignaron dentro de su mitología, a partir del s. VII a.C., la protección de cosechas y árboles al dios Robigo (en latín Robigus). En su honor, y para rogar la protección de sus cultivos frente a la roya negra (*Puccinia graminis*), hongo que contaminaba sus cosechas, establecieron la festividad denominada “Robigalia”, que se celebraba el 25 de abril, época en la que se empezaban a formar las espigas de grano y cuando más probablemente estas se vieran afectadas. La festividad consistía en una procesión que, partiendo del centro de Roma, finalizaba a las afueras de la ciudad donde una oveja y un perro eran sacrificados por un sacerdote denominado en latín “flamine quirinale”, para rogar al dios Robigo la protección de las cosechas de ese año. Esta festividad fue aceptada por el cristianismo, conociéndose posteriormente como la festividad de San Marcos, y hasta el siglo VII una procesión similar se mantuvo con idéntico objetivo (Peraica y Rašić, 2012; Richard, 2007).



**Figura 1.** Una sección del calendario romano “Fasti Praenestini”, con la referencia a la festividad de Robigo (inferior derecha de la imagen).



En Europa, la única micotoxicosis de proporciones epidémicas de la que se tiene constancia a lo largo de los siglos fue la enfermedad denominada ergotismo provocado por la ingestión de los alcaloides (micotoxinas) producido por los hongos del género *Claviceps* (*C. purpurea* y *C. fusiformis*), conocido también como cornezuelo del centeno o ergot. Este es un hongo patógeno del centeno, aunque puede afectar a otras especies de cereales y vegetales. En el suelo, permanece en su forma inactivada o esclerocio y si la primavera es húmeda y de temperatura templada, se desarrolla en forma de tallo en cuya cabeza, con forma esférica se encuentran las ascosporas, responsables de la contaminación del centeno y que son liberadas en torno a los ocho días de la formación del tallo. A partir de dichas esporas se originarían micelios y posteriormente, esclerocios.



**Figura 2.** Cornezuelo del centeno (esclerocios). Adaptado de <http://www.microbiologysociety.org/> y <http://www.mdpi.com>

El ergotismo es la micotoxicosis provocada por la ingestión de los alcaloides de ergot, de los cuales se conocen más de 40 tipos, y entre los que están la ergolina y la ergotamina, precursora del ácido lisérgico. Se caracteriza por la aparición de episodios de vasoconstricción periférica que puede provocar fasciculación, dolor y gangrena, así como la aparición de diferentes alteraciones en el sistema nervioso central. El ergotismo es probablemente la primera micotoxicosis de la que se tenga mención escrita, ya que en una tablilla cuneiforme asiria (600 a.C.) aparece la mención “*pústula nociva en la espiga*” (van Dongen y de Groot, 1995).

En Europa, durante la Edad Media, recibió varios nombres en los países europeos tradicionalmente productores de centeno (Francia,

Alemania), siendo denominado como *ignis sacer* (fuego sagrado), o fuego de San Antonio, debido a la sensación de quemazón que sufrían en las piernas las personas afectadas. La primera mención al ergotismo gangrenoso aparece en *Annales Xantenses* (857 d.C.), en la que en la crónica del saqueo de la iglesia de Xanten (baja Renania, Alemania), se menciona que “*una gran plaga de ampollas hinchadas consume a la gente debido a una podredumbre repugnante tal que los miembros se aflojan y caen antes de la muerte*”. Durante los siguientes siglos, diferentes brotes epidémicos de ergotismo fueron produciéndose frecuentemente asociados con periodos de hambrunas y periodos de guerra prolongados, en los que era usual el consumo de centeno almacenado durante grandes periodos de tiempo y contaminado por ergot. Por ejemplo, en el año 994 d.C., surgió en la región de Aquitania y Limousin una epidemia de ergotismo que causó más de 40000 víctimas (Peraica y Rašić, 2012).

En el siglo XI, las reliquias de San Antonio fueron traídas a Francia desde Constantinopla, y al ser el santo asociado a la protección del fuego, casi de inmediato también se le asoció al mismo la protección frente al ergotismo o “fuego sagrado”. Tras la fundación de la Orden de San Antonio, en Vienne (Francia) y su reconocimiento por parte del Papa Urbano II en 1093 d.C., su devoción se popularizó, considerándose la visita a su santuario la mejor cura frente al ergotismo. La mejoría de los pacientes podría explicarse debido a que, en el viaje de peregrinación, que duraba varias semanas, se cesaba la exposición a la comida contaminada por ergot.

A partir del Renacimiento, los grandes brotes epidémicos de ergotismo fueron reemplazados por brotes pequeños y localizados en Francia, Alemania, Inglaterra, Irlanda, Noruega, Suecia y Rusia. Existe la teoría que el famoso caso de “las brujas de Salem”, fue un ejemplo de estos, ya que los síntomas descritos en las afectadas (desórdenes en el habla, alucinaciones, convulsiones y espasmos) pueden ser asociados al ergotismo. El brote epidémico en cuestión, se originó en la pequeña población puritana de Salem entre diciembre de 1691 y agosto de 1692, afectando principalmente a niñas y mujeres jóvenes. La primavera y verano precedentes a la cosecha fueron lluviosos y calientes, lo que pudo provocar la contaminación de la cosecha de centeno con cornezuelo del centeno. Tras los juicios, veinte personas fueron ejecutadas por brujería y dos más murieron en prisión (Caporael, 1976).



**Figura 3.** Retablo de Isenheim Matthias Grünewald (1512-1516). Individuo afectado por ergotismo.

Adaptado de <http://www.chemistryviews.org/>

La Segunda Guerra Mundial fue el primer conflicto bélico en el que se recopilaron datos epidemiológicos asociados a posibles episodios de micotoxicosis en los combatientes y la población civil. En varias regiones de la antigua URSS, en 1942, se describieron brotes de episodios hemorrágicos por consumo de pan preparado a partir de cereales que habían quedado abandonados en los campos de cultivo. Posteriormente se estableció que estos episodios correspondían a una micotoxicosis producida por hongos *Fusarium* (principalmente *F. poae* y *F. sporotrichoides*), que implica una caída sustancial del nivel de leucocitos (leucopenia) y que se denominó aleucia tóxica alimentaria (ATA). La fase clínica de la ATA se caracteriza por una primera fase aguda que se produce horas posteriores a la ingesta de las toxinas y cuyos síntomas más frecuentes son la irritación de las membranas de las mucosas del sistema digestivo superior (cavidad bucal y faringe), vómitos, debilidad y sensación de quemazón bucal. Si la exposición a las toxinas continúa, el paciente entra en la fase crónica de la enfermedad en la que un examen hematológico revela leucopenia, granulopenia, trombocitopenia y linfocitosis, que deriva en agina severa, episodios hemorrágicos, y la aparición de erupciones rojizas cutáneas (erupción petequiral). En la última fase de la enfermedad, la deglución se vuelve dolorosa

debido a la aparición de fenómenos necróticos o gangrenosos faríngeos, pudiendo causar la muerte por estrangulación, y la aparición de hemorragias severas nasales, orales, gástricas e intestinales (Peraica y Rašić, 2012).

Según varios autores, en 1942 se produjo en Kolkata (Bengala) uno de los mayores brotes registrados de micotoxiosis. El clima de desobediencia civil y de no cooperación promovido en la zona por Gandhi, originó escasez en los suministros. Tras el ataque por el ejército japonés y ante la falta de alimentos, las autoridades locales recurrieron a los silos de grano almacenados que estaban visiblemente contaminados por hongos para intentar paliar la que posteriormente fue conocida por la “hambruna de Bengala de 1943”. Se estima que la combinación de la falta de alimento y los episodios de micotoxiosis aguda provocó más de tres millones de víctimas (Meggs, 2013).

---

## 2. Características y taxonomía de los hongos

---

El término hongo (en latín “fungi”) designa a un conjunto de organismos eucariotas, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se estima que pueden existir hasta 1,5 millones de especies (Hawksworth, 1991) aunque este número podría ser considerablemente más amplio (Hawksworth, 2001).

Desde su establecimiento por Linneo en 1753, el nombre aplicado a cualquier hongo es binomial, compuesto por su género en mayúscula seguido por su especie inferior, ambos escritos en cursiva o subrayados. El Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (ICBN, “International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants”), es el compendio internacional que recoge y rige el conjunto de normas y procedimientos aplicadas a la taxonomía de los organismos vegetales (hongos, plantas y algas).

Inicialmente, los hongos se clasificaron dentro del reino *Plantae*. Sin embargo, a partir del desarrollo y aplicación de la biología molecular en la taxonomía de hongos, la clasificación tradicional de los hongos sufrió importantes cambios, demostrando su mayor proximidad al reino *Animalia* que al reino *Plantae* donde tradicionalmente eran incluidos. Otros hechos diferenciales descubiertos a nivel taxonómico, fue la caracterización molecular de las paredes celulares de los hongos, que tienen como componente estructural fundamental la quitina y otros polisacáridos en lugar de celulosa

(plantas) o proteínas (animales), y el hecho de que las células fúngicas carecen de cloroplastos y clorofila. Por todo ello, actualmente los hongos se clasifican en un reino separado denominado *Fungi*, junto con los reinos *Procariota*, *Eucariota*, *Protista*, *Animalia* y *Plantae*.

Dentro del reino *Fungi*, tradicionalmente los hongos se han clasificado en subreinos o *Phyla* basados en las diferencias de su forma esporulada sexual y su comportamiento en el medio ambiente. Actualmente, y de forma extendida se reconocen cuatro subreinos del reino *Fungi*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Chytridiomycota*. Hasta la realización de los análisis filogenéticos realizados en las últimas décadas, también se consideró como subreino *Deuteromycota*, hongos con esporas asexuales, pero actualmente, casi en su totalidad, se le ha incluido dentro del subreino *Ascomycota*.

Los hongos pertenecientes al subreino *Zygomycota* se caracterizan por tres rasgos distintivos: Un rápido crecimiento (2-4 días) en placa de Petri con medio agar extracto de malta, su reproducción por esporangiosporas, y por su crecimiento de micelios no septados.

A diferencia de los anteriores, los hongos del *phylum Ascomycota*, se caracterizan por la producción de micelios septados con un crecimiento más lento y por la producción de ascosporas, esporas sexuales características de este subreino y que se encuentran dentro de unas bolsas denominadas asci (en singular, asca). Junto a estas esporas sexuales, los hongos pertenecientes a *Ascomycota* a menudo producen esporas asexuales, denominadas conidios.

El subreino *Basidiomycota* es probablemente el *phylum* de los hongos más conocidos ya que incluye los hongos más populares: las setas y los champiñones. Se caracterizan principalmente por sus esporas sexuales, denominadas basidiosporas, producidas en los basidios, células especializadas productoras de estas esporas y característicos de este subreino. Por último, el subreino *Chytridiomycota* se caracteriza por incluir hongos predominantemente acuáticos, saprófitos (degradan quitina y queratina), por tener estructuras exclusivas en sus ribosomas denominadas rumposomas, y por sus células sexuales o zoosporas que se caracterizan por ser esporas pequeñas en cuyo extremo disponen de un gameto uniflagelado.

En relación a su morfología de crecimiento y de adaptación al medio, las formas más comunes que presentan los hongos son dos: filamentosas y como levaduras unicelulares. Ambas formas de crecimiento no son excluyentes y de hecho existen varias especies, denominadas hongos dimórficos, capaces de adoptar ambas formas de crecimiento en función de las circunstancias medioambientales.

Los hongos filamentosos se caracterizan porque, durante su crecimiento, se puede observar la presencia de unas estructuras multicelulares, largas y ramificadas denominadas hifas, cuya función es la de facilitar la diseminación de sus esporas reproductivas. Dependiendo de la especie fúngica y las condiciones ambientales para su crecimiento, el diámetro de las hifas puede variar entre 1 a 30  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentra entre 5-15  $\mu\text{m}$  y en la mayoría de ellos, estas son tabicadas, mediante separaciones denominadas septa (en singular, septo). El crecimiento de las hifas se produce a partir de la germinación de las esporas, y en otras ocasiones, a partir de fragmentos de otras hifas, dando lugar a estructuras ramificadas complejas denominadas micelios. En una colonia desarrollada, se produce la diferenciación en las funciones del micelio, existiendo una parte (micelio reproductivo o aéreo), que se separa del sustrato para originar las estructuras reproductivas, y otra (micelio vegetativo), que penetra dentro del sustrato con funciones nutritivas.

Los hongos levaduriformes pertenecen en su gran mayoría a los subreinos *Ascomycota* y *Basidiomycota* y se caracterizan porque sus células se reproducen de forma asexual, mediante germinación o fisión, y porque estas pueden tener un tamaño entre 1-10  $\mu\text{m}$  de ancho y entre 2 y 50  $\mu\text{m}$  de longitud. En medio de crecimiento agar, las colonias de hongos levaduriformes pueden presentar una gran diversidad de texturas, geometrías y colores.

La mayoría de los hongos presentan dos formas de reproducción: sexual y asexual. En función de su forma de reproducción, reciben la denominación de hongos perfectos o en estado teleomórfico cuando se encuentran en su fase de reproducción sexual, y la denominación de hongos imperfectos o en estado anamórfico, para su fase de reproducción asexual. Es habitual que, para un mismo hongo, reciba dos denominaciones en función del estado sexual en que se encuentre.

Tanto en la forma de reproducción asexual como sexual los hongos se reproducen habitualmente mediante la producción de esporas. En su estado

asexual, además de la producción de esporas asexuales, los hongos también pueden reproducirse, aunque de forma menos frecuente, a través de la fragmentación de hifas. En su estado sexual, los hongos se reproducen a través de la producción de una gran cantidad de esporas, cada una de ellas con capacidad para producir una nueva colonia, y de morfología muy variada, lo cual resulta de interés para su clasificación taxonómica, como se ha visto anteriormente.

Los hongos son organismos quimioheterotróficos, con necesidades nutricionales relativamente simples. Mediante absorción, utilizan la degradación de compuestos orgánicos para cubrir sus necesidades energéticas y químicas. Además, pueden actuar como patógenos oportunistas en plantas y animales.

La gran mayoría de los hongos son aerobios, y muchos de ellos, microaerófilos, es decir, que la tensión parcial de oxígeno óptima es menor a la normal en condiciones atmosféricas. Algunas levaduras son anaeróbicas facultativas, pero para su crecimiento en esas condiciones, requieren de la presencia de esteroides y determinados ácidos grasos.

En condiciones aeróbicas, la mayoría de los hongos son capaces de sobrevivir si en su medio disponen de glucosa, sales amónicas, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento, y fruto de dicho metabolismo, se originan metabolitos secundarios, no esenciales para su crecimiento vegetativo, entre los cuales se encuentran **las micotoxinas**, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

### **3. Factores determinantes en la producción fúngica de micotoxinas**

---

Las micotoxinas se originan principalmente durante el crecimiento fúngico. Existen distintos factores que pueden afectar al mismo y a la biosíntesis y acumulación de micotoxinas, entre los que hay que destacar los siguientes:

- Actividad de agua ( $a_w$ )
- Concentración de iones hidrógeno (pH)
- Temperatura

- Composición de la atmósfera: Tensión parcial de oxígeno y dióxido de carbono
- Sustrato
- Prácticas agrícolas: uso de fungicidas
- Otros factores

Los efectos e interrelaciones de estos factores en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas han sido estudiados por varios autores, usando modelos cinéticos matemáticos (Baranyi y Roberts, 1994; Dantigny et al., 2007, 2006; García et al., 2009; Mousa et al., 2011), a partir de los desarrollados para crecimiento bacteriano (Marks, 2008; Whiting, 1995), y que pueden ser clasificados en primarios, secundarios y terciarios, en función de si en el estudio del crecimiento fúngico en el tiempo (modelos primarios), se tienen en cuenta además, factores ambientales como la temperatura, pH, etc. (modelos secundarios) y se integran en aplicaciones informáticas (modelos terciarios).

Además, es necesario resaltar la influencia del cambio climático global en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. Se define como cambio climático al conjunto de alteraciones que se están produciendo en el clima a nivel mundial (calentamiento global, aumento de lluvias torrenciales y sequías, etc.) producido por la acumulación en la atmósfera, de metano, dióxido de carbono, óxidos nitrosos y clorofluorocarbonos (IPCC, 2007). Actualmente, se están realizando estimaciones sobre la posible influencia del cambio climático en la incidencia de contaminación fúngica micotoxigénica en cultivos, y el aumento de la presencia de las principales micotoxinas (Magan et al., 2011; Miraglia et al., 2009; Paterson y Lima, 2011, 2010).

Se estima que, en los próximos 20 años en el conjunto de Europa, la temperatura subirá entre 2-5 °C. En relación a aflatoxinas el informe elaborado para la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Battilani et al., 2012), estimó que, para países y regiones del sur de Europa con subidas de temperatura estimadas medias de 4-5 °C (centro y sur de España, Italia, Grecia, Bulgaria, Albania, Chipre y norte de Portugal), y que corresponden a zonas no habituales en la producción de maíz, el riesgo de presencia de aflatoxinas asociado al cambio climático era alto. Sin embargo, en los países europeos habituales productores de maíz (Rumania, Francia, Hungría y norte de Italia), con estimaciones en aumento de temperatura de 3-4 °C, el riesgo



derivado era medio-bajo. Se estimó como bajo el riesgo para el resto de los países de la UE, y como muy bajo, el riesgo de la presencia de aflatoxinas en otros cereales como trigo o arroz (European Commission, 2007).

Aunque la información disponible sugiere que mayores concentraciones de dióxido de carbono, y su interacción con la temperatura y la actividad de agua puede estimular el crecimiento de algunas especies fúngicas toxigénicas (Magan et al., 2011) no existen estudios concluyentes que permitan establecer modelos predictivos que relacionen el cambio climático con el aumento en la incidencia de otras micotoxinas, como deoxinivalenol y otros tricotecenos, fumonisinas o zearalenona. (Magan et al., 2011; Paterson y Lima, 2011).

### **3.1. Actividad de agua**

---

A nivel microbiológico, el concepto de actividad de agua fue introducido en el año 1957 (Scott, 1957), para establecer la relación existente entre el crecimiento de microorganismos y el contenido de humedad del mismo. Se define como el cociente entre la presión parcial de vapor de agua en el sustrato (P) y la presión parcial de vapor de agua pura en las mismas condiciones (P<sub>0</sub>):

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

Se trata por tanto de un concepto equivalente, en términos numéricos, al concepto de humedad relativa (HR), y está íntimamente relacionado con la cantidad de agua disponible metabólicamente. Sus valores se encuentran dentro del intervalo 0 a 1, aunque el valor de  $a_w$  de todos los organismos vivos se encuentra en el rango 0,6 a 1,0.

Para realizar su medición mediante métodos analíticos, habitualmente se utiliza el término potencial de agua ( $\Psi$ ), cuya unidad es el pascal (Pa), y que se define como la fracción disponible del contenido de agua en un sustrato, necesaria para el crecimiento microbiano o fúngico. Es la suma de los potenciales osmóticos, matricial y de turgor, y se relaciona matemáticamente con la  $a_w$ , a través de la expresión matemática ( $\Psi$ )= RT/V log<sub>n</sub>  $a_w$  (+P), donde R es la constante universal de los gases ideales, T es la temperatura absoluta en grados kelvin, P es la presión atmosférica y V es el volumen molar de agua (Palazzini et al., 2009).

En el caso de los hongos, la disponibilidad de agua determina de forma importante su velocidad de crecimiento, su tasa respiratoria, la velocidad de germinación de esporas y, a nivel metabólico, la producción de metabolitos secundarios y, por tanto, de micotoxinas. Es por ello, que sea el factor ambiental predominante en la contaminación fúngica de piensos o alimentos y la posible contaminación posterior por micotoxinas (Brown, 1974; Huang et al., 2010; Llorens et al., 2004a, 2004b, Ramirez et al., 2006, 2004; Ritchie et al., 2006).

Los hongos son capaces de crecer a bajas actividades de agua (Pitt, 1975; Lacey y Magan, 1991), y aquellos capaces de hacerlo por debajo de un valor de  $a_w$  de 0,85, se denominan hongos xerófilos. Dentro de estos últimos se encuentran especies como *Xeromyces bisporus* capaz de crecer en grano desecado con una  $a_w$  de 0,65, o *Eurotium halophilicum*, en frutas desecadas y con  $a_w$  de 0,70. Sin embargo, los principales hongos productores de micotoxinas requieren, para su crecimiento y producción de las mismas, de actividades de agua superiores, como se trata con más detalle en el apartado cuarto de esta introducción.

Hay que destacar que, para cada especie fúngica, los rangos de  $a_w$  óptimos para su crecimiento y para la producción posterior de micotoxinas no coinciden, siendo estos últimos más restrictivos. Además, hay que tener en cuenta las posibles interacciones entre la actividad de agua y otros factores fisicoquímicos (temperatura, pH, presión parcial de gases (oxígeno y dióxido de carbono), o bióticos (sustrato, variabilidad de la especie fúngica) que pueden influir en los mismos (Lacey y Magan, 1991; Simatos, 1988; Dantigny et al., 2007; Gottlieb, 1978; Magan y Olsen, 2004; Ritchie et al., 2006; Magan et al., 2004).

## 3.2. Temperatura

---

Junto con la actividad de agua, la temperatura es el otro factor decisivo en el crecimiento fúngico, así como en su capacidad para producir micotoxinas. Aunque cada especie fúngica tiene una temperatura óptima de crecimiento y producción de esporas, la temperatura de crecimiento, para la mayoría de ellas, se encuentra en torno a los 25 °C, siendo los extremos del intervalo -4 °C y 65 °C.

Al igual como ocurría con la actividad de agua, el rango de temperatura en la producción de micotoxinas no coincide con el rango de crecimiento del

---

hongo productor, siendo además ambos, específicos para cada cepa (Lacey, 1989).

Así, *Aspergillus flavus*, tiene una temperatura óptima de crecimiento ( $t_{opt}$ ) de 35 °C, mientras que la temperatura de producción ( $t_{prod}$ ) de aflatoxinas se produce a una temperatura de 33 °C, *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum* tienen una  $t_{opt}$  de 30 °C, mientras que la  $t_{prod}$  de fumonisinas está dentro del rango de 15-30 °C. *F. graminearum* y *F. culmorum* tienen una  $t_{opt}$  de 20-22 °C y de 20-25 °C respectivamente, mientras que la  $t_{prod}$  de deoxinivalenol es de 30 °C para el primero y de 26 °C para el segundo. *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *A. carbonarius* tienen una  $t_{opt}$  de 30 °C, 26 °C y 25-30 °C respectivamente, mientras que la ocratoxina A se produce a una temperatura de 25-30 °C, 25 °C y 30 °C respectivamente. Para *Penicillium expansum* la  $t_{opt}$  está dentro del rango de 25-30 °C mientras que la patulina se produce a una  $t_{prod}$  de 10 °C y finalmente *Alternaria alternata* y *Claviceps sp.* tienen una  $t_{opt}$  de 23 °C y 30 °C, respectivamente, mientras que las toxinas de *Alternaria* se producen a una  $t_{prod}$  de 25 °C, y los alcaloides del ergot, a una  $t_{prod}$  de 30 °C (Paterson y Lima, 2011; Sanchis y Magan, 2004).

Hay que tener en cuenta que estos valores de temperatura se encuentran influenciados e interrelacionados por otros parámetros ambientales, especialmente por la  $a_w$ , por lo que deben ser valorados en su conjunto (Magan y Alfred, 2007; Sanchis y Magan, 2004).

### **3.3. Concentración de iones hidrógeno (pH)**

---

Debido a que, a altas actividades de agua, los hongos compiten en el sustrato con las bacterias, el pH juega un papel determinante en su crecimiento. El crecimiento microbiano, salvo excepciones, disminuye sustancialmente para valores inferiores a 5, a diferencia del de los hongos, el cual se ve poco afectado en rangos de 3 a 8 (Holmquist et al., 1983; Wheeler et al., 1991). No obstante, para la mayoría de las especies fúngicas, el pH óptimo de crecimiento se encuentra en torno a 5,5, dentro de un intervalo de 4 y 7, por lo que otros factores como la actividad de agua será determinante en su crecimiento. Así, para valores de  $a_w$  de 0,9, la competencia entre hongos y bacterias se inclina por los primeros, y para valores superiores, por los segundos. En sustratos con elevada  $a_w$  y pH neutro, ciertas especies de *Aspergillus* o *Penicillium* tienen capacidad de colonizarlos, incluso con la presencia de bacterias no patógenas (Wheeler et al., 1991). Algunos estudios

han demostrado que, en valores acusados del pH, se puede producir un aumento en la producción de micotoxinas, debido a un aumento en la expresión de determinados genes, como en fumonisinas (Flaherty et al., 2003; Niu et al., 2015), deoxinivalenol (Gardiner et al., 2009) y aflatoxinas (Ehrlich et al., 2005).

### 3.4. Composición de la atmósfera

---

Los hongos productores de micotoxinas son aerobios y requieren, por tanto, condiciones de aerobiosis (presencia de oxígeno) tanto para su crecimiento como para la producción de micotoxinas. Como término medio, requieren la presencia de un 20-22 % de oxígeno en su atmósfera (Pitt y Hocking, 2009b; Weidenborner, 2011). Aunque los dos factores predominantes que afectan al crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas son la temperatura y la  $a_w$ , diversos estudios han demostrado como la composición gaseosa de la atmósfera puede también influir en ambos (Dantigny et al., 2007; Pitt y Hocking, 2009b; Ramirez et al., 2004; Sweeney y Dobson, 1998). De hecho, la mayoría de los hongos productores de micotoxinas son sensibles a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Pitt y Hocking, 2009b).

Es posible reducir el crecimiento y la producción de micotoxinas mediante la alteración de la atmósfera gaseosa de los alimentos, pero se han de aplicar condiciones muy extremas para llegar a inhibir totalmente ambos procesos. En el estudio realizado por Samapundo et al. (2007), se comprobó que, con una concentración del 30% de CO<sub>2</sub> en la atmósfera a valores de  $a_w$  elevados, se inhibía la producción de fumonisina B<sub>1</sub> por parte de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, mientras que en el realizado por Giorni et al (2008), se comprobó que para una  $a_w$  entre 0,92 y 0,95, se requería un 75% de CO<sub>2</sub> para inhibir el crecimiento de *Aspergillus flavus*, mientras que para inhibir la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> se requería al menos el 50% de CO<sub>2</sub>.

La utilización de atmósferas controladas, regulando las concentraciones de O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, puede ser utilizada como estrategia para la prevención del crecimiento fúngico en alimentos y piensos (Lacey, 1989; Wambacq et al., 2016; Zhu et al., 2016).

### **3.5. Características del sustrato**

---

Los hongos productores de micotoxinas son saprófitos y pueden crecer en casi cualquier sustrato vegetal, aunque tienen predilección por aquellos con alto contenido en carbohidratos. Necesitan para su crecimiento, como se comentó anteriormente, la presencia en el sustrato de glucosa, sales amónicas, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento.

Las fuentes de carbono que pueden utilizar para la obtención de la glucosa son diversas, variando desde monosacáridos como glucosa y galactosa, hasta polisacáridos como celulosa, hemicelulosa, almidón o inulina. Al no tener capacidad de fijar nitrógeno (son no diazotróficos), necesitan el aporte de compuestos nitrogenados, pudiendo utilizar tanto formas orgánicas (aminoácidos, aminas y amidas, etc.) como inorgánicas (sales de amonio, urea, etc.).

En relación a sus necesidades de azufre, las fuentes habituales utilizadas por los hongos incluyen tanto formas orgánicas sulfuradas como inorgánicas, siendo las habituales sulfatos, sulfitos, tiosulfatos, glutatión y metionina, mientras que, para suplir sus necesidades de fósforo, necesario para la biosíntesis de ácidos nucleicos, glicofosfatos, ATP y fosfolípidos, los hongos utilizan fosfatos orgánicos. Los requerimientos fúngicos de minerales incluyen potasio y magnesio, así como de oligoelementos: calcio, cobre, hierro, manganeso, cinc, níquel y molibdeno, los cuales son obtenidos a partir de sus correspondientes sales. Por último, es necesario destacar como requerimiento necesario para el crecimiento fúngico, la biodisponibilidad de factores de crecimiento como vitaminas, purinas, pirimidinas, esteroides, ácidos grasos y nucleótidos necesarios para determinados procesos enzimáticos o estructurales (Pitt y Hocking, 2009b; Sweeney y Dobson, 1998).

### **3.6. Prácticas agrícolas: uso de fungidas**

---

Desde hace muchos años, y de forma habitual, se utilizan fungidas para evitar el crecimiento y proliferación fúngico tanto en alimentos como en piensos. Existe una gran variedad de fungidas cuyo espectro de acción varía en función del compuesto funcional, la dosis, la especie y cepa fúngica y las condiciones ambientales. Para su aprobación se requiere de la realización previa de estudios sobre sus mecanismos de acción, dosis efectivas, periodos

de seguridad y de toxicidad tanto en salud humana como su efecto a nivel medioambiental.

En función de su forma de penetración en el tejido vegetal para ejercer su función, pueden clasificarse en protectores, sistémicos y erradicadores. Los fungicidas protectores son aquellos que no penetran en la planta, pero afectan a la germinación del hongo en su superficie, siendo los más efectivos en prevención primaria de contaminación fúngica. Los fungicidas sistémicos, penetran en los tejidos vegetales y utilizan el sistema vascular del organismo vegetal para erradicar los hongos. Por último, los fungicidas erradicadores, son los fungicidas destinados a eliminar el hongo una vez se ha producido la contaminación, eliminando su crecimiento y reproducción (Kavanagh, 2011; Ramirez et al., 2004).

En los últimos años se ha incrementado el interés sobre el efecto de los fungicidas comerciales existentes y su posible efecto tanto en el crecimiento de hongos micotoxigénicos, como en la producción de micotoxinas en alimentos (Medina et al., 2007a, 2007b; Muri et al., 2009; Schmidt-Heydt et al., 2013) y en piensos (Zhu et al., 2016).

En el trabajo realizado por Schmidt-Heydt et al. (2013), se analizó la capacidad de siete plaguicidas comerciales (Aliette, Rovral, Cantus, Ortiva, Luna Experience, Fenomenal y Mancozeb) para inhibir el crecimiento de varias especies fúngicas (*Penicillium nordicum*, *P. verrucosum*, *Verticillium dahliae* y *Cladosporium sp.*) y la posible producción por parte de *P. nordicum* y *P. verrucosum* de ocratoxina A y citrinina, comprobándose que no solamente la inhibición era relativa, sino que en el caso del fungicida Rovral (un fungicida dentro del grupo de los imidazoles), se inducía la biosíntesis de micotoxina.

### **3.7. Interacciones microbianas**

---

En un determinado ecosistema, se producen interacciones entre los microorganismos presentes. En el caso del crecimiento fúngico micotoxigénico, estas interacciones se pueden producir tanto con otros hongos presentes, como con bacterias. Si el medio, por los factores que se han visto en esta introducción, es adecuado al crecimiento bacteriano, se reducirá drásticamente el crecimiento fúngico debido a que el crecimiento bacteriano es, por lo general, mucho más rápido, con la consiguiente disminución en los recursos nutritivos presentes. Si por el contrario, el medio es adecuado para el crecimiento fúngico, la competencia se establecerá entre

especies fúngicas principalmente (García et al., 2009; Klich, 2007; Sanchis y Magan, 2004; Xu et al., 2007).

En el estudio realizado por Velluti et al. (2000), se estudió los efectos de la  $a_w$  (0,98, 0,95 y 0,93) y la temperatura (15 y 25 °C) tanto en la colonización competitiva, en maíz, de *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, y *F. graminearum* como en la producción posterior de zearalenona y fumonisinas, comprobándose que la población de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* disminuía en presencia de *F. graminearum*. Así mismo, en presencia de *F. graminearum*, mientras que los niveles de producción de zearalenona no se vieron afectados, la biosíntesis de fumonisina B<sub>1</sub> producida por *F. proliferatum* se redujo completamente mientras que la de *F. moliniforme* disminuyó a 15 °C y aumentó a 25 °C.

En el estudio realizado por Marín et al. (1998), se realizó un estudio similar, utilizando los mismos valores de  $a_w$  y temperatura, pero estudiando la colonización competitiva de varias cepas *Aspergillus* y *Penicillium* en presencia de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium moniliforme*. Se comprobó que mientras que se reducía la presencia de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*, el comportamiento colonizador de *Penicillium* no se veía afectado.

Ahlberg et al. (2015) estudiaron la relación entre la presencia de bacterias ácido lácticas (LAB), utilizadas habitualmente en la elaboración de productos fermentados, y la producción de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus* presentes. Las bacterias LAB tienen un crecimiento considerablemente más rápido que *Aspergillus*, produciendo, por una parte, una disminución en el crecimiento del hongo, y por otra, una disminución de la cantidad de aflatoxinas producidas, debido a que tienen la capacidad de unirse de forma reversible con ellas. Este tipo de interacciones podrían ser utilizadas en un futuro como medidas de biocontrol en la producción de micotoxinas.

### **3.8. Presencia de insectos. Control de plagas**

---

Los daños ocasionados por insectos y artrópodos pueden contribuir a la infección y colonización fúngica, aunque no es una condición necesaria para que esta se produzca. Los insectos pueden, por una parte, actuar como vectores en la propagación de hongos micotoxigénicos, y por otra, favorecer

la infección y colonización en las zonas con daños físicos que puedan producir en granos o plantas (Beti et al., 1995; Dunkel, 1988).

Además de los posibles daños físicos en la estructura (pericarpo) de los granos de cereal, tallo de los vegetales, etc., también pueden interactuar con la población bacteriana presente y a través de su actividad metabólica (respiración, liberación de agua, etc.), alterar el crecimiento de la microbiota existente, favoreciendo el crecimiento de hongos toxigénicos (Abdullah et al., 2000; Lacey y Magan, 1991).

Por ello, se ha estudiado como medida preventiva tanto para el control de la infección fúngica como la posterior producción de micotoxinas, el uso de insecticidas (Atkins y Norman, 1998; Cox y Collins, 2002; Draughon y Ayres, 1981; Klich, 2007). Se ha demostrado que el uso de insecticidas como carbaril, diclorvos, naled, piretro y trimetacarb inhibe la biosíntesis de aflatoxinas (D'Mello y Macdonald, 1997; Draughon y Ayres, 1981).

Lo comentado es aplicable a otras plagas como artrópodos o roedores, que puedan afectar a los cereales u otros alimentos almacenados (Cox y Collins, 2002; Dowd, 2003; Draughon y Ayres, 1981). Así, en el estudio realizado por Leitao et al. (1987), se comprobó que, tras el uso durante 21 días del rodenticida/insecticida fosfina ("phosphine") la producción de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se redujo en un 10%. La aplicación de medios químicos de control de plagas para el control de la contaminación fúngica micotoxigénica o la producción de micotoxinas está sujeta a su viabilidad económica, lo cual no es factible en muchos casos (Dowd, 2003).

---

## **4. Principales micotoxinas**

---

### **4.1. Aflatoxinas**

---

Las aflatoxinas son uno de los grupos de micotoxinas más importante desde un punto de vista toxicológico. Se aislaron en Inglaterra por primera vez durante la década de los 60 del siglo XX, tras lo que se conoció como la "enfermedad X de los pavos", en la que murieron más de 100000 ejemplares por consumo de pienso con base en cacahuete, contaminado por hongos (Blout.1961, Goldblatt.1969).



---

#### 4.1.1. Hongos productores y naturaleza química

---

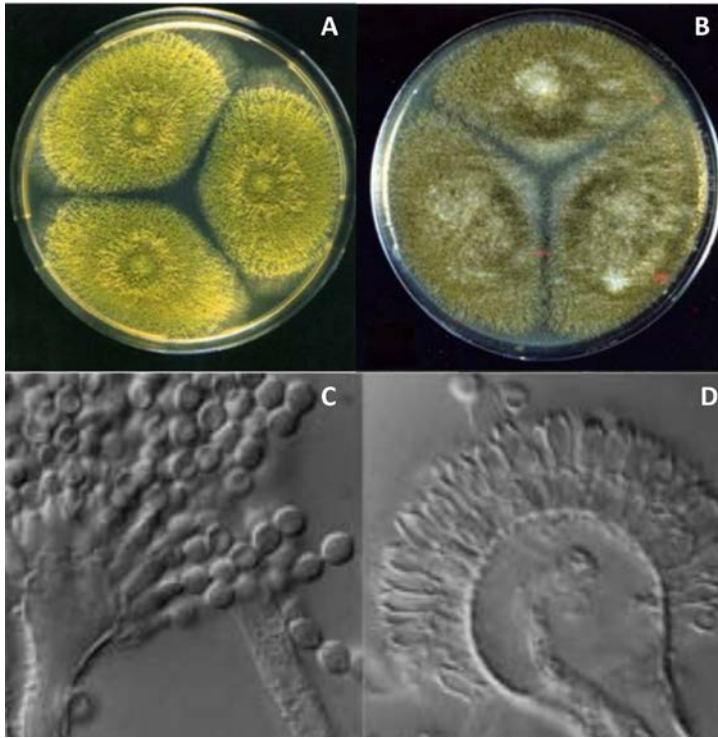
Las aflatoxinas son producidas por varios tipos de cepas del género *Aspergillus*, siendo las especies principales *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Otras especies de *Aspergillus*, *A. bombycis*, *A. ochraceus*, *A. nominus* y *A. pseudotamari* son también especies productoras de aflatoxinas (Peterson et al., 2001).

El rango de temperatura de crecimiento para *A. flavus* y *A. parasiticus* es de 10 a 43 °C, siendo la temperatura óptima 34-35 °C, mientras que el rango de temperaturas en la que producen aflatoxinas es de 12 a 40 °C (Magan y Lacey, 1984; Pitt y Hocking, 2009a; Sweeney y Dobson, 1998). En relación al pH, *A. flavus* y *A. parasiticus* crecen dentro del rango 2 a 11, siendo su pH óptimo de crecimiento entre 3,5 y 8, mientras que las aflatoxinas son producidas dentro de ese rango, aunque con un valor óptimo de pH de 6. La  $a_w$  óptima para el crecimiento de ambos es 0,99, con mínimos de 0,8-0,82, mientras que las aflatoxinas son producidas a  $a_w$  entre 0,95 a 0,99 (Koehler et al., 1985; ICMSF, 1996).

Las cuatro principales aflatoxinas se conocen como aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, denominadas así por la radiación fluorescente que emitían, cuando se identificaron por primera vez, bajo luz ultravioleta a 365 nm (B por “blue”, azul y G por “green”, verde), así como por su distinta movilidad en cromatografía de capa fina.

Aunque habitualmente se hace referencia a la aflatoxina B<sub>1</sub> cuando se hace mención a las aflatoxinas, se han descrito en torno a una docena de otras aflatoxinas (Heathcote y Hibbert, 1978), producto de la metabolización de las cuatro principales micotoxinas, en el tejido animal, y entre las que hay que destacar las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, metabolitos hidroxilados producto de la metabolización de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> respectivamente, encontradas principalmente en tejido animal y fluidos (orina y leche).

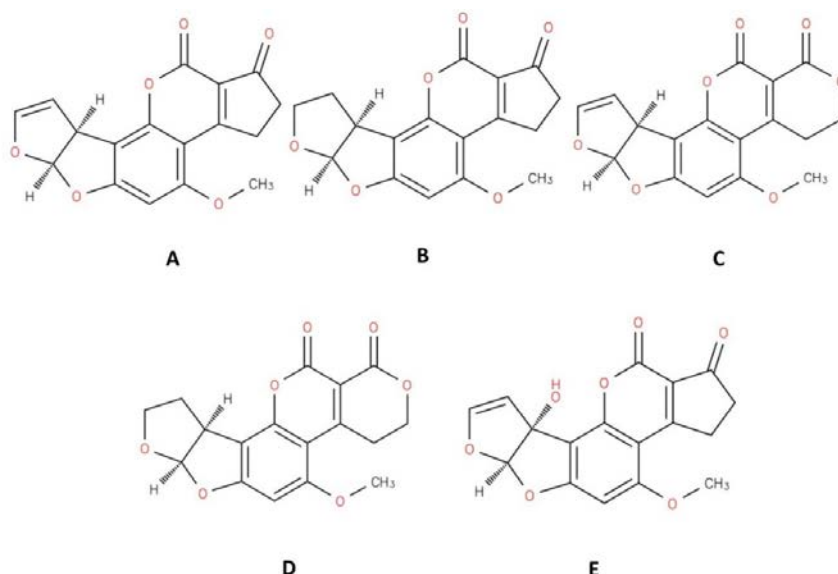
Las aflatoxinas son derivados difuranocumarínicos y se subdividen estructuralmente en dos grupos: difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFB<sub>2A</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFM<sub>2A</sub> y aflatoxicol) y difuro-cumaro-lactonas (AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>2A</sub>, AFGM<sub>1</sub>, AFGM<sub>2</sub>, AFGM<sub>2A</sub> y AFB<sub>3</sub>) (Weidenborner, 2011).



**Figura 4.** Colonias de *A. flavus* (A) y *A. parasiticus* (B) en medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) 10 días a 25 °C. Conidios de *A. flavus* (C) y (D). Adaptado de <http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/index.jsp> BCRC 32140 y 32423 y Mycobank MB 209842.

En estado sólido, las aflatoxinas son cristales con coloración blanca a amarillenta, muy poco solubles en H<sub>2</sub>O (10-30 µg/L), ligeramente solubles en disolventes orgánicos moderadamente polares (metanol, cloroformo, dimetil sulfóxido) e insolubles en disolventes apolares. Son muy inestables en presencia de luz ultravioleta y oxígeno, a pH <3 o pH >10, así como de agentes oxidantes. En medio ácido, las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, se transforman en aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>, respectivamente, por la eliminación de un doble enlace en el anillo de furano (Bräse et al., 2013).

En ausencia de luz, las aflatoxinas son muy estables, incluso a temperaturas superiores a los 100 °C. El anillo de lactona le confiere reactividad a hidrólisis alcalina, hipoclorito sódico o amoniac. La Figura 5 muestra la estructura química para cada aflatoxina, mientras que la fórmula molecular, peso molecular y punto de fusión se indican en la Tabla 1.



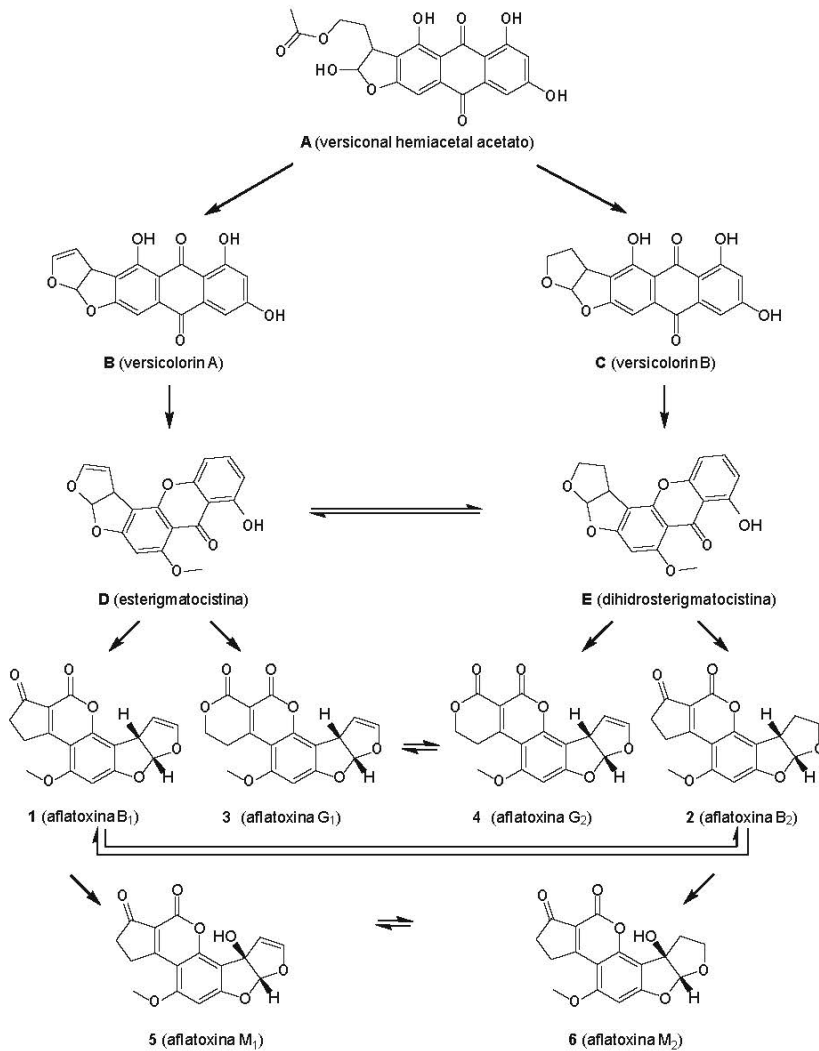
**Figura 5.** Estructura química de aflatoxina B<sub>1</sub> (A), aflatoxina B<sub>2</sub> (B) aflatoxina G<sub>1</sub> (C), aflatoxina G<sub>2</sub> (D) y aflatoxina M<sub>1</sub> (E). <http://www.chemspider.com/>

**Tabla 1.** Fórmula molecular, peso molecular y punto de fusión de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y M<sub>1</sub>.

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular	Punto de fusión (°C)
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312,27	268-269
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,29	286-289
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,27	244-246
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,29	237-240
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,27	299

A nivel metabólico, la biosíntesis de las aflatoxinas (Figura 6) se produce a partir de un mismo precursor, versiconal hemiacetal acetato (A), que es originado a partir de acetato, como metabolito fúngico o policétido. A partir del mismo, se pueden originar metabólicamente versicolorin A y B que a su vez pueden dar lugar a esterigmatocistina (D) y dihidroesterigmatocistina (E), respectivamente (Do y Choi, 2007; Dutton et al., 1985). La esterigmatocistina sería el precursor metabólico de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, mientras que la dihidroesterigmatocistina sería el de las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>. Además, existen otros procesos de biosíntesis molecular

que permiten la biotransformación reversible de aflatoxina B<sub>2</sub> a partir de B<sub>1</sub>, así como, mediante hidroxilación, originar a partir de las mismas aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>.



**Figura 6.** Biosíntesis de las aflatoxinas B (1, 2), G (3, 4), y M (5, 6)  
(Bråse et al, 2013)

---

### 4.1.2. Metabolismo y efectos tóxicos de las aflatoxinas

---

La vía de entrada habitual de las aflatoxinas en el organismo es la digestiva, donde atraviesan el tracto gastrointestinal, llegando al hígado y provocando aflatoxicosis, nombre que recibe la enfermedad producida por ingestión de aflatoxinas. Las aflatoxicosis pueden clasificarse en agudas y crónicas.

Uno de los casos de intoxicación aguda por aflatoxinas más conocido fue un brote de hepatitis aguda ocurrido en Rajasthan y Gujarat, al oeste de la India, en 1974, y que afectó a más de 200 personas, con 106 fallecidos. El análisis del maíz consumido por la población afectada y contaminado por *Aspergillus flavus*, indicó que a partir de las concentraciones de aflatoxina B<sub>1</sub> encontradas (6,25 a 15,6 ppm), la población podría haber ingerido entre 2000-6000 µg/kg por día de aflatoxina B<sub>1</sub> durante un mes (Krishnamachari et al., 1975a, 1975b). Los síntomas observados en la población incluyeron ascitis de rápido desarrollo, edema de las extremidades inferiores, hipertensión portal, necrosis hepática hemorrágica y edemas, estimándose que la dosis letal aguda en los adultos afectados fue de 10 a 20 mg de aflatoxinas (Cullen y Newberne, 1993).

En relación con las aflatoxicosis agudas, los valores orales LD<sub>50</sub> aceptados actualmente para la aflatoxina B<sub>1</sub> son 2,71 mg/kg (rata); 2,2 mg/kg (mono), 0,4 mg/kg (conejo), 0,62 mg/kg (cerdo) y 9 mg/kg (ratón).

Sin embargo, en Salud Pública, la principal preocupación sobre la ingesta de aflatoxinas y la salud de la población derivan de sus efectos en la salud por exposición a largo plazo (aflatoxicosis crónica). Los efectos crónicos principales producidos por las aflatoxinas son hepatotóxicos, carcinógenos, teratógenos, mutágenos e inmunosupresores. La AFB<sub>1</sub> es considerada como el carcinógeno natural más potente que existe en la naturaleza (Squire, 1981), y es habitualmente la aflatoxina más producida por sus hongos productores.

En relación con su poder mutagénico, y después de la AFB<sub>1</sub>, le siguen, por orden decreciente AFM<sub>1</sub>, AFH<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub>. Por ello, la IARC, clasificó las aflatoxinas como cancerígenos del grupo 2B en el año 1993 (IARC, 1993), y posteriormente en el grupo I en el año 2002 (IARC, 2002). La reputación de la AFB<sub>1</sub> como posible veneno ha hecho que haya sido incluida dentro de las posibles sustancias de uso en bioterrorismo, existiendo evidencias durante las guerras del Golfo (1991 y 2003) de su uso en misiles por el régimen de

Saddam Hussein o de estar incluida en la literatura. En la novela de espías de Graham Green, "El Factor Humano" (1979), se produce el asesinato de un personaje central por la ingesta de un vaso de whisky envenenado con aflatoxina B<sub>1</sub>.

Diversos estudios epidemiológicos han asociado la exposición en la dieta a las aflatoxinas como un factor de riesgo importante en el desarrollo de carcinoma hepatocelular, especialmente en individuos afectados por hepatitis B (Li et al., 2001; Peers y Linsell, 1973). En el desarrollo de dicho carcinoma, un factor importante es la inactivación de la expresión del gen supresor p53 por una mutación en el codón 249 producida por una transversión guanina-timina, en la que puede estar implicadas los aductos de AFB<sub>1</sub> (Hsu et al., 1991; Raj et al., 1986).

Asímismo, existen numerosas evidencias de su relación con neoplasias extrahepáticas debido a su actividad mutágena, entre las que hay que destacar posibles carcinomas pulmonares (Coulombe, 1994). Paralelamente a los estudios epidemiológicos de la actividad carcinógena de las aflatoxinas, otra línea de investigación ha demostrado, a nivel molecular, la posibilidad de biomonitorizar diversos metabolitos de la aflatoxina B<sub>1</sub>, principalmente el aducto aflatoxina-N<sup>7</sup>-guanina, en orina, y el complejo aflatoxina-albúmina en sangre periférica, para el estudio de su relación con diversos tipos de cáncer y para la exploración de posibles oportunidades de quimioprevención de los mismos (Ehrlich, 2014; Wild y Turner, 2002).

En ganadería, la ingesta de piensos y forrajes contaminados por aflatoxinas pueden causar una disminución sustancial en la producción de productos de origen animal como leche, huevos o carne (Zain, 2011), o propiamente en su producción (disminución de engorde, etc.). Se han observado diferencias sustanciales entre especies de animales en la susceptibilidad por consumo de aflatoxinas, e incluso, dentro de la misma especie, incluida la humana, la respuesta individual a su consumo está influenciada por factores como la raza, peso, sexo, edad, dieta, o la presencia de sustancias medicamentosas u otras micotoxinas (Hussein y Brasel, 2001; Zain, 2011). Esta diferenciación puede explicarse, a nivel de metabolismo intracelular, debida a la acción de las enzimas citocromo P450, responsables de la bioactivación de las aflatoxinas en sus metabolitos AFB<sub>1</sub>-8,9-exoepóxido (AFBO) y AFB<sub>1</sub>-8,9-endo-epóxido (Gross-Steinmeyer y Eaton, 2012). La forma exoepóxido (AFBO) es capaz de unirse tanto a DNA como a proteínas a través de la posición N<sup>7</sup> de las guaninas, y los aductos AFBO-DNA,

pudiendo producir transversiones entre purinas (adenina-timina) y pirimidinas (guanina-citosina). En el citosol y microsomas, un sistema glutatión S-transferasa cataliza la conjugación de AFBO en la forma reducida glutatión, facilitando su excreción, por lo que variaciones en los niveles de los sistemas glutatión S-transferasa y citocromo P450 podrían explicar la diferente susceptibilidad entre especies de animales a la ingesta de aflatoxinas (Raj et al., 1986).

### 4.1.3. Presencia de aflatoxinas en piensos y alimentos

Muchos sustratos pueden favorecer el crecimiento fúngico de las cepas de *Aspergillus* productoras de aflatoxinas, por lo que su presencia es recurrente en productos de origen natural entre los que se pueden destacar cereales, higos, semillas, especias, nueces y otros frutos de cáscara.

Aunque, en ocasiones la contaminación en cereales se produce durante el crecimiento de la cosecha, en la cual se pueden producir condiciones ambientales especialmente calurosas y húmedas, la forma más habitual de la contaminación en todos los productos naturales es durante el almacenamiento, donde se pueden producir microclimas en determinadas zonas de la partida almacenada que puedan favorecer su crecimiento. Durante el almacenamiento, temperaturas  $>20$  °C y humedades relativas  $>14\%$ , así como un secado inadecuado, son potencialmente las condiciones más favorables para el crecimiento fúngico (Ominski et al., 1994). Asimismo, y como se comentó anteriormente, la presencia de insectos (gusanos, cucarachas, escarabajos) o roedores en los almacenes o graneros pueden favorecer el crecimiento de las cepas micotoxigénicas de *Aspergillus*, al aprovechar sus esporas los daños provocados en el tejido vegetal o sus semillas por su actividad, para penetrar en los mismos, o favorecer su crecimiento (Lacey, 1989; Marin et al., 2013; Wambacq et al., 2016).



**Figura 7.** Aspecto que presenta una mazorca de maíz y nueces por contaminación con *A. flavus*. Adaptadas de: <https://www.ars.usda.gov>

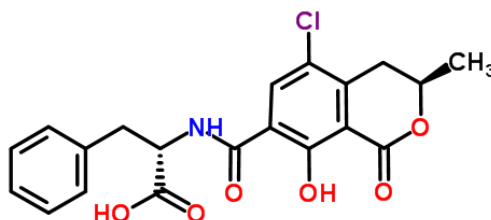
Además de las posibles repercusiones económicas en el sector ganadero (aumento de la mortalidad animal, pérdida de peso, etc.), la presencia de aflatoxinas en piensos puede suponer una fuente indirecta de la presencia de aflatoxinas en la dieta humana. Así la presencia de M<sub>1</sub> en leche (Bennett et al., 2003; A Zinedine et al., 2007) supone, junto con cereales, frutos secos y especias, los principales productos utilizados en alimentación humana implicados en la exposición a aflatoxinas, y por ello se han establecido estrictos límites para su concentración en la Unión Europea.

## 4.2. Ocratoxina A

La ocratoxina A fue descubierta en 1965 (van der Merwe et al., 1965) como uno de los metabolitos producidos por *Aspergillus ochraceus*, del cual deriva su nombre, y posteriormente fue aislado de una muestra de maíz comercial y reconocido como agente nefrotóxico (Bennett et al., 2003). Desde entonces constituye una de las principales micotoxinas desde el punto de vista de la salud pública y la seguridad alimentaria debido a su ubicuidad en alimentos y a su toxicidad.

### 4.2.1. Hongos productores y naturaleza química

La ocratoxina A (OTA), es una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida. Su nomenclatura química es (R)-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il) carbonil]-L-fenilalanina. Tiene un peso molecular de 403,82 g/mol.



**Figura 8.** Estructura química de la ocratoxina A.  
<http://www.chemspider.com/>



En estado sólido es un sólido blanco cristalino, capaz de emitir fluorescencia (verde). Su punto de fusión es de 169 °C y es un ácido débil, con dos constantes de protonación:  $pK_a=4,4$  (grupo carboxílico) y  $pK_a=7,1$  (grupo hidróxilo del fenilo). Es inestable en presencia de radiación ultravioleta. La forma ácida de OTA es soluble en solventes orgánicos polares, mientras que la correspondiente sal sódica lo es en  $H_2O$ .

Los principales hongos productores de OTA son del género *Aspergillus*, incluyendo *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus* y *A. niger*, y del género *Penicillium*, especialmente *P. verrucosum* y *P. nordicum* (EFSA, 2006a). Aunque la OTA es la principal micotoxina dentro del grupo de las ocratoxinas, en este grupo se encuentran otras micotoxinas como la ocratoxina B (OTB), y la ocratoxina C, derivado no clorado y derivado éster etílico de OTA, respectivamente.

#### **4.2.2. Metabolismo y efectos tóxicos de la ocratoxina A**

---

De todas las toxinas producidas por *Aspergillus*, la OTA es la única micotoxina que puede ser potencialmente tan importante como las aflatoxinas. El principal efecto tóxico producido por la OTA deriva de su similitud estructural con el aminoácido fenilalanina (Phe), lo que le permite actuar como inhibidor de varias enzimas que utilizan la fenilalanina como sustrato, y en particular, la phe-tRNA sintetasa (Kuiper-Goodman y Scott, 1989; Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007). Los principales mecanismos de acción de la OTA serían la alteración de la respiración celular, estimulando la peroxidación lipídica (Rahimtula et al., 1988) e inhibiendo la producción mitocondrial de ATP (Meisner y Meisner, 1981) y la alteración del metabolismo de la fenilalanina inhibiendo la enzima implicada en su síntesis (complejo tRNA) (Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007).

Tras su ingestión, es absorbida en el tracto gastrointestinal, principalmente en el estómago, pasando al sistema circulatorio, donde tiene afinidad para unirse a macromoléculas plasmáticas como las albúminas del suero (EFSA, 2006a). La OTA es la micotoxina más frecuentemente detectada en análisis de sangre en individuos sanos (Hmaissia Khlifa et al., 2012). La principal ruta de excreción de la OTA es mediante eliminación renal, y por ello, es una micotoxina nefrotóxica para todas las especies animales estudiadas (Creppy, 1999). Las lesiones renales producidas se caracterizan

por la aparición de necrosis de las células tubulares y engrosamiento de las membranas basales tubulares.

Varios estudios han asociado el consumo de OTA con la nefropatía de los Balcanes, enfermedad renal tubulointersticial crónica, característica de los países del este de Europa, en las zonas de los márgenes del Danubio (Marin et al., 2013). Es una enfermedad que se caracteriza, en sus inicios, por insuficiencia renal crónica que cursa con polidipsia (necesidad de beber urgente), poliuria, presencia de proteínas (proteinuria) y glucosa en orina (glucosuria), y que deriva en enfermedad crónica terminal, diálisis y trasplante renal (EFSA, 2006a).

Además, la OTA es hepatotóxica, inmunosupresora y podría ser carcinógena y teratógena (Kuiper-Goodman y Scott, 1989; EFSA, 2006a, 2010a). Se le considera un factor de riesgo determinante en la aparición de tumores en tracto urinario (Kuiper-Goodman, 1991). Por ello, la IARC (IARC, 1993) clasificó la OTA en el grupo 2B, dentro del grupo de compuestos con posibles efectos cancerígenos. En el año 2006, la EFSA estableció una ingesta semanal tolerable para OTA de 120 ng/kg de peso corporal (EFSA, 2006a).

En ganadería, los cerdos y las aves de corral son las principales especies más sensibles a la ingesta de piensos contaminados por OTA, debido a su mayor capacidad de absorción de la misma tras su ingestión. En rumiantes, debido a la capacidad de la microbiota presente en el rumen, la OTA es biotransformada en un derivado, ocratoxina  $\alpha$ , mientras que la OTB lo es en ocratoxina  $\beta$ , siendo ambas de menor toxicidad (Kuiper-Goodman y Scott, 1989) que OTA y OTB. Los síntomas de una intoxicación aguda por OTA son la pérdida de peso, polidipsia, poliuria, hemorragias, y aparición de necrosis y nefrosis hepáticas (EFSA, 2006a). Exposiciones crónicas a OTA, ocasionan nefropatías aviares (Hamilton et al., 1982) y porcinas (Rutqvist et al., 1978).

### **4.2.3. Presencia de ocratoxina A en piensos y alimentos**

---

La exposición humana a la OTA en dieta puede ser muy variada dada la gran diversidad de productos alimenticios que pueden ser potencialmente afectados. En el informe publicado por la EFSA (EFSA, 2006a), se recogieron los datos oficiales existentes hasta ese momento, de niveles de concentración de OTA en alimentos dentro de la Unión Europea, y que se muestran en la

Tabla 2. A nivel europeo, no se ha recopilado, por parte de las administraciones sanitarias europeas, ningún otro informe de presencia de OTA en alimentos por países. Sin embargo, durante los siguientes años, la literatura relativa a la incidencia de ocratoxina A en alimentos ha sido extensa, y varios autores han publicado revisiones, como en cereales y derivados (Duarte et al., 2010; Li et al., 2014; Pereira et al., 2014) y otros alimentos (Duarte et al., 2009; Medina et al., 2005; Pereira et al., 2014).

Se consideran los cereales y derivados, el vino, café, cerveza, cacao, frutas desecadas, derivados de cerdo, y las especias los principales alimentos implicados en la exposición humana a OTA en dieta (Duarte et al., 2009), siendo esta la vía de exposición principal a la misma. La exposición por inhalación de polvo o aerosoles conteniendo OTA o conidios fúngicos puede ser una fuente adicional de exposición para algunos colectivos laborales como los trabajadores de granjas (Iavicoli et al., 2002).

**Tabla 2.** Presencia y niveles de OTA en alimentos dentro de la UE (EFSA, 2006).

Alimentos	JECFA (FAO/WHO, 2001)		SCOOP (EC, 2003)	
	Nº muestras	Media OTA (µg/kg)	Nº muestras	Media OTA (µg/kg)
Cereales y derivados	1538	0,20	5180	0,29
Cerveza	975	0,02	496	0,03
Vino	1828	0,32	1470	0,36
Zumo de uva	87	0,39	146	0,55
Cacao	171	0,55	547	0,24
Derivados del cerdo	3603	0,17	1860	0,2
Café tostado	2085	0,62	1184	0,72
Café instantáneo	767	0,76	-	-

Los cereales y sus productos derivados son la fuente principal de exposición a OTA en dieta humana, pudiendo representar hasta el 50% del total de la OTA ingerida (EFSA, 2006a). La uva y sus productos derivados, especialmente el vino, son también contribuyentes muy importantes (Mateo et al., 2007) así como el mosto de uva, debido a su uso en la elaboración de productos infantiles (Varga y Kozakiewicz, 2006). Asimismo se ha descrito la presencia de OTA en productos de origen animal, como productos derivados de cerdo, carne de pollo y huevos (Iqbal et al., 2014) o leche (Duarte et al., 2011; Fink-Gremmels, 1999).

Aunque tradicionalmente los datos de exposición a OTA en piensos animales han tenido menor interés que en otros productos, como los cereales, esto parece haber cambiado debido a las posibles implicaciones en la exposición a la dieta humana por consumo de productos de origen animal contaminados por OTA (Duarte et al., 2012). La fuente principal de la contaminación de piensos por OTA es a través de cereales contaminados utilizados durante su elaboración. Habitualmente se encuentran en presencia de otras micotoxinas (Duarte et al., 2011).

### **4.3. Zearalenona**

---

En el año 1966 (Urry et al., 1966), se identificó por primera vez a la zearalenona como agente causal del hiperestrogenismo en cerdos, tal y como ya sugirió McErlan en 1952 (McErlan, 1952). Desde entonces, ha sido incluido dentro de las monografías de micotoxinas, aunque sería más acertado la clasificación de la zearalenona como estrógeno no esteroideo o como micoestrógeno, con capacidad de modulación endocrina de las hormonas estrogénicas.

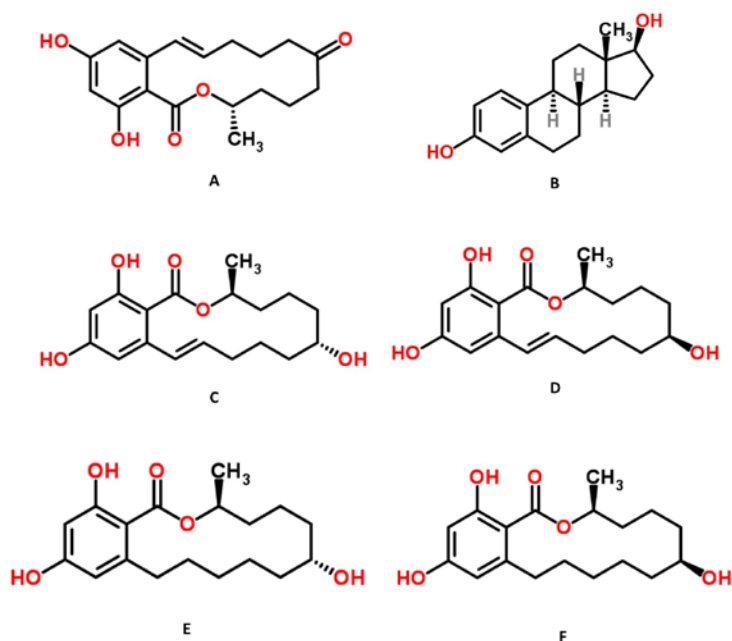
#### **4.3.1. Hongos productores y naturaleza química**

---

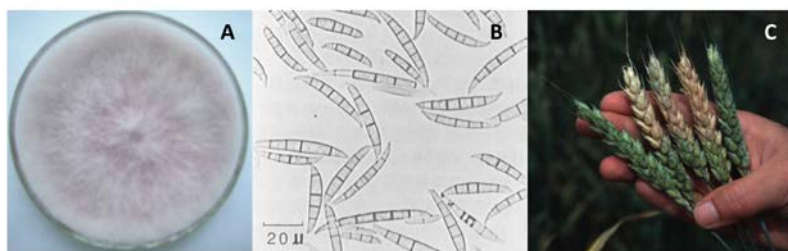
La zearalenona (ZEA), también conocida como micotoxina F2, recibió su nombre de la combinación de *Gibberella zeae*, estado sexual de *Fusarium graminearum*, -ral- por lactona de ácido resorcílico ("resorcylic acid lactone"), -en-, por la presencia de un doble enlace en el C1 y C2, y -ona- por el grupo cetona en C-6'. Estructuralmente es una lactona del ácido fenólico resorcílico (Figura 9). En mamíferos, el grupo ceto del C-8 se reduce a dos metabolitos estereoisómeros ( $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol). Asimismo, ZEA puede ser detectado en cereales u otros alimentos junto a derivados como  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol y zearalanone también producidos por las especies productoras del género *Fusarium* (CCFAC, 2000; Zinedine et al., 2007b).

La ZEA, en estado sólido, es un polvo cristalino blanco y con un punto de fusión de 164-165° C. Es ligeramente soluble en hexano y su solubilidad va aumentando en otros disolventes orgánicos como benceno, acetonitrilo, diclorometano, metanol, etanol y acetona. Aunque insoluble en agua, si lo es en disoluciones alcalinas. Presenta un máximo de absorbancia en UV a 236

nm, y es estable al ser calentado a 120 °C (Bräse et al., 2013; Hidy et al., 1977).



**Figura 9.** Estructura química de: zearalenona (A), 17-β-estradiol (B), α-zearalenol (C), β-zearalenol (D), α-zearalanol (E) y β-zearalanol (F). <http://www.chemspider.com/>



**Figura 10.** Colonias (A) y esporas (B) de *F. graminearum*. Espiga de trigo contaminada por *F. graminearum* (C). Adaptado de: <http://mycota-crcc.mnhn.fr>, <http://www.brcr.firdi.org.tw/fungi/index.jsp> y <http://www.apsnet.org>

*F. graminearum* es la especie de *Fusarium* productora de micotoxinas más ampliamente distribuida y la principal productora de ZEA. Su rango de temperaturas de crecimiento óptimo se encuentra entre 24 y 26 °C, y crece con una  $a_w > 0,9$ . Otras especies de *Fusarium* productoras de ZEA son *F.*

---

*culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* y *F. semitectum* (Hidy et al., 1977; Jiménez et al., 1996; Zinedine et al., 2007).

### 4.3.2. Metabolismo y efectos tóxicos de la zearalenona

---

La toxicidad de la zearalenona deriva de su capacidad para acoplarse a los receptores del 17- $\beta$ -estradiol, la principal hormona producida por el ovario humano, impidiendo su unión a los receptores de estrógenos presentes en células mamarias, uterinas, hepáticas e hipotalámicas. Por tanto, puede considerarse como un disruptor endocrino, siendo sus efectos estrogénicos más relevantes en humanos, como un desarrollo precoz de las mamas y en general, una pubertad precoz. En el trabajo de Schoental (Schoental, 1983), se estudió la asociación de la presencia de zearalenona en dieta con la temprana menarquia observada en la población de Puerto Rico, aunque dichas hipótesis no han sido aún confirmadas (Kuiper-Goodman et al., 1987).

Diversos estudios carcinogénicos no han podido demostrar que ZEA aumente la frecuencia tumoral, pero sí su capacidad clastogénica y aneugénica (Becci et al., 1982; Pfohl-Leszkowicz et al., 1995).

La ZEA es absorbida y metabolizada por el organismo a través de tres vías principales. En el hígado, se cataliza la reducción de la zearalenona a  $\alpha$ -zearalenol, siendo la actividad estrogénica del  $\alpha$ -zearalenol mayor que la de ZEA. Otros derivados de la metabolización de ZEA son  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol y la zearalanona (ZAN). En conjunto, y por orden decreciente de su potencia estrogénica, ZEA y sus derivados pueden ordenarse como:  $\alpha$ -zearalenol >  $\beta$ -zearalenol > ZEA >  $\beta$ -zearalanol >  $\alpha$ -zearalanol (Ueno y Tashiro, 1981). Las otras dos rutas metabólicas observadas, y que facilitarían su excreción, son la glucuronidación (o formación de conjugados a partir de ácido glucurónico) de la zearalenona en el hígado e intestino delgado, y su oxidación, catabolizada mediante citocromo P450 para dar lugar a quinonas reactivas. Dentro de la UE, se ha estimado una exposición crónica total en dieta para ZEA, y en adultos (percentil 95), en el intervalo 4,7 a 54 ng/kg peso corporal (EFSA, 2011a).

Los efectos tóxicos observados en animales expuestos en su ingesta a ZEA varían en función de las especies, siendo los cerdos los más sensibles a su capacidad estrogénica (Massart y Saggese, 2010; Mirocha et al., 1981). En machos, los efectos tóxicos por exposición a ZEA observados, asociados a la alteración en la síntesis de testosterona (síndrome de hiperestrogenismo),

incluyen disminución en el tamaño de los órganos sexuales y espermatogénesis, mientras que en hembras se encuentra una disminución de la fertilidad, lactancia anormal, abortos y mortinatos (EFSA, 2011a). En cerdas, los tejidos más sensibles a los efectos estrogénicos de ZEA y sus metabolitos son los ovarios, el útero y la vulva (D'Mello y Macdonald, 1997; Prelusky et al., 1989).

### **4.3.3. Presencia de zearalenona en piensos y alimentos**

---

ZEA es una micotoxina de distribución mundial debido a la ubiquidad de las esporas del género *Fusarium*. Aunque es el maíz el cereal tradicionalmente asociado a la contaminación por ZEA, otros cereales como trigo, sorgo y cebada también pueden verse afectados. Habitualmente las muestras de cereales y piensos con niveles cuantificables de ZEA, presentan del mismo modo, niveles de otras micotoxinas producidas por *Fusarium*, como tricotecenos y fumonisinas (D'Mello et al., 1997, D'Mello y Macdonald 1997).

La infección fúngica se produce habitualmente durante el almacenamiento del grano después de la cosecha, aunque a veces también puede producirse durante las últimas fases del crecimiento antes de su cosecha (CCFAC, 2000). Debido a su termoresistencia en procesos habituales de cocinado, productos derivados de cereales pueden verse también afectados por presencia de ZEA. Sin embargo, procesos de extrusión combinados con calentamiento, utilizados habitualmente en la industria alimentaria para la elaboración de productos alimenticios (p. ej. cereales para el desayuno, confitería, snacks, etc.) han demostrado una reducción significativa (alrededor del 40%) del contenido en ZEA previo a su procesado (EFSA, 2011a).

En el informe de la EFSA de 2011 (EFSA, 2011a), en el que se realizó un estudio completo sobre la presencia de ZEA en 13075 muestras de alimentos y 9877 muestras de cereales sin procesar, se hallaron valores cuantificables en un 15% de las muestras, siendo las concentraciones más elevadas encontradas en salvado de trigo, maíz y productos derivados como cereales para desayuno, etc.

Al ser la base de su composición los cereales, los piensos también pueden verse afectados por contaminación por ZEA, aunque esta no se encuentra en sus productos derivados como la leche o huevos en concentraciones significativas (Prelusky et al., 1990).

---

## 4.4. Fumonisinias

---

Las fumonisinias se describieron por primera vez en 1988 (Bezuidenhout et al., 1988; Gelderblom et al., 1988), cuando en Sudáfrica, se aislaron en cultivos *F. verticillioides* durante la búsqueda del agente causal de una alta incidencia de cáncer de esófago en la población rural y una alta mortandad equina por leucoencefalomalacia equina, asociada al consumo de maíz contaminado por hongos.

### 4.4.1. Hongos productores y naturaleza química

---

Desde entonces, se han aislado cerca de 60 moléculas vinculadas estructuralmente con las fumonisinias (Bartók et al., 2006; Rheeder et al., 2002), aunque actualmente se consideran 4 familias que incluyen 13 fumonisinias, siendo el resto formas parcialmente hidrolizadas de las mismas. En la familia de fumonisinias B existen cuatro con un grupo amino (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>4</sub>), tres que son amidas y denominadas fumonisinias A (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>), tres análogas a las integrantes del grupo B pero que presentan la pérdida de un grupo metilo en el C-1 y denominadas fumonisinias C (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>), y por último, tres denominadas fumonisinias P (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>) (Weidenböner, 2001).

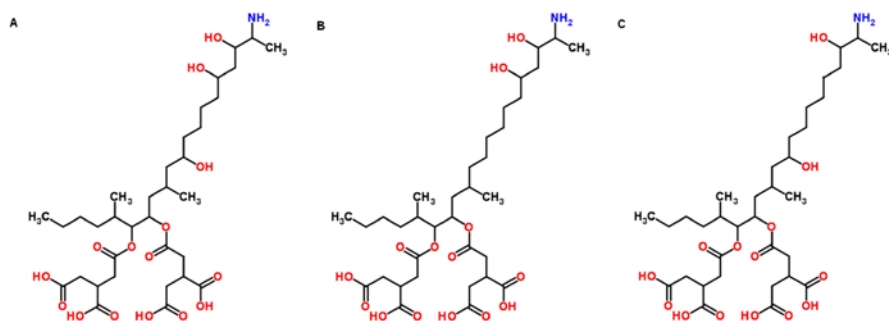
Las fumonisinias del grupo B son el grupo de fumonisinias más representativo, destacando entre ellas las fumonisinias B<sub>1</sub> (FB1) y B<sub>2</sub> (FB2). Estructuralmente las fumonisinias B son cadenas alifáticas de 20 átomos de carbono, con un grupo amino en C-2 y residuos de ácido tricarbóxico esterificados en C-14 y C-15. Las fumonisinias B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> (FB3) son análogas estructuralmente a la fumonisina B<sub>1</sub>, aunque con la ausencia de un grupo hidroxilo en C-10 (fumonisina B<sub>2</sub>) y en C-5 (fumonisina B<sub>3</sub>).

En estado sólido, tanto FB1 como FB2 se presentan en forma de un polvo blanquecino muy higroscópico. Son solubles en MeOH y estables en una disolución de ACN y H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v). Son relativamente estables a la temperatura y a la radiación UV, y su contenido solamente se reduce durante procesos en los que esta supere los 150 °C, o de forma más reducida, durante procesos de fermentación (EFSA, 2005a).

La FB1 es la fumonisina predominante en muestras de cereales contaminadas de forma natural (aproximadamente un 70%) encontrándose en proporción 3:1 y 12:1 respecto de FB2 y FB3, respectivamente (Placinta et al.,

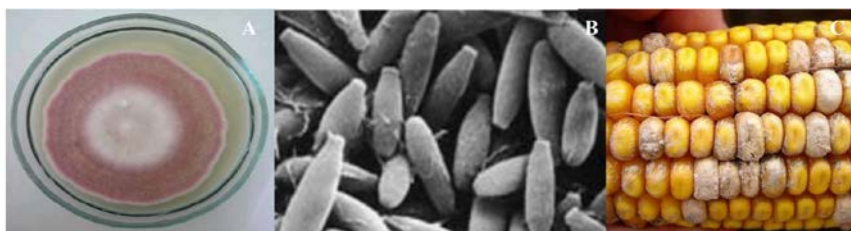


2016; Rheeder et al., 2002). Sin embargo, en condiciones de cultivo en laboratorio, se han encontrado cultivos de *F. moniliforme* donde la producción de FB2 era superior a la FB1 (Weidenbörner, 2001).



**Figura 11.** Estructura química de fumonisina B<sub>1</sub> (A), fumonisina B<sub>2</sub> (B) y fumonisina B<sub>3</sub> (C) <http://www.chemspider.com/>

Las fumonisinas son producidas principalmente por los hongos filamentosos del género *Fusarium*, destacando como productores de fumonisinas *Fusarium verticillioides* (antes conocido como *Fusarium moniliforme*) y *Fusarium proliferatum*, contaminantes habituales de maíz (Arranz et al., 2004; Weidenbörner, 2001). Otras especies de *Fusarium* con capacidad de producir fumonisinas, aunque no de forma consistente son *F. dlamini*, *F. anthophilum*, *F. globosum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, y *F. subglutinans*.



**Figura 12.** Colonias (A) y esporas (B) de *F. verticillioides*. Aspecto de mazorca de maíz contaminada con *F. verticillioides* (C). Adaptado de: Mycobank MB314223 y <http://www.apsnet.org/>

*F. verticillioides* y *F. proliferatum* tienen perfiles similares de crecimiento, con una temperatura óptima de crecimiento entre los 22,5 y 27,5 °C, dentro de un intervalo máximo de 2 a 37 °C y una  $a_w$  mínima para su crecimiento de 0,87. *F. proliferatum* se caracteriza por producir FB1, FB2 y FB3, a diferencia del primero que habitualmente produce solamente FB1 (Sweeney y Dobson,

1998). Las toxinas son producidas a temperaturas de 25 a 30 °C, dentro de un intervalo de  $a_w$  de 0,92 a 0,97.

#### **4.4.2. Metabolismo y efectos tóxicos de las fumonisinas**

---

Las fumonisinas pueden incluirse dentro del grupo de las micotoxinas con efectos hepatotóxicos, nefrotóxicos, citotóxicos, hepatocarcinogénicos, y pueden causar un aumento de la tasa de apoptosis en el hígado y el riñón en experimentación animal (Voss et al., 1998). De todo el grupo de fumonisinas, se considera la FB1 como la fumonisina más importante desde un punto de vista toxicológico. Debido a su similitud estructural con la esfinganina, puede inhibir la enzima ceramida sintasa (CER), enzima responsable de la catálisis de la reacción de acilación de la esfinganina y del metabolismo de la esfingosina (IARC, 1993, 2002). Como efecto de dicha inhibición, se produce la acumulación de ambas así como la depleción de esfingolípidos, lo cual provoca a nivel de metabolismo celular estrés oxidativo, alteraciones en el ciclo de diferenciación celular, apoptosis celular y necrosis (Arranz et al., 2004; Voss et al., 2009, 1998).

Aunque actualmente no hay evidencias concluyentes sobre efectos adversos en la salud humana por ingesta de fumonisinas, diferentes estudios epidemiológicos han asociado el consumo de alimentos contaminados con fumonisinas, con un aumento en la incidencia de cáncer esofageal (Marasas et al., 1984a; Munkvold y Desjardins, 1997) y cáncer de hígado en China (Yoshizawa et al., 1994). Por ello, la Agencia Internacional para la investigación del cáncer (IARC), ha clasificado la fumonisina B<sub>1</sub> como posible cancerígeno del grupo 2B (IARC, 2002). El Comité Científico sobre la Alimentación Humana de la Comisión Europea ("Scientific Committee on Food", SCF), estableció en sus informes (SCF, 2000, 2002, 2003) una ingesta diaria tolerable (TDI) de 2 µg/kg peso corporal para FB1, FB2 y FB3, solas o combinadas, a partir del nivel de mínimo efecto adverso observable (LOAEL) en cerdos y caballos de 0,2 mg/kg peso corporal por día y aplicando un factor de seguridad de 100 (WHO/FAO, 2001).

En alimentación animal, no existen evidencias concluyentes que indiquen toxicidad aguda por la ingesta de piensos contaminados por fumonisinas. En relación con su toxicidad crónica, se ha comprobado que el hígado y los riñones son los principales órganos afectados, existiendo una

importante variabilidad entre especies de animales y dentro de la misma especie, entre razas o sexos.

En equinos, la ingesta de fumonisinas produce leucoencefalomalacia, enfermedad mortal que se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas liquefactivas en la sustancia blanca del sistema nervioso central y cuyos síntomas son ataxia, pérdida de apetito, temblores, mareos y visión borrosa que derivan en convulsiones y muerte del animal. En cerdos, su ingesta produce síndrome de edema pulmonar e hidrotórax, caracterizada por pérdida del apetito, debilidad, disnea, cianosis, convulsiones y finalmente, la muerte. Así mismo, existen evidencias de que la ingesta de fumonisinas produce pérdida de peso en pollos y cáncer de hígado en ratas (Arranz et al., 2004; Morgavi y Riley, 2007). A pesar de sus efectos carcinógenos en ratas, no se ha podido demostrar su actividad genotóxica ni teratógena, y se considera que las fumonisinas podrían actuar como promotores tumorales (EFSA, 2005a).

Debido a que la FB1 inhibe la absorción de folatos, una de las líneas de investigación actuales estudia la posible relación de la ingesta de fumonisinas y la incidencia de malformaciones en el sistema nervioso central (Marasas et al., 2004).

#### **4.4.3. Presencia de fumonisinas en piensos y alimentos**

---

La presencia de fumonisinas, principalmente de FB1, es habitual en cereales, especialmente en maíz, así como en productos derivados como cerveza, pan, cereales para desayuno, alimentos infantiles con base de maíz, etc. (Arranz et al., 2004). Dentro de la UE, el maíz y sus subproductos (sémola, harina) son los productos alimenticios más contaminados por FB1, junto con la harina de trigo (SCOOP, 2003). No existe evidencia de la transmisión a productos de origen animal, como carne, huevos o leche, en animales que hayan consumido piensos contaminados por fumonisinas (IARC, 2002). La Comisión Europea publicó en el año 2003 (SCOOP, 2003) un informe que recogía la incidencia en alimentos por contaminación debida a toxinas de *Fusarium*, confirmando que los cereales y sus productos derivados son los principales alimentos afectados por contaminación por fumonisinas. Los datos de ese informe sobre la incidencia de FB1 se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Fumonisina B1 en muestras de alimentos dentro de la UE (SCOOP, 2003)

Producto	N muestras	% muestras > LOD	LOD	Máximo µg/g
Maíz en grano	801	67%	5-50	10200
Cereales para desayuno	274	46%	0,2-300	1092
Polenta	29	100%	20-50	752
Maíz dulce	145	9%	5-20	81
Fracciones de maíz	41	90%	12-30	6009
Sémola de maíz	172	57%	5-30	4800
Harina de maíz	110	79%	5-50	4766
Producto a base de maíz	83	31%	0,2-300	800
Trigo en grano	110	79%	10-30	736
Harina de trigo	256	16%	12-30	4343
Arroz	197	2%	10-20	77
Granos de cereal	68	38%	30	7808
Productos a base de cereales	666	54%	5-30	1260

La contaminación de maíz y de otros cereales por *Fusarium* se produce durante su fase de crecimiento y su incidencia está sujeta a fluctuaciones climáticas. Aunque el problema es mundial, son las cosechas de países con climas secos y cálidos los más proclives a la presencia de niveles altos de fumonisinas. No obstante, en países con climas húmedos y fríos, variaciones estacionales que implicaran un aumento de la temperatura y humedad relativa podrían provocar un aumento en dichos niveles y de hecho, podría ser un efecto derivado de un posible cambio climático (Lazzaro et al., 2012; Pietri et al., 2004).

Un alto procesado de las harinas de maíz u otros cereales para la elaboración de productos alimenticios (p. ej. tortitas, cereales para el desayuno, etc.) podría disminuir la concentración de fumonisinas, debido a las características de crecimiento de *Fusarium*, que habitualmente coloniza la zona cercana al pericarpio del grano (WHO/FAO, 2012). Por ello el contenido de fumonisinas en harinas que contengan salvado o fracciones del germen es sustancialmente más alto que aquellas elaboradas casi exclusivamente con grano (Bryła et al., 2013; Pascale et al., 1997).

Paradójicamente, si el procesado del maíz se realiza a temperaturas elevadas puede dar lugar a la aparición de complejos entre las fumonisinas con otros componentes del alimento mediante la formación de enlaces covalentes, y que reciben el nombre de *fumonisinas enmascaradas* (“masked fumonisins”). Diversos autores han descrito la formación de derivados de

fumonisinias, como el N-carboximetil fumonisina B1 o N-deoxi-D-fructosa -1-il fumonisina B1, por la reacción a altas temperaturas con carbohidratos reducidos (Seefeldler et al., 2003) o la formación de ésteres con ácidos grasos (Bryła et al., 2016; Lazzaro et al., 2013).

Las fumonisinas también pueden formar compuestos mediante uniones no covalentes con proteínas o carbohidratos y que reciben el nombre de *fumonisinias ocultas* ("hidden fumonisins"). Dichos compuestos podrían contribuir al aumento de los niveles de fumonisinas como tales, o de las fumonisinas enmascaradas tanto en grano como en productos derivados, debido a que podrían liberarse durante la digestión en el tracto intestinal (Dall'Asta et al., 2012, 2009; Falavigna et al., 2012).

Aunque el mecanismo de biosíntesis de FB1 aún no se ha aclarado completamente, se ha descrito que la misma podría estar regulada por el gen cluster FUM, cuya expresión podría estar modulada por varios factores ambientales entre los que se incluirían la temperatura, la actividad de agua ( $a_w$ ) (Proctor et al., 2006; Sanchis et al., 2006), el pH, el contenido de amilopectina y la relación carbono/nitrógeno presente en el grano (Bluhm y Woloshuk, 2005; Picot et al., 2011).

En relación con la presencia de fumonisinas en piensos, esta es habitualmente debida al contenido en maíz o trigo en su composición. Los niveles de fumonisinas encontrados en los mismos varían entre 0,02 mg/kg y varias decenas de mg/kg (EFSA, 2005a), siendo FB1 la fumonisina prevalente, o siendo su presencia conjunta con FB2 y FB3. Existen estudios que han demostrado la evolución en el contenido de fumonisinas en maíz no procesado, y una vez procesado mediante molienda, en las distintas fracciones obtenidas, indicando que su contenido final en la harina y sémolas obtenidas era menor, y superior en salvados, germen y harinas destinadas a la elaboración de piensos (Brera et al., 2004).

## 4.5. Tricotecenos

---

Los primeros tricotecenos en ser aislados e identificados estructuralmente fueron el tricotecín, aislado en 1948 y producido por *Trichothecium roesum* (Freeman y Morrison, 1948), y una mezcla de verrucarinas A y B, en 1950 producidas por *Myrothecium verrucaria* (Grove, 1993). Desde entonces se han identificado en torno a 170, aunque los más

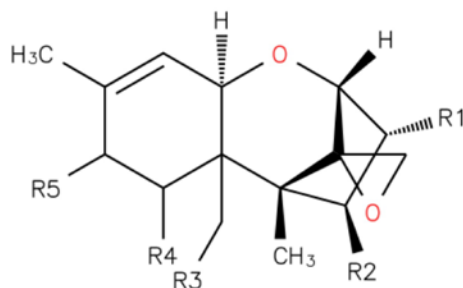
importantes y recogidos en la legislación sobre micotoxinas, son las toxinas T-2 y HT-2, y el deoxinivalenol.

#### **4.5.1. Hongos productores y naturaleza química**

---

Los tricotecenos son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por distintas especies del género *Fusarium*: *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* y *F. sporotrichioides*, que son los principales productores de tricotecenos y, en menor importancia, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. camptoceras*, *F. chlamydosporium*, *F. compactum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equesiti*, *F. nivale*, *F. nygamai*, *F. oxysporium*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. scirpi*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. tumidum* y *F. venenatum*. También hay otras especies fúngicas con capacidad de producir tricotecenos pertenecientes a los géneros *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys* *Verticimonosporium* (Grove, 1993; Marasas et al., 1984b; Sweeney y Dobson, 1998).

Químicamente, los tricotecenos son el grupo de micotoxinas más diverso. Estructuralmente, son compuestos que contienen anillos sesquiterpénicos con un núcleo 12,13-epoxi-tricoteceno. Se han identificado en torno a 170 tricotecenos (Grove, 1993; Grove et al., 1986), y se clasifican en cuatro grupos A, B, C y D. Los tricotecenos de tipo A tienen un grupo funcional distinto de una cetona en la posición C-8, mientras que los tricotecenos tipo B, poseen una cetona en esa posición. Los tricotecenos tipo C, tienen un segundo grupo epoxi en las posiciones C-7, C-8 y C-9, mientras que los tricotecenos tipo D contienen un anillo macrocíclico mediante enlaces éster en las posiciones C-4 y C-5 (Figura 13). Generalmente también los tricotecenos se suelen subdividir en función de si presentan estructura macrocíclica (tricotecenos macrocíclicos), que representan en torno al 60% de los mismos o tricotecenos no macrocíclicos, que representan aproximadamente el 40% restante (Bräse et al., 2013).



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH	
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	
Diacetoxiscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
Toxina T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Toxina HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Neosolanol	OH	OAc	OAc	H	OH
Fusarenona X	OH	OAc	OH	OH	
3-acetil-deoxinivalenol	OAc	H	OH	OH	
15-acetil-deoxinivalenol	OH	H	OAc	OH	

**Figura 13.** Estructura química general de los tricotecenos (arriba), y principales tricotecenos (abajo) <http://www.chemspider.com/>

Respecto a su estabilidad, en general los tricotecenos son compuestos bastante estables, resistentes a alta temperatura, y no se degradan durante los procesos habituales de la industria alimentaria (EFSA, 2011c). A temperatura ambiente son sólidos incoloros y la gran mayoría cristalinos. Los tricotecenos de tipo A son solubles en la mayoría de disolventes moderadamente polares (cloroformo, acetato de etilo, dietiléter, acetonitrilo), mientras que los de tipo B, requieren disolventes de mayor polaridad, como mezclas de H<sub>2</sub>O con MeOH o ACN (SCOOP, 2003). En general, los tricotecenos son estables en acetonitrilo a 25 °C con atmósfera inerte (argón), y el grupo epóxido en la posición C12-13 es bastante resistente a ataques nucleofílicos (Bullerman y Bianchini, 2007; Shephard, 1998).

Los más frecuentes en muestras de alimentos y piensos, y más importantes en relación a la seguridad alimentaria son los incluidos en los tipos A y B, siendo los de tipo A más tóxicos que los de tipo B (Miller, 2002), mientras que los de tipos C y D incluyen tricotecenos de menor relevancia. Actualmente, en la legislación europea, se encuentran reflejadas las toxinas T-2 y HT-2 (tipo A), y el deoxinivalenol (tipo B).

En general, los procesos habituales utilizados en la industria alimentaria o en la industria de fabricación de piensos, salvo aquellos que utilizan altas temperaturas, entre los que destaca la extrusión a temperaturas de 150 a 180 °C y adición de concentraciones <1% de metabisulfito potásico, no eliminan completamente el contenido en tricotecenos (Bullerman y Bianchini, 2007).

### **Toxinas T-2 y HT-2**

Los pesos moleculares de las toxinas T-2 y HT-2 son de 466,5 g/mol y 424,5 g/mol respectivamente. A temperatura ambiente, ambas tienen aspecto cristalino blanco amarillento, y su punto de fusión es de 151-152 °C. Su solubilidad es buena en disolventes orgánicos, incluyendo metanol, etanol, cloroformo, acetona, acetato de etilo, dietiléter y acetonitrilo, pero baja en agua (Yates et al., 1968). En disoluciones acuosas las toxinas T-2 y HT-2 tienen una vida media de 3,9 y 8,5 años dentro de un rango fisiológico de pH (Duffy y Reid, 1993). Además, son estables en medios con pH neutro o ácido por lo que no se hidrolizan en el estómago tras su ingestión (Rocha et al., 2016).

Son producidas principalmente por varias especies de *Fusarium*: *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. acuminatum*, y *F. poae*.

### **Deoxinivalenol**

El deoxinivalenol (DON) tiene un peso molecular de 296,3 g/mol. A temperatura ambiente es un sólido cristalino blanco y tiene un punto de fusión de 151-153 °C. Es soluble en disolventes orgánicos polares, como MeOH, acetato de etilo o ACN, pero su solubilidad disminuye en H<sub>2</sub>O (Widestrand y Pettersson, 2001).

El DON es producido principalmente por *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. cerealis*.

## **4.5.2. Metabolismo y efectos tóxicos de las toxinas T-2 y HT-2**

---

Aunque los mecanismos toxicológicos de las toxinas T-2 y HT-2 aún no son completamente conocidos, se considera que la toxina T-2 es rápidamente metabolizada en el organismo en varios metabolitos entre los que la toxina HT-2 es la más importante y por ello, se supone que la toxicidad aguda de la toxina T-2 y HT-2 son similares (EFSA, 2011c).



Las vías de entrada habituales en el organismo de la toxina T-2 son la oral y respiratoria, siendo la cutánea baja. Una vez en su interior, su distribución en el mismo es bastante rápida a través de la circulación, siendo su vida media en el plasma inferior a 20 minutos (SCF, 2002).

Su metabolización (Figura 14.) incluye un proceso de acetilación, desacetilación (a través de una enzima carboxiesterasa no específica), hidroxilación (a través de enzimas dependiente de citocromo P450), deepoxidación (SCF, 2002) y finalmente, una conjugación glucuronida (Naseem et al., 1995; Wu et al., 2010). Se produce principalmente en el hígado, pero se ha observado que, en algunos animales como ratas y ratones, cerdos, vacas y pollos, también se puede producir en el intestino y en la sangre y, en el caso de rumiantes, en el rumen (Cavret y Lecoeur, 2006).

Los conjugados glucurónicos originados de las toxinas T-2 y HT-2 son los principales productos de excreción, que se realiza a través de la orina y mediante excreción biliar. La proporción entre ambos tipos de excreción depende de las especies (SCF, 2002; WHO/FAO, 2001).

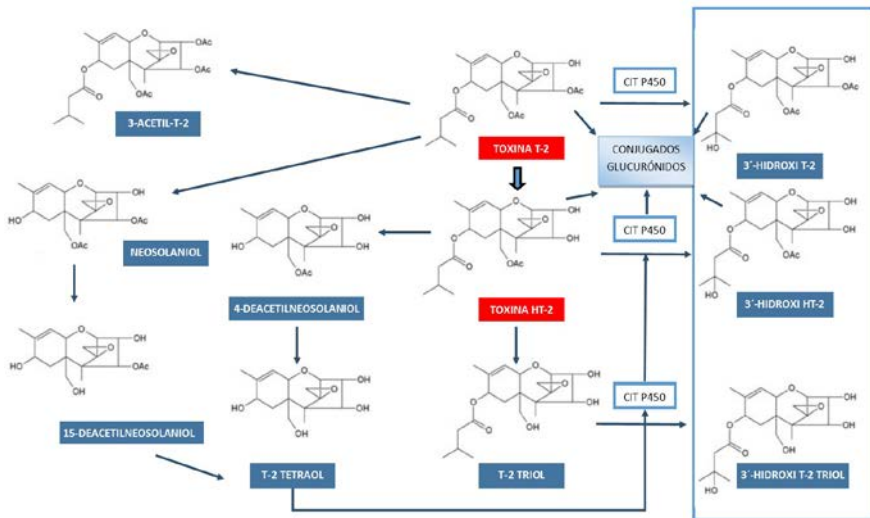
La toxicidad asociada a las toxinas T-2 y HT-2 deriva de su capacidad para inhibir la síntesis proteica. Las toxinas interactúan con el centro de la peptidil transferasa, en la subunidad 60s ribosomal, inhibiendo la transpeptidación en la formación del enlace peptídico (WHO/FAO, 2001). También se ha descrito que en presencia de altas dosis de las toxinas, se puede producir la inhibición de la síntesis de ADN y ARN (Minervini et al., 2004; Shank et al., 2011), afectar la integridad de la membrana (Berek et al., 2001; Minervini et al., 2004), y tener efectos apoptóticos en las células animales e inhibir la función mitocondrial (Rocha et al., 2016).

En humanos, la exposición prolongada a tricotecenos tipo A, principalmente a toxinas T-2 y HT-2, puede causar la enfermedad denominada Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA), enfermedad que se caracteriza por la aparición de los siguientes síntomas de forma gradual (Lutsky y Mor, 1981; WHO/FAO, 2001):

1. Aparición, a las pocas horas de su ingesta, de sensación de quemazón en boca y garganta, que se traslada posteriormente a esófago y estómago.
2. Al cabo de 1-3 días, el paciente sufre irritación de la mucosa gastrointestinal acompañada de náuseas, vómitos, diarrea y

dolor abdominal, a la que se unen otros síntomas como debilidad general, fatiga, aparición de heces sanguinolentas, fiebre y taquicardias.

- En la fase final de la enfermedad, de 1 a 3 semanas, se produce una leucopenia por destrucción de la médula ósea, agranulocitosis, aparición de necrosis en angina, erupciones hemorrágicas, dispnea, presencia de fiebre alta, septicemia, aparición de sangrados en nariz, encías y garganta. Aunque en los casos más graves puede producir la muerte por la deshidratación y pérdida de peso que acompaña a la enfermedad, habitualmente tiene pronóstico favorable mediante convalecencia del paciente durante varias semanas, hasta recuperar la función normal de la médula ósea.



**Figura 14.** Ruta metabólica de la toxina T-2 en animales y humanos (EFSA, 2010b; Dohnal et al., 2008).

A nivel de ingesta humana, el Comité Científico sobre la Alimentación Humana de la Comisión Europea (SCF) estableció en el año 2002, un valor de ingesta diaria tolerable temporal (TDI-t) para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 de 0,06 µg/kg peso corporal (SCF, 2002). Así mismo, la IARC (IARC, 1993), determinó que la evidencia en experimentación animal para establecer la carcinogenicidad de la toxina T-2 era limitada, por lo que fue incluida en el grupo 3 de su clasificación.

En relación con su toxicidad en animales, la ingestión de toxinas T-2 y HT-2, así como de otros tricotecenos, puede producir retraso en el crecimiento, reducción en la función ovárica y otros desórdenes reproductivos, rechazo de la alimentación, vómitos e inmunodepresión (Rocha et al., 2016). Los cerdos son los animales más sensibles y, a partir de una dosis de 29 µg/kg peso corporal, se aprecian efectos inmunotóxicos y hematotóxicos (SCF, 2002; EFSA, 2011c).

#### **4.5.3. Metabolismo y efectos tóxicos de deoxinivalenol**

---

De todas los tricotecenos, el DON es la toxina con más incidencia en piensos y alimentos, y es habitual que se encuentre junto con sus derivados monoacetilados, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol y 3-15 acetil-deoxinivalenol en concentraciones más bajas (10 – 20%) (SCF, 2002; EFSA, 2013a). También se ha detectado en cereales y productos derivados la presencia de un metabolito de DON producido en plantas y denominado deoxinivalenol-3-glucósido, que podría ser metabolizado en el sistema gastrointestinal de humanos y animales a DON (Berthiller et al., 2013; Nagl et al., 2012).

El DON es absorbido y metabolizado rápidamente después de su ingestión, siendo uno de sus efectos tóxicos más importante, de forma similar a otros tricotecenos como la toxina T-2, la inhibición en la síntesis proteica, aunque, in vitro, la toxicidad de deoxinivalenol es 100 veces menor que esta. Cuando la exposición a concentraciones de DON es más elevada, se puede producir efectos derivados de una inmunosupresión, por inducir el DON la caída en la producción de inmunoglobulinas y depleción de linfocitos en el timo y bazo (Thompson y Wannemacher, 1986; Ueno et al., 1973), así como provocar el vómito o emesis, debido a su interacción con receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos en el área postrema del cerebro. Este efecto

emético es por el que tradicionalmente ha sido conocido el DON y recibió la denominación de vomitoxina.

Actualmente se considera que el principal efecto toxicológico asociado a la ingesta de DON a bajas concentraciones y de forma prolongada en el tiempo es un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, es decir, como agente pro-inflamatorio, ya que se ha demostrado que se aumenta la actividad de varios factores de transcripción y se incrementa su síntesis (Wong et al., 2002; Wu et al., 2014).

No existen evidencias epidemiológicas que pudieran hacer considerar el deoxinivalenol como mutágeno o cancerígeno, por lo que la IARC clasificó el DON dentro del grupo 3 (IARC, 1993). El Comité Científico sobre la Alimentación Humana de la Comisión Europea (SCF) estableció en el año 2002 (SCF, 2002), una ingesta diaria tolerable (TDI) de 1 µg/kg peso corporal al día, basado en el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL), fijado en 100 µg/kg peso corporal por día por el Comité Mixto de Expertos FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios (JECFA) en el año 2001 (JECFA, 2001). En el año 2010, el valor de TDI se mantuvo, pero incluyendo además los contenidos de las formas acetiladas de DON.

En relación a la salud animal, y aunque la susceptibilidad varía entre especies, son los cerdos la especie más sensible a los efectos tóxicos de deoxinivalenol. Intoxicaciones agudas por ingestión de DON en piensos contaminados puede causar, en un primer momento, reducción en la ingesta de alimentación, seguido de vómitos, rechazo de la alimentación y, en casos más graves, diarreas sanguinolentas (EFSA, 2004c).

#### **4.5.4. Presencia de deoxinivalenol en piensos y alimentos**

---

Con relación a la presencia, en piensos y alimentos, de DON, sus derivados acetilados (3-acetil-deoxinivalenol, (3-ADON), 15-acetil-deoxinivalenol, (15-ADON) y su conjugado (deoxinivalenol-3-glucósido)), la EFSA publicó en el año 2013 un informe científico, a instancia de la Comisión Europea, en el que se recogieron y trataron estadísticamente los datos obtenidos dentro de la Unión Europea desde 2007 a 2012, que supone el informe más extenso, completo y reciente de presencia de DON en alimentos y piensos dentro de la Unión Europea (EFSA, 2013a).

De los datos recogidos en el mencionado informe, el maíz, la avena y el trigo y sus productos derivados, son los cereales que presentan un mayor porcentaje de muestras positivas. Del total de 18884 muestras analizadas, un 44,6% de muestras de grano sin procesar, un 43,5% de las muestras de alimentos, y un 75,2% de las muestras de piensos analizados presentaron niveles de DON por encima del límite de cuantificación, que fueron establecidos, tanto para DON como para su conjugado o sus derivados, en 250 µg/kg para cereales sin procesar, 200 µg/kg para piensos, 100 µg/kg para cereales destinados a alimentación humana y 50 µg/kg para otros alimentos. De un total de 26613 resultados analíticos, 18482 correspondieron a DON, 3922 a 3-ADON, 4032 a 15-ADON y 177 resultados analíticos de su conjugado, deoxinivalenol-3-glucósido.

En aproximadamente la mitad de las muestras de cebada, maíz, avena y trigo sin procesar, se encontraron niveles cuantificables de DON, siendo en maíz y trigo donde se encontraron mayores valores medios (>300 µg/kg) y máximos (>1500 µg/kg). Las muestras de cebada y avena presentaron valores medios cercanos a 150 µg/kg, y máximos cercanos a 500 µg/kg.

En cuanto a los resultados obtenidos en productos destinados a alimentación humana, los resultados reflejan que los cereales sin procesar destinados a alimentación contenían menores niveles que los cereales sin procesado previo no destinados a alimentación humana. Maíz, avena y trigo son los cereales en los que se encontraron valores medios más altos (en torno a 150-250 µg/kg), y máximos (600 a 1450 µg/kg), resultados similares a los obtenidos en cereales procesados, donde las muestras de trigo y maíz molido presentaron los mayores niveles de DON, y del mismo orden que sin procesar. En los distintos productos procedentes de la molienda de trigo, se comprobó que los niveles de deoxinivalenol encontrados en salvado de trigo fueron superiores a los del resto de productos de la molienda o a los niveles encontrados en productos elaborados a partir de trigo (p. ej. pasta, cereales para el desayuno, etc.).

En la Tabla 4 se resumen los niveles de deoxinivalenol obtenidos en piensos, que fueron los más altos obtenidos de entre todos los tipos de productos analizados. Los piensos destinados a aves de corral fueron los que presentaron mayores niveles de DON.

**Tabla 4.** Concentraciones de deoxinivalenol ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  88 % materia seca) en piensos destinados al sector ganadero (EFSA, 2013).

Tipo de pienso	N	%muestras <LC	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ 88% materia seca)	
			Media	Máximo
<b>Cereal en grano</b>	627	27,8%	741,5	31084
Cebada	154	28,6%	176,1	877
Maiz	205	29,3%	1041,9	4480
Avena	124	4,8%	1355,8	4489
Trigo	117	39,3%	434,4	24841
No especificado	27	66,7%	195,3	-
<b>Piensos compuestos</b>	1372	22,0%	548,4	1940
Piensos completos	1252	21,7%	573,7	20287
<i>Piensos para lechones</i>	60	66,7%	179,2	5761
<i>Piensos para engorde de cerdos</i>	116	25,0%	365,2	13078
<i>Piensos para cerdos lactantes</i>	58	25,9%	453,3	-
<i>Piensos de iniciación aves de corral</i>	54	16,7%	413,9	-
<i>Piensos de engorde aves de corral</i>	509	15,5%	638,5	1940
<i>Piensos para gallinas ponedoras</i>	82	28,0%	575,9	20224
<i>Piensos para engorde de pavos</i>	113	17,7%	893,7	24175
<i>Piensos para engorde de gansos</i>	63	6,3%	677,1	17344
<i>Piensos para engorde de patos</i>	80	5,0%	817,2	22077
<i>No especificado</i>	96	35,4%	337,9	13857
Piensos complementarios	77	35,1%	390,2	13048
Piensos compuestos, no especificados	43	7,0%	94,3	-
<b>Forrajes y productos derivados</b>	58	37,9%	1007,1	-
<b>Semillas oleaginosas, frutos oleaginosos y derivados</b>	25	72,0%	66,4	-
Soja tostada	15	73,3%	35,9	-
Otras semillas oleaginosas	10	70,0%	112,0	-
<b>Varios<sup>1</sup></b>	19	36,8%	416,8	-
<b>Otros<sup>2</sup></b>	36	16,7%	130,7	-

N: número de muestras, %muestras<LC: % de muestras con concentraciones de DON por debajo del límite de cuantificación. Media: media de los resultados cuantificados obtenidos. Máximo: máximo valor obtenido.

1 Azúcar caramelizado (5), residuos procedentes de producción de bebidas alcohólicas (5), productos procedentes de industria panadera y de fabricación de pastas alimenticias (6), no especificado (3).

2 Remolacha azucarera (3), guisantes (1), productos minerales (1), proteínas de origen animal procesadas (3), no especificado (28).

En relación al metabolito de deoxinivalenol estudiado, deoxinivalenol-3-glucósido y, pesar del número limitado de datos proporcionados (177 muestras de trigo y centeno sin procesar), se comprobó que el 5% de las muestras fueron positivas en la presencia del mismo, siendo además también cuantificables niveles de concentración de DON.

En relación a los derivados acetilados de DON, 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) y 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) se obtuvieron 3922 y 4032 resultados analíticos respectivamente en cereales sin procesar, alimentos y piensos. En cereales sin procesar, 86 muestras de cebada, maíz, avena, centeno y trigo tuvieron concentraciones de 3-acetil-deoxinivalenol, mientras que para 15-acetil-deoxinivalenol, solamente se obtuvieron en 19 muestras de maíz y trigo.

En alimentos, ambos fueron cuantificados en menos de un 5% de las muestras, excepto en maíz en grano, en los que se obtuvieron niveles de concentración cuantificables en 4 (12,5%) y 17 (53,1%) de las 32 muestras analizadas para 3 y 15-acetil-deoxinivalenol respectivamente. De las muestras de piensos analizadas, maíz y trigo obtuvieron niveles más altos de 3-ADON y 15-ADON que otros cereales como cebada, y además se pudo establecer que los niveles de cuantificación en muestras para el 15-ADON fueron más frecuentes que para el 3-ADON, ya que el primero fue encontrado en el 25,9% y 29,4% de las muestras de cereales y piensos compuestos respectivamente, mientras que el segundo fue cuantificable en el 12,5% y 2,1% de las muestras.

#### **4.5.5. Presencia de toxinas T-2 y HT-2 en piensos y alimentos**

---

Las toxinas T-2 (T2) y HT-2 (HT2), al igual que el resto de tricotecenos, se encuentra habitualmente en cereales, donde los hongos del género *Fusarium*, infectan las espigas de cereal. En el año 2011, la EFSA publicó un informe (EFSA, 2011c), en los que se recogieron datos sobre la presencia de toxinas T-2 y HT-2 en piensos y alimentos durante el periodo 2005-2010. De los resultados obtenidos (17686 para T2, 16536 para HT2, y 20519 para la suma de ambas), se comprobó que, aproximadamente el 35% de los resultados fue superior al límite de cuantificación establecido para los métodos analíticos utilizados, y que las máximas concentraciones para la suma de T2 y HT2 correspondieron a cereales y harinas, siendo la avena y

sus productos, el cereal que presentó mayor incidencia por contaminación de T2 y HT2.

En relación a alimentación humana, los cereales y los productos cuya base de composición eran los cereales (en especial pan, pastas alimenticias, cereales para el desayuno, etc.), fueron los principales alimentos que presentaron niveles de toxinas T-2 y HT-2 (expresados como suma de ambas), comprobándose a partir de los resultados, que la toxina HT-2 representaba aproximadamente dos tercios de la concentración de la suma de ambas.

Debido a que las toxinas T-2 y HT-2 son estables térmicamente y se encuentran habitualmente en la parte exterior del grano, operaciones habituales del procesado de cereales como la molienda, limpieza, tamizado, descascarillado, etc., no destruye las toxinas T-2 y HT-2 y lo que se produce es una distribución desigual entre las distintas fracciones obtenidas, siendo las fracciones que contengan la cáscara de grano y los productos alimenticios elaborados con ellas (salvado, etc.), las que presentan niveles más altos de concentraciones de T2 y HT2 (EFSA, 2011c).

De igual forma, operaciones habituales durante el procesado de productos alimenticios elaborados a partir de cereales, como el horneado y el cocinado no disminuyen los niveles preexistentes de toxinas T-2 y HT-2, aunque el malteado utilizado en cebada sí que los reduce significativamente (Bullerman y Bianchini, 2007; Cazzaniga et al., 2001). El procesado de los piensos compuestos no afectaba a los niveles previos de T2 y HT2.

Los resultados de incidencia de T2 y HT2 indicados en el informe de la EFSA (EFSA, 2011c), se muestran en la Tabla 5. En relación a los cereales destinados a alimentación animal, las muestras de avena y maíz, así como sus subproductos, entre los que hay que destacar las harinillas de avena y trigo, así como el gluten de trigo analizado, fueron las que presentaron mayores concentraciones para ambas toxinas. Las muestras de avena destinadas a alimentación animal, fueron las que presentaron un mayor nivel de concentración de T2 y HT2 expresado como suma (3061 µg/kg). En cuanto a los piensos compuestos analizados, todos presentaron niveles de incidencia por contaminación por T2 y HT2 similares, aunque los piensos analizados sin definir, y los destinados a alimentación de cerdas presentaron un nivel ligeramente superior de muestras por encima del límite de cuantificación (24-28%).



**Tabla 5.** Concentraciones de toxinas T-2 y HT-2, expresados como suma de ambas, en µg/ kg sobre 88 % materia seca, en piensos (EFSA, 2011).

Tipo de pienso	N	%muestras <LC	Concentración (µg/kg 88% materia seca)	
			Media	Máximo
<b>Cereal en grano</b>				
Cebada	228	69,0%	37	667
Maíz	219	69,0%	38	862
Harinillas de maíz	33	52,0%	54	493
Gluten de maíz	18	28,0%	54	157
Avena	161	13,0%	152	3061
Harinillas de avena	220	1,8%	300	1711
Sorgo	3	100,0%	0	0
Trigo	215	92,0%	14	71
Harinillas de trigo	60	38,0%	49	628
Salvado de trigo	9	67,0%	17	41
Gluten de trigo	71	4,2%	177	429
Triticale	46	89,0%	13	141
<b>Piensos compuestos</b>				
Piensos compuestos sin definir	890	72,0%	16	567
Piensos compuestos para terneros	10	90,0%	22	53
Piensos compuestos para vacuno	27	96,0%	20	53
Piensos compuestos para lechones	36	94,0%	18	48
Piensos compuestos para cerdos	29	93,0%	21	44
Piensos compuestos para cerdas	17	76,0%	25	75
Otros piensos	156	80,0%	24	245
Piensos compuestos para aves de corral	14	100,0%	17	44
<b>Forrajes y productos derivados</b>				
Alfalfa	3	100,0%	4	8
Hierba	3	100,0%	10	40
Ensilado de maíz	124	90,0%	24	259
<b>Semillas oleaginosas, frutos oleaginosos y derivados</b>				
Soja tostada	14	93,0%	5	21
Semillas de girasol	16	94,0%	9	89

N: número de muestras, %muestras<LC: % de muestras con concentraciones de DON por debajo del límite de cuantificación. Media: media de los resultados cuantificados obtenidos. Máximo: máximo valor obtenido.

---

## 4.6. Otras micotoxinas emergentes

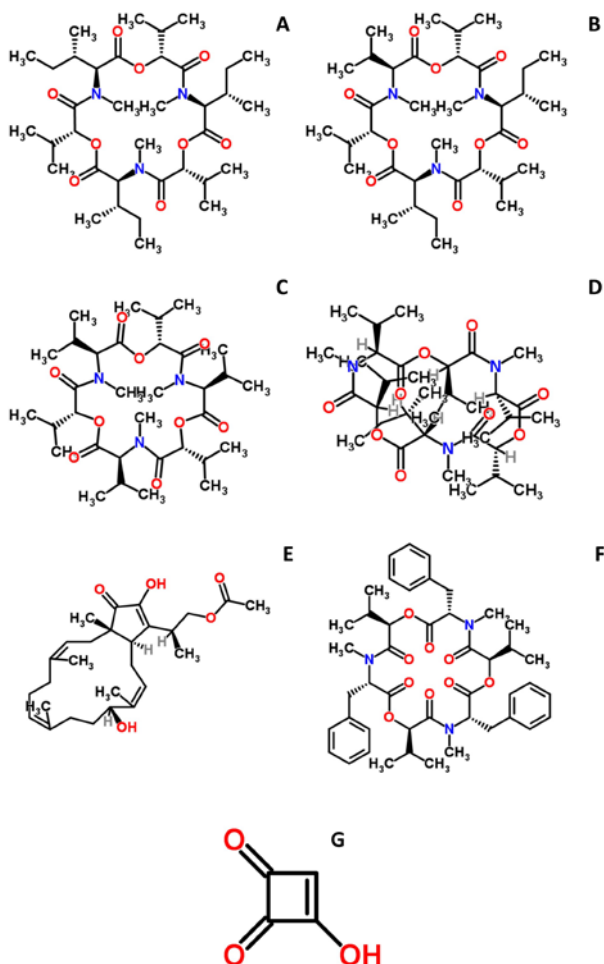
---

Se denominan toxinas emergentes a un grupo de micotoxinas producidas por *Fusarium*, que no se encuentran legisladas ni entran en los planes de muestreo regulados por la legislación, pero que durante los últimos años han adquirido especial interés debido a su posible toxicidad tanto en la salud humana como animal. Dentro del grupo de micotoxinas emergentes se incluyen la beauvericina (BEA), las eniatinas (ENNs), la fusaproliferina (FUS) y la moniliformina (MON).

La beauvericina y las eniatinas son micotoxinas cíclicas hexa depsipéptidas producidas por varias especies de *Fusarium*: *F. avenaceum*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. poae* y *F. tricinctum*. La fusaproliferina es un sesterterpeno bicíclico, producida por *F. antophilum*, *F. begoniae*, *F. bulbicola*, *F. circinatum*, *F. concentricum*, *F. succisae*, y *F. udum*. La moniliformina es una sal sódica o potásica de 3-hydroxiciclobut-3-ene-1,2-diona, y es producida por *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, y *F. proliferatum* (Jestoi, 2008; Nazari et al., 2015).

Todas han demostrado tener efectos tóxicos de diversa naturaleza. A partir de los datos de exposición en alimentación humana, se ha descartado posibles efectos tóxicos agudos, no así por exposición crónica (EFSA, 2014a).

En relación a las ENNs, las más conocidas son las eniatinas A, A1, B y B1, aunque se han identificado otras (eniatinas B2, B3, B4, D, E, F y G). La eniatina B es la más activa toxicológicamente dentro del grupo de las ENNs. Son citotóxicas, pueden tener actividad apoptótica celular, y ejercer como inhibidoras de la acilcoenzima A: colesterol aciltransferasa (ACAT). BEA tiene efectos citotóxicos y genotóxicos en los linfocitos, tanto humanos como animales, pudiendo provocar disfunción mitocondrial, ejercer como inhibidor específico de la enzima colesterol acetiltransferasa, e inducir a la apoptosis celular. La FUS tiene efectos teratógenos y patógenos mientras que la MON es un potente inhibidor del complejo piruvato deshidrogenasa, pudiendo inducir acidosis, inmunosupresión, debilidad muscular y efectos tóxicos cardiovasculares (EFSA 2014a, Nazari et al., 2015). La Figura 15 muestra la estructura química de ENNs, BEA, FUS y MON.



**Figura 15.** Estructura química de: eniatina (A), eniatina A1 (B), eniatina B (C), eniatina B1 (D), fusaproliferina (E), beauvericina (F) y moniliformina (G). <http://www.chemspider.com/>

Los cereales (maíz, arroz, cebada, trigo) y sus productos derivados (Abia et al., 2013; Jestoi et al., 2004; Serrano et al., 2013, 2012; Sifou et al., 2011), son los principales alimentos afectados por posible contaminación por estas micotoxinas, aunque otros productos como frutos secos y frutas desecadas también pueden verse afectadas (Nazari et al., 2015; Sebastià et al., 2012; Sifou et al., 2011). BEA y ENNs han sido detectados en huevos y tejidos de pavo y pollos de engorde, aunque en niveles suficientemente bajos para establecer que su contribución a la exposición humana sea marginal (EFSA, 2014a).

Los únicos estudios disponibles con respecto a posibles efectos adversos de estas micotoxinas en salud animal, están referidos a aves de corral para BEA y ENNs. Para pollos de engorde y gallinas ponedoras, se comprobó que eran sensibles a diferentes combinaciones de BEA y ENNs por ingestión de piensos contaminados con niveles de hasta 12,72 mg y 11,23 mg de eniatina B por kilogramo de pienso, y hasta 4,06 mg y 3,6 mg eniatina B1 de alimentación por kilogramo, respectivamente (EFSA, 2014a). La exposición en animales, puede ser debida a piensos contaminados por cereales, especialmente maíz.

Como se verá más adelante tanto en la realización experimental como en la discusión de resultados de los objetivos 3 y 4 de esta tesis, estas toxinas emergentes fueron objeto de identificación en los piensos comerciales analizados.

---

## **5. Legislación sobre micotoxinas**

---

### **5.1. Aspectos generales**

---

Las micotoxinas constituyen, desde su descubrimiento, uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes desde el punto de vista de la salud pública, la seguridad alimentaria y el bienestar animal. Por ello, y en aras de garantizar la protección de la salud de la población, los países han ido desarrollando una legislación para el control de las mismas tanto en alimentos como en piensos.

En las etapas iniciales de su desarrollo e implantación, la legislación para el control de micotoxinas en alimentos y piensos se centró principalmente en las aflatoxinas, ya que fueron las primeras micotoxinas en ser descubiertas y las primeras en ser asociadas a efectos nocivos para la salud. Así, en 1981, el número de países con legislación específica para micotoxinas era de 33, y paulatinamente se fue incrementando hasta llegar a 100 en 2003 (Van Egmond, 2004; Van Egmond et al., 2007).

El desarrollo legislativo para el control de micotoxinas depende de distintos factores, entre los que se pueden destacar:

- La disponibilidad de datos toxicológicos.

- La disponibilidad de datos sobre su distribución y concentraciones en piensos, alimentos e ingredientes.
- La existencia de métodos analíticos robustos, sensibles y reproducibles para su detección y cuantificación.
- La disponibilidad de datos sobre la influencia de los distintos procesos realizados en la cadena alimentaria en la concentración de micotoxinas.
- La existencia de legislación sobre las mismas en otros países o regiones económicas y su posible influencia en el intercambio comercial internacional.
- La necesidad de un suministro suficiente y adecuado de alimentación a la población.

El primer factor proporciona información sobre el peligro asociado al consumo de micotoxinas, basado tanto en su toxicidad aguda como crónica individual, mientras que el segundo, informa acerca del grado de exposición a las mismas. Ambos, de forma conjunta, constituyen los dos criterios necesarios para establecer o evaluar el riesgo asociado al consumo de micotoxinas en la dieta, que es la base para su posterior desarrollo legislativo. En conjunto, la evaluación del riesgo se realiza mediante la identificación y caracterización del factor de peligro de cada micotoxina, evaluando la relación dosis-respuesta, la determinación de la exposición en dieta, y finalmente, mediante la caracterización del riesgo o estimación de la probabilidad de que puedan producir efectos nocivos potenciales para la salud humana o animal.

La evaluación del riesgo se basa en informes científicos de diversos organismos internacionales, entre los que se pueden destacar el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y la EFSA.

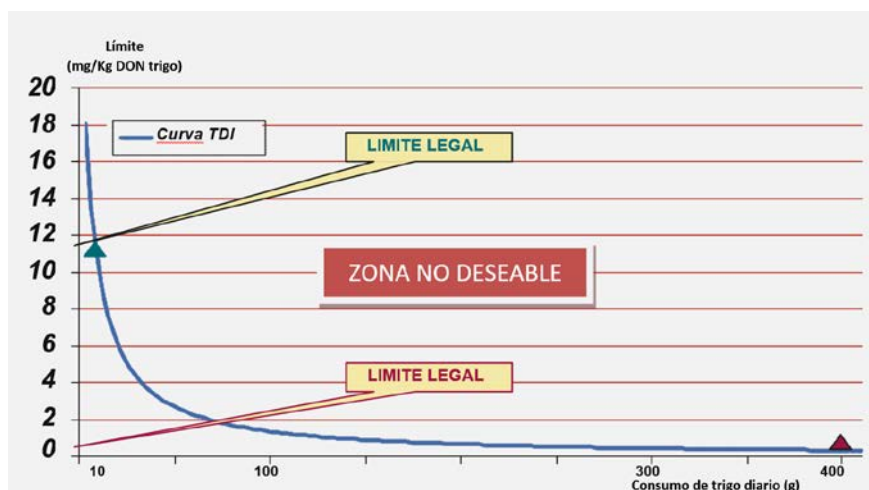
El primero es un comité científico internacional de expertos administrado conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS, "World Health Organization", WHO). Desde 1990, y hasta 2014 el JECFA ha emitido diversos informes de evaluación toxicológica sobre las principales micotoxinas (WHO/FAO, 1990, 1991, 1996, 1999, 2000, 2002, 2008, 2011 y 2012) y en febrero de 2001, un informe específico de micotoxinas (WHO/FAO, 2001), en el que, además de abordar datos relativos a seguridad en productos alimenticios (toxicidad, niveles de exposición y

evaluación del riesgo), se abordaron otros aspectos como planes de muestreo y métodos de análisis y control dentro de la seguridad alimentaria.

La EFSA es una agencia de la Unión Europea, en funcionamiento desde 2002, que ofrece asesoramiento científico a instituciones de la UE o de sus estados miembros y comunica los riesgos existentes y emergentes asociados a la cadena alimentaria. Entre las funciones que ejerce la Comisión Europea, a través de la EFSA, se encuentra recopilar y evaluar la información disponible sobre la presencia y toxicidad de micotoxinas en piensos y alimentos y establecer recomendaciones en la investigación de nuevos datos, con el objetivo de determinar y mejorar la evaluación del riesgo a la exposición humana y animal a las mismas. Dicha tarea se realiza a través del grupo de expertos de contaminantes de la cadena alimentaria (“Panel on Contaminants in the Food Chain”, CONTAM), en el caso de alimentación de humana, y a través del grupo de expertos sobre aditivos y productos o sustancias utilizados en alimentación animal (“Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed”) (EFSA, 2004a, 2004b, 2004c, 2005a, 2005b, 2005c, 2006a, 2006b, 2007, 2009, 2010a, 2010b, 2010c, 2011a, 2001b, 2011c, 2012a, 2012b, 2012c, 2013a, 2013b, 2013c, 2014a, 2014b).

A nivel mundial, la evaluación de la toxicidad de micotoxinas, establecida por las distintas autoridades, es la misma, utilizándose para su cuantificación distintos índices de toxicidad como la ingesta diaria admisible (IDA), la dosis diaria admisible (DDA) o la ingesta diaria tolerable (TDI), que se calculan a partir de los valores experimentales NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) y LOAEL (nivel de mínimo efecto tóxico observable), entre otros. Para establecer los niveles de toxicidad de contaminantes de aguas y alimentos, los principales organismos internacionales utilizan habitualmente la TDI.

A diferencia de la toxicidad, la exposición es variable en función de los niveles de contaminación de los productos alimenticios implicados, así como por los hábitos de consumo, de forma que, a mayores niveles de consumo de un producto alimenticio, y considerando un nivel de contaminación constante de micotoxinas, menores límites legales deberán establecerse en aras de establecer un adecuado nivel de protección de la salud. Esto se puede apreciar mejor a través de gráficas en la que fijado un valor de TDI, se represente el límite legal teórico a establecer en la legislación frente al consumo del alimento (Shepard, 2004; Van Egmond et al., 2007).



**Figura 16.** Efectos de la variación en el consumo diario de maíz en la población en el establecimiento de límites legales para DON. (Shepard, 2004)

La Figura 16 es un ejemplo de este tipo de gráficos. En ella se ha representado el consumo de trigo frente al límite legal teórico de DON a establecer en la legislación. Si se fijara para DON una TDI de  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal por día, para una persona de 60 kg, el máximo de ingesta diaria de deoxinivalenol sería de  $180 \mu\text{g}$ . Si el valor de contaminación medio en trigo por deoxinivalenol fuera de  $2250 \mu\text{g}/\text{kg}$  en el país de estudio, con un consumo medio de trigo diario de 400 g, la exposición en dieta correspondería a  $15 \mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/día, un 500% superior (triángulo rojo) a la TDI establecida. Por ello, los límites legales en el ejemplo deberían fijarse buscando el área por debajo de la curva TDI, que sería la zona segura, a diferencia de la superior, que sería la zona con riesgo de superar la TDI por consumo. Siguiendo el ejemplo, si ahora el consumo medio de trigo en un país fuera de 10 g, se podría establecer un límite en la legislación  $11 \text{ mg}/\text{kg}$  de DON, ya que en ningún caso se podría superar el valor de TDI, mientras que si el consumo diario fuera aumentando, necesariamente sería necesario disminuir el citado límite.

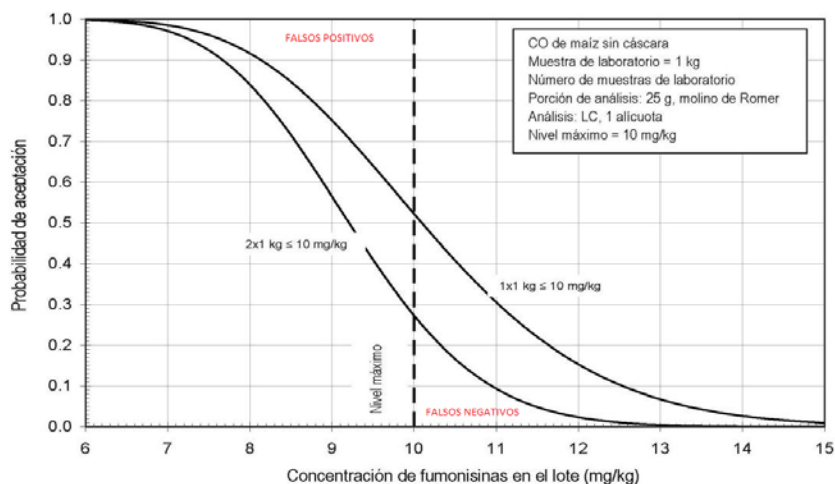
Para poder establecer datos de exposición en productos alimenticios, es clave establecer y regular métodos de tomas de muestras y de análisis adecuados. A diferencia de otros contaminantes alimentarios, la distribución del contenido en micotoxinas en productos alimenticios puede ser muy heterogénea, y en un mismo lote, habitualmente solamente una pequeña parte está contaminada con niveles de concentración de micotoxinas muy

alto. Por ello es necesario, el establecimiento legalmente de criterios que aseguren la representatividad en la toma de muestras realizada, previo a su análisis en el laboratorio.

La variabilidad en los resultados obtenidos en la evaluación de los niveles de contaminación de micotoxinas en muestras, en función del tipo de muestras y la preparación de muestra llevada a cabo antes de su envío al laboratorio, ha sido objeto de estudio (Whitaker, 2006). Whitaker desarrolló las gráficas denominadas “curvas de características de la operación” (“operating characteristic curves”, OC curves) en las que se representa, para un determinado plan de muestreo, el riesgo de aceptar un determinado lote de un producto alimenticio con un nivel de concentración de micotoxina inaceptable. A modo ejemplo (Figura 17), se indica una curva OC referida a fumonisinas. En la misma se puede apreciar que para la misma partida a muestrear, si la toma de muestras se realiza obteniendo 2 ejemplares de 1 kg, y ambos resultan negativos en cuanto a presencia de fumonisinas, la probabilidad de obtener falsos negativos es inferior a si, para el mismo resultado, solamente se hubiera optado por un único ejemplar. También se puede apreciar que, para el mismo caso, la probabilidad de obtener resultados falsos positivos es mayor cuanto mayor es el número de ejemplares tomados, lo cual tiene una menor importancia si solamente se valora garantizar la inocuidad del lote.

Por tanto, los métodos de toma de muestra de micotoxinas, objeto de ser incluidos en la legislación, deben ser sencillos y representativos del conjunto o lote de producto a analizar, conteniendo un volumen de muestra suficiente del lote. Este volumen de muestra tomado debe ser mayor cuanto menor es la concentración de la micotoxina establecida como límite en la legislación para ese producto, y también mayor, cuanto mayor sea la heterogeneidad en su distribución en el lote. Dicha heterogeneidad vendrá marcada por varios factores, entre los que se incluyen, las características de crecimiento de su hongo productor, las propias que influyen en la producción de las micotoxinas, la naturaleza del propio producto alimenticio una vez contaminado (p. ej. sólido o líquido, etc.), y los posibles tratamientos tecnológicos aplicados en la industria que pueda sufrir el producto alimenticio (molido, mezclado, etc.) (Bullerman y Bianchini, 2007).





**Figura 17.** Curvas características de operación del funcionamiento de planes de muestreo que utilizan muestras de 1, 2 y 5 kg para detectar las fumonisinas en lotes de maíz sin cáscara para un nivel máximo de 10 mg/kg (FAO, 2013)

Además de métodos de muestreo fiables, son necesarios métodos analíticos adecuados, es decir, deben ser lo más veraces, precisos, y reproducibles posibles, para que la vigilancia rutinaria de los niveles de concentración de micotoxinas sea factible. Además, sus límites de cuantificación deben ser precisos y adecuados a los niveles de concentración de las micotoxinas objeto de control.

Actualmente los métodos utilizados por las autoridades competentes son validados utilizando una serie de requisitos y criterios establecidos internacionalmente. En la Unión Europea, los laboratorios que participan en el control oficial de micotoxinas en productos alimenticios y piensos se rigen por la norma de calidad ISO 17025, desarrollada por la Organización Internacional de Normalización (“International Organization for Standardization”, ISO) y publicada en España bajo la nomenclatura UNE-EN ISO/IEC 17025.

La norma ISO 17025, además de introducir requisitos comunes y habituales a la norma de calidad ISO 9001, con la cual tiene bastantes aspectos en común, introduce aspectos propios de la actividad analítica habitual que se realiza en los laboratorios, como la recomendación de utilizar materiales de referencia certificados (muestras de matrices con un contenido conocido en una o más micotoxinas) o establecer la obligación de los

laboratorios acreditados por la norma ISO 17025, de participar regularmente en ensayos interlaboratorio, que se definen como el análisis, realizado de forma simultánea por los laboratorios participantes en una misma muestra, cuyo contenido en micotoxinas solamente es conocido por el organizador del ensayo.

Si el laboratorio demuestra documentalmente que los métodos de ensayo desarrollados para determinación de micotoxinas (u otros analitos) cumplen todos los criterios establecidos en la norma ISO 17025, se le puede otorgar el reconocimiento oficial (o acreditación) por parte de organismos reconocidos y aceptados internacionalmente, que, en el caso de España, es la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). En Europa solamente los laboratorios acreditados pueden participar en el control oficial de productos alimenticios, que se define, según el artículo 2 del Reglamento N° 882/2004 (European Parliament, 2004b) como “toda forma de control que efectúe la autoridad competente o la Comunidad (Unión Europea) para verificar el cumplimiento de la legislación sobre piensos y alimentos, así como las normas relativas a la salud animal y el bienestar de los animales”. Es decir, que solamente los resultados de aquellos laboratorios acreditados por la norma UNE 17025 tienen plena validez legal y administrativa, a todos los efectos.

Existen varias organizaciones internacionales, entre las que destacan la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, “Association of Official Analytical Chemists”) y el Comité Europeo de Normalización (CEN), que se encargan del desarrollo, validación y publicación de métodos de ensayo analíticos, todos ellos basados en rigurosas validaciones interlaboratorios y que actúan como métodos de referencia en distintos países. Además, también establecen los criterios para la acreditación de los laboratorios. En el caso de micotoxinas, AOAC tiene más de 50 métodos analíticos para la determinación de micotoxinas (AOAC, 2016), mientras que el CEN, tiene más de 15.

Los efectos económicos de la legislación de micotoxinas de los distintos países y sus efectos en las transacciones económicas no son fácilmente predecibles. Además de factores económicos y de seguridad alimentaria, se han de tener en cuenta otros factores como es el hecho de que una excesiva regulación o límites en determinados productos, considerados de primera necesidad como los cereales, puede dificultar el acceso a los mismos a una parte de la población, pudiéndose producir situaciones de carestía alimentaria. Por ejemplo, en un brote de aflatoxicosis aguda producido en Kenia durante los años 2004 y 2005 (Lewis et al., 2005) se comprobó que una

de las causas del mencionado brote fue la entrada en el canal de comercialización de partidas de maíz contaminadas debido a la carencia existente de producto para la población y ser el maíz, parte fundamental de su dieta diaria.

Wu (2006) analizó los efectos económicos de los límites estrictos establecidos por la Unión Europea para el contenido de aflatoxinas en pistachos y almendras. Para la industria del pistacho, los efectos se pueden considerar como positivos, porque aquellos operadores económicos cuyos productos tenían mayores garantías sanitarias pudieron vender sus productos con un precio mayor y además forzó a aquellos que no a adoptar medidas para un mejor control del contenido de aflatoxinas (por ejemplo, Irán). Sin embargo, en el caso de la industria de la almendra, de forma general provocó pérdidas al reducirse la producción, aumentar los precios y bajar el nivel de ventas.

## **5.2. Legislación sobre micotoxinas en la Unión Europea**

---

El punto de partida de la legislación alimentaria europea actual relativa a micotoxinas surge a partir del año 1993, a través del Reglamento CEE Nº 315/93 (Council Regulation, 1993), que además de definir el concepto de contaminante como *“cualquier sustancia que no haya sido agregada intencionadamente al alimento en cuestión, pero que sin embargo se encuentra en el mismo como residuo de la producción (incluidos los tratamientos administrados a los cultivos y al ganado y en la práctica de la medicina veterinaria), de la fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como consecuencia de la contaminación medioambiental”*, estableció la iniciativa legislativa relacionada con contaminantes alimentarios en la Comisión Europea, asistida por el Comité Permanente de Productos Alimenticios. Posteriormente, este último cambió su denominación a Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal (Standing Committee on the Food Chain and Animal Health, SCFAH), a través del artículo 58 del Reglamento (EC) Nº 178/2002 (European Parliament, 2002a).

Siguiendo las directrices establecidas en el Reglamento (CEE) Nº 315/93, se publicó en el año 2001 el Reglamento (CE) Nº466/2001 (European Commission, 2001) que estableció a nivel europeo límites de concentración

para aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en cereales y frutos secos, así como M<sub>1</sub> en leche, complementando la legislación que ya existía en España, a través del Real Decreto 475/1988 (RD, 1988), que ya establecía límites máximos para aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en alimentos. No es hasta el año 2003, con diversas modificaciones al Reglamento N° 466/2001, cuando se introdujeron límites de concentración para otras micotoxinas, como patulina (European Commission, 2003b), OTA (European Commission, 2004), o ZEA, DON y fumonisinas (European Commission, 2005).

Debido a las crisis alimentarias originadas a finales del s. XX y principios del s. XXI, especialmente la crisis de las “vacas locas” surgida en Reino Unido, la Comisión Europea publicó en el año 2000 el Libro Blanco sobre seguridad alimentaria, que fue el fundamento del Reglamento 178/2002 (European Parliament, 2002a), piedra angular de la actual política de seguridad alimentaria dentro de la Unión Europea y desarrollado, en el ordenamiento jurídico español, por la Ley 17/2011 de seguridad alimentaria y nutrición (Ley, 2011). En dicho reglamento, se introducen los principios generales en los que se basa la política de seguridad alimentaria dentro de la UE, que son:

- El análisis de riesgos
- El principio de cautela
- El principio de protección de los consumidores
- El principio de transparencia

De igual modo establece las obligaciones generales del comercio de alimentos dentro de la UE, los requisitos generales de la legislación y seguridad alimentaria, incluyendo el concepto de trazabilidad, y crea la EFSA como organismo europeo encargado del asesoramiento científico independiente sobre los riesgos alimentarios existentes y emergentes.

En lo concerniente a la legislación sobre micotoxinas relativa a alimentos, el año 2006 fue clave por la aparición de los Reglamentos N° 1881/2006 y N° 401/2006.

El Reglamento N° 1881/2006 (European Commission, 2006a) derogó la anterior legislación (Reglamento N° 466/2001), y es la disposición legal a nivel europeo que actualmente determina los límites de concentración de las

siguientes micotoxinas en alimentos dentro de la UE, y también para productos importados;

- Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>
- Ocratoxina A
- Zearalenona
- Patulina
- Deoxinivalenol
- Fumonisinias B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>
- Toxinas T-2 y HT-2
- Citrinina
- Alcaloides del cornezuelo del centeno

Es necesario puntualizar que, en España coexiste con el citado Reglamento, el Real Decreto 475/1988 (RD, 1988), que estableció los límites de concentración de las cuatro aflatoxinas principales en alimentos, en 5 µg/kg para la AFB<sub>1</sub> y 10 µg/kg para la suma de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>, y cuya validez legal es plena siempre que no entre en contraposición con el Reglamento N° 1881/2006.

El Reglamento N° 401/2006 (European Commission, 2006b), establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, y ha supuesto un cambio sustancial para todos los agentes implicados en el control oficial de productos alimenticios. En una primera parte, el Reglamento N° 401/2006, incluye la obligatoriedad de aplicar métodos de muestreo específicos en función del tipo de producto alimenticio, el tamaño del lote, y el establecimiento alimentario (industria o comercio minorista).

Sin embargo, es su segunda parte la de mayor interés para los laboratorios participantes en el control oficial de micotoxinas en alimentos, ya que hace referencia a los criterios que deben cumplir los métodos de ensayo en la determinación de micotoxinas. Dichos criterios son:

1. Los métodos de análisis que se desarrollen se caracterizarán por seguir los siguientes criterios: exactitud, aplicabilidad (matriz y gama de

concentración), límite de detección, límite de determinación, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, recuperación, selectividad, sensibilidad, linealidad e incertidumbre de medida.

2. Los valores de precisión se obtendrán, en base a los ensayos para determinar los criterios de funcionamiento relativos a los métodos de análisis. Los valores de repetibilidad y reproducibilidad se expresarán en una forma reconocida internacionalmente (por ejemplo, intervalos de confianza del 95 %, tal como los definen la norma ISO 5725:1994 o la IUPAC). Los resultados del ensayo colectivo serán publicados o de libre acceso.

A efectos del cumplimiento del punto 2, el Reglamento N° 401/2006 estableció los criterios de funcionamiento de los métodos de ensayo aplicables a aflatoxinas, OTA, ZEA, fumonisinas, DON, toxinas T-2 y HT-2, patulina y citrinina, que se resumen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Criterios de precisión y exactitud para métodos de ensayo establecidos por el Reglamento N° 401/2006.

Criterio Aflatoxinas	Intervalo de concentración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Valor recomendado	Valor máximo autorizado
Blancos	Todos	Desdeñable	-
Recuperación Aflatoxina M <sub>1</sub>	0,01-0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$	60 a 120 %	
	> 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$	70 a 110 %	
Recuperación Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 a 120 %	
	1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	70 a 110 %	
	>10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	80 a 110 %	
Reproducibilidad (RSD <sub>R</sub> )	Todos	Derivada de la ecuación Horwitz	2 × valor derivado de la ecuación de Horwitz

Criterio Ocratoxina A			
Contenido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Recuperación %
< 1	≤ 40	≤ 60	de 50 a 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	de 70 a 110

**Tabla 6.** Criterios de precisión y exactitud para métodos de ensayo establecidos por el Reglamento N° 401/2006 (continuación).

<b>Criterio Patulina</b>				
<b>Contenido (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>RSD<sub>R</sub> %</b>	<b>Recuperación %</b>	
< 20	$\leq 30$	$\leq 40$	de 50 a 120	
20–50	$\leq 20$	$\leq 30$	de 70 a 105	
> 50	$\leq 15$	$\leq 25$	de 75 a 105	

<b>Criterio Fumonisin B<sub>1</sub> o B<sub>2</sub></b>				
<b>Contenido (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>RSD<sub>R</sub> %</b>	<b>Recuperación %</b>	
$\leq 500$	$\leq 30$	$\leq 60$	de 60 a 120	
> 500	$\leq 20$	$\leq 30$	de 70 a 110	

<b>Criterio Deoxinivalenol</b>				
<b>Contenido (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>RSD<sub>R</sub> %</b>	<b>Recuperación %</b>	
> 100 y $\leq 500$	$\leq 20$	$\leq 40$	de 60 a 110	
> 500	$\leq 20$	$\leq 40$	de 70 a 120	

<b>Criterio Zearalenona</b>				
<b>Contenido (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>RSD<sub>R</sub> %</b>	<b>Recuperación %</b>	
$\leq 50$	$\leq 40$	$\leq 50$	de 60 a 120	
> 50	$\leq 25$	$\leq 40$	de 70 a 120	

<b>Criterio Toxinas T-2 ó HT-2</b>				
<b>Contenido (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>RSD<sub>R</sub> %</b>	<b>Recuperación %</b>	
15-250	$\leq 30$	$\leq 50$	de 60 a 130	
> 250	$\leq 25$	$\leq 40$	de 60 a 130	

<b>Criterio Critinina</b>				
<b>Contenido (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>RSD<sub>R</sub> % Recomendada</b>	<b>RSD<sub>R</sub> % Máxima autorizada</b>	<b>Recuperación %</b>
> 250	$0,66 \times \text{RSD}_R$	Derivada de la ecuación Horwitz	Derivada de la ecuación Horwitz	de 70 a 120

Además de los citados reglamentos, se han publicado varias recomendaciones sobre otros compuestos fúngicos como los alcaloides de cornezuelo del centeno, alcaloides opiáceos, alcaloides tropánicos (European Commission 2012, 2014, 2015), o sobre medidas encaminadas a la prevención en la aparición de micotoxinas (European Commission, 2003c, 2006c, 2013), instando a los Estados miembros a adoptar medidas.

Respecto a la legislación europea sobre micotoxinas en piensos, el punto de partida se produjo con la publicación de la Directiva 1999/29/CE (Council Directive, 1999), en la que se establecían límites de concentración en el contenido de aflatoxina B1 en distintos tipos de piensos. Posteriormente, dicha directiva fue derogada por la Directiva 2002/32/CE (European Parliament, 2012b), en la que, además de una actualización en los valores de concentración introducidos por la Directiva 1999/29/CE para la AFB1, se introdujeron nuevos para los alcaloides ergóticos (cornezuelo del centeno). Esta directiva fue trasladada al ordenamiento jurídico español a través del Real Decreto 465/2003 (RD, 2003) e incluido dentro del grupo de sustancias sujetas a las medidas de control del Plan Nacional de Investigación de Residuos establecido según el Real Decreto 1749/1998 (RD, 1998).

Tras varios dictámenes solicitados por la Comisión Europea a la EFSA, se determinó que el DON, la ZEA, la OTA y las fumonisinas (EFSA, 2004a, 2004b, 2004c, 2005a, 2005b), podían tener efectos tóxicos en varias especies animales. También se determinó que su presencia en productos animales derivados (huevos, carne, leche) y, por consiguiente, su incidencia en la exposición humana por su ingesta, era limitada. No obstante, y en aras de aumentar la vigilancia de su presencia por parte de todos los Estados miembros de la Unión Europea, a través de los distintos planes de muestreo, la Comisión Europea estableció a través de la Recomendación 2006/576/CE (European Commission, 2006d), límites de concentración para ZEA, DON, OTA, FB1 y FB2 en piensos y sus materias primas. Finalmente, para las toxinas T-2 y HT-2, se establecieron sus niveles de concentración en la Recomendación 2013/165/UE (European Commission, 2013) en productos a bases de cereales en piensos y piensos compuestos. A modo de resumen, en la Tabla 7, se indican los valores de los límites de concentración de micotoxinas establecidos actualmente en la legislación europea para piensos y sus materias primas.



**Tabla 7.** Límites máximos de concentración establecidos actualmente en la legislación europea para piensos y sus materias primas.

Micotoxina	Productos destinados a la alimentación animal	Valor orientativo en mg/kg (ppm) para piensos con un contenido de humedad del 12 %
<b>Aflatoxina B<sub>1</sub></b> (Directiva 32/2002)	1. Materias primas para piensos	0,02
	2. Piensos complementarios y completos, con excepción de:	0,01
	3. Piensos compuestos para vacas lecheras y terneros, ovejas lecheras y corderos, cabras lecheras y cabritos, lechones y aves de corral jóvenes,	0,005
	4. Piensos compuestos para bovinos (excepto vacas lecheras y terneros), Ovinos (excepto ovejas lecheras y corderos), caprinos (excepto cabras lecheras y cabritos), porcinos (excepto lechones) y aves de corral (excepto animales jóvenes).	0,02
<b>Cornezuelo del centeno</b> (Directiva 32/2002)	Materias primas para piensos y piensos compuestos que contienen cereales no molidos.	1000
<b>Deoxinivalenol</b> (Recomendación 2006/576/CE)	Materias primas para piensos:	
	1. Cereales y productos a base de cereales, con excepción de los	8
	2. Subproductos de maíz	12
	3. Piensos complementarios y completos, con excepción de:	5
	3.1 Piensos complementarios y completos para cerdos	0,9
3.2 Piensos complementarios y completos para terneros (menores de cuatro meses), corderos y cabritos	2	
<b>Zearalenona</b> (Recomendación 2006/576/CE)	Materias primas para piensos:	
	1. Cereales y productos a base de cereales, con excepción de los	2
	2. Subproductos de maíz	3
	Piensos complementarios y completos:	
	3. Piensos complementarios y completos para lechones y cerdas	0,1
	4. Piensos complementarios y completos para cerdas y cerdos de	0,25
5. Piensos complementarios y completos para terneros, ganado lechero, ovejas (incluidos los corderos) y cabras (incluidos los cabritos)	0,5	
<b>Ocratoxina A</b> (Recomendación 2006/576/CE)	Materias primas para piensos:	
	1. Cereales y productos a base de cereales	0,25
	Piensos complementarios y completos:	
	2. Piensos complementarios y completos para cerdos	0,05
3. Piensos complementarios y completos para aves de corral	0,1	
<b>Fumonisinias B1+B2</b> (Recomendación 2006/576/CE)	Materias primas para piensos:	
	1. Maíz y productos a base de maíz	60
	Piensos complementarios y completos para:	
	2. Cerdos, caballos (équidos), conejos y animales de compañía	5
	3. Peces	10
	4. Aves de corral, terneros (menores de cuatro meses), corderos	20
5. Rumiantes mayores de cuatro meses y visones	50	
<b>Toxinas T-2 y HT-2</b> (Recomendación 2013/165/UE)	Productos a base de cereales en los piensos y los piensos	
	1. Productos de la molienda de avena (cáscaras)	2
	2. Otros productos a base de cereales	0,5
	3. Piensos compuestos, excepto los piensos para gatos	0,25

---

## 6. Piensos destinados a alimentación animal

---

### 6.1. Tipos de piensos y clasificación

---

El Reglamento N° 178/2002 (European Parliament, 2002a), estableció la necesidad de incluir requisitos para los piensos implicados en la cadena alimentaria, tanto en su producción como en su uso, definiéndolos como *“cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, destinado a la alimentación por vía oral de los animales, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente como si no”*.

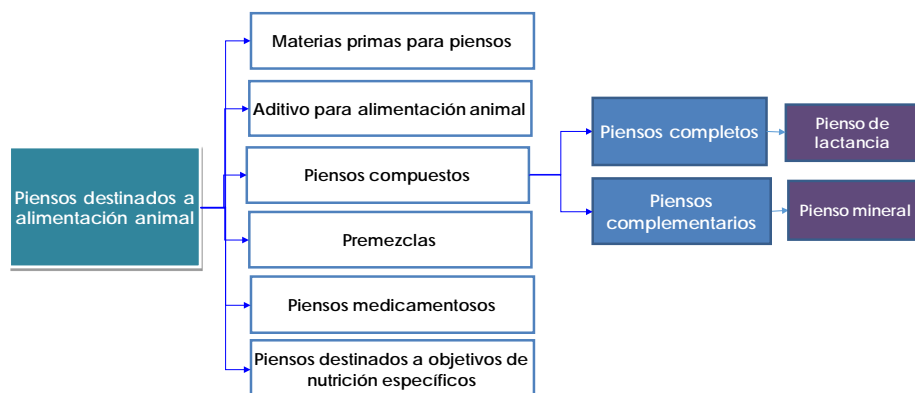
De la definición anterior, es necesario aclarar que animales son susceptibles de ser alimentados con piensos. Así, según la Directiva 2002/32/CE (European Parliament, 2012b), son *“los animales pertenecientes a especies que el ser humano normalmente alimenta y posee o consume y los animales que viven libremente en la naturaleza, cuando sean alimentados con piensos”*. Como complemento al concepto anterior, el Reglamento N° 767/2009 (European Parliament, 2009) establece el concepto de animal destinado a la producción de alimentos, como *“cualquier animal alimentado, criado o mantenido en cautividad para la producción de alimentos para el consumo humano, incluidos los animales que no son consumidos pero que pertenecen a especies que normalmente se utilizan para el consumo humano”*.

Debido a la gran variedad de sustancias susceptibles de ser utilizadas en alimentación animal, resulta necesario realizar su clasificación. Así, el Reglamento N° 767/2009, establece en su preámbulo, que los piensos pueden presentarse como materias primas para piensos, piensos compuestos, aditivos para piensos, premezclas y piensos medicamentosos.

Otro concepto de interés establecido por el Reglamento N° 767/2009 es la diferenciación entre piensos compuestos, completos y complementarios. Los piensos compuestos son *“la mezcla de al menos dos materias primas para piensos, tanto si contienen aditivos para piensos como si no, y destinados a la alimentación de los animales por vía oral en forma de pienso completo o complementario”*.

Se consideran piensos completos los piensos compuestos que, por su composición, basta con una ración diaria para garantizar y satisfacer todas las

necesidades nutritivas de los animales, mientras que se considera piensos complementarios aquellos piensos compuestos con un contenido elevado de determinadas sustancias pero que, debido a su composición, no son suficientes, por sí mismos, para satisfacer las necesidades del animal con una ración diaria a menos que se utilice en combinación con otros piensos. La Figura 18 resume el conjunto de tipos de piensos definidos en la normativa europea.



**Figura 18.** Tipos de piensos definidos en la normativa de la Unión Europea.

Otros conceptos de interés incluidos en el Reglamento N° 767/2009 son el de pienso mineral, que se define como “*aquel pienso complementario que contiene como mínimo un 40 % de cenizas brutas*”, el de pienso de lactancia definido como “*aquel pienso compuesto administrado en forma seca o tras su dilución en una cantidad específica de líquido para alimentar animales jóvenes como complemento o sustituto de la leche poscalostrual, o para alimentar animales jóvenes como terneros, corderos o cabritos destinados al sacrificio*” y el de pienso destinado a objetivos de nutrición específicos, definiéndolo como el “*pienso que puede satisfacer un objetivo de nutrición específico gracias a su composición o método de fabricación concreto, que lo distingue claramente de los piensos ordinarios*”.

Es necesario aclarar que los piensos destinados a objetivos de nutrición específicos no incluyen los piensos medicamentosos, que según las Directivas N° 90/167/CEE (Directive, 1990) y N° 81/851/CEE (Directive, 1981) son “*toda mezcla de medicamento(s) veterinario(s) y de alimento(s) preparada previamente a su comercialización y destinada a ser administrada a los animales sin transformación en razón de las propiedades curativas o preventivas o de otras propiedades del medicamento definidas*”.

El Reglamento N° 1831/2003 (European Parliament, 2003), sobre los aditivos en la alimentación animal, los define como “aquellas sustancias, microorganismos y preparados distintos de las materias primas para piensos y de las premezclas, que se añaden intencionadamente a los piensos o al agua a fin de realizar una o varias de las siguientes funciones”:

- a) influir positivamente en las características del pienso
- b) influir positivamente en las características de los productos animales
- c) influir favorablemente en el color de los pájaros y peces ornamentales
- d) satisfacer las necesidades alimenticias de los animales
- e) influir positivamente en las repercusiones medioambientales de la producción animal
- f) influir positivamente en la producción, la actividad o el bienestar de los animales, especialmente actuando en la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los piensos
- g) tener un efecto coccidiostático o histomonostático

Así mismo define el concepto de premezclas de aditivos como las “mezclas de aditivos para alimentación animal o mezclas de uno o más aditivos para alimentación animal con materias primas para piensos o agua utilizadas como soporte que no se destinan a la alimentación directa de los animales”.

Por último, el Reglamento n° 767/2009 establece que las materias primas para piensos son “los productos de origen vegetal o animal, cuyo principal objetivo es satisfacer las necesidades nutritivas de los animales, en estado natural, fresco o conservado, y los productos derivados de su transformación industrial, así como las sustancias orgánicas o inorgánicas, tanto si contienen aditivos para piensos como si no, destinadas a la alimentación de los animales por vía oral, directamente como tales o transformadas, o en la preparación de piensos compuestos o como soporte de premezclas”.

A tal efecto el Reglamento (UE) n° 242/2010 (European Commission, 2010), estableció el catálogo de materias primas para piensos, clasificándolas en las siguientes categorías:

1. Granos de cereales, sus productos y subproductos: Se incluyen los principales cereales de uso alimentario (avena, cebada, arroz, mijo, centeno, sorgo, trigo, maíz, espelta y tritical), subproductos (harinas forrajeras y harinillas, cáscaras y salvado, tortas, copos, almidón (para trigo y maíz) así como residuos de otros procesos de la industria alimentaria como los residuos desecados de cervecería y destilería.
2. Semillas oleaginosas, frutos oleaginosos, sus productos y subproductos: Se incluyen distintos productos (harina de extracción, torta de presión, cáscaras, semillas, concentrado, etc.) de colza, copra, palmiste, soja, semilla de algodón, nígel, girasol, lino, sésamo y cacao.
3. Semillas de leguminosas, sus productos y subproductos: Se incluyen garbanzos, torta de extracción de harina de guar, yeros, almortas, lentejas, altamuces dulces, judías tostadas, guisantes, harinillas y salvado de guisantes, habas y haboncillos, alverja y berzas.
4. Tubérculos, raíces, sus productos y subproductos: Se incluyen pulpa, azúcar, vinazas y melazas de remolacha azucarera, patata dulce, mandioca, almidón de mandioca pregelatinizado, pulpa, fécula, copos y proteína de patata, jugo de patata concentrado y fécula de patata hinchada.
5. Otras semillas y frutas, sus productos y subproductos: Se incluyen harina de algarroba (garrofa), pulpa de cítricos, hollejo de fruta, pulpa de tomate, torta de extracción de granilla, pulpa y granilla de uva.
6. Forrajes y forrajes groseros: Se incluyen harina y residuos de alfalfa, concentrado de proteína de alfalfa, harina de trébol, harina de hierba, paja de cereales y paja de cereales tratada.
7. Otras plantas, sus productos y subproductos: Se incluyen melaza, vinaza y azúcar de caña de azúcar y harina de algas.
8. Productos lácteos: Se incluyen leche desnatada en polvo, mazada en polvo, suero de leche en polvo, suero de leche parcialmente delactosado en polvo, proteína de suero en polvo, caseína en polvo y lactosa en polvo.
9. Productos de animales terrestres: Se incluyen harina de carne, harina de carne y huesos, harina de huesos, chicharrones, harina de aves de corral, harina de plumas hidrolizada, harina de sangre y grasas animales.

10. Pescados, otros animales marinos, sus productos y subproductos: Se incluyen harina de pescado, solubles de pescado, aceite de pescado y aceite de pescado refinado e hidrogenado.
11. Minerales: Se incluyen carbonato de calcio, carbonato de calcio y de magnesio, algas marinas calizas ("Maërl"), óxido de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato dicálcico, fosfato monocálcico, fosfato de roca desfluorado, harina de huesos desgelatinizados, fosfato monocálcico, fosfato cálcico-magnésico, fosfato monoamónico, cloruro de sodio, propionato de magnesio, fosfato de magnesio, fosfato de sodio, calcio y magnesio, fosfato monosódico y bicarbonato de sodio.
12. Varios: Se incluyen productos y subproductos de panadería o de fabricación de pastas alimenticias, productos y subproductos de confitería, productos y subproductos de pastelería y de heladería, ácidos grasos y sales de ácidos grasos.
13. Productos y subproductos de procesos de fermentación y sales de amonio: Se incluyen distintos productos de procesos de fermentación con diversas bacterias (*Methylococcus capsulatus*, etc.) así como las siguientes sales de amonio: lactato de amonio, acetato de amonio y sulfato de amonio.

Tal y como se puede apreciar, la composición de un pienso puede ser extraordinariamente amplia y variada, y la presencia de micotoxinas en los mismos, proceder de distintas fuentes. Sin embargo, se puede establecer que cereales (trigo, cebada, centeno), semillas, forrajes, y sus productos son las fuentes principales, al ser, en proporción de peso (entre 50 a 70%), los componentes principales de los mismos (Binder, 2007; Weidenborner, 2007). Esta diversidad, supone una dificultad añadida en cuanto al desarrollo de metodologías analíticas, debido a la posible presencia de distintos interferentes de muy distinta naturaleza.

## **6.2. Sector de la producción de piensos en España**

---

La producción de piensos en España durante el año 2015 según el informe SILUM (SILUM, 2015) fue de algo más de 31 millones de toneladas métricas (31330851 Tm), siendo aproximadamente el 96.7% del total del pienso fabricado, destinado a animales de abasto. Tal y como se puede apreciar en la Tabla 8, los piensos destinados al sector porcino, bovino y

avícola fueron los mayoritarios, representando aproximadamente el 87% de la producción total.

**Tabla 8.** Distribución de piensos por especies (Informe SILUM 2015)

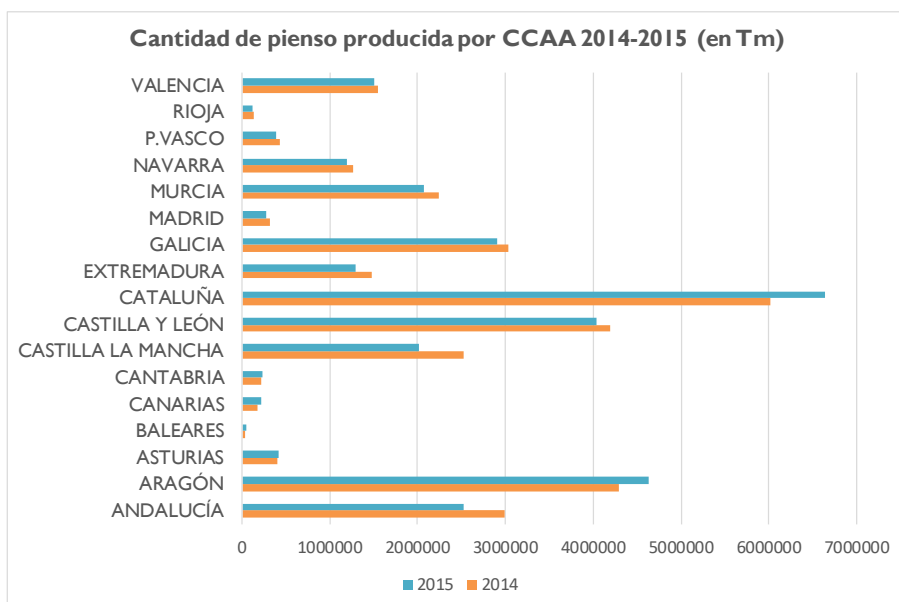
Especie	Tm pienso producido 2015	% de producción sobre el total
<b>Porcino</b>	14771963	47,1
<b>Bovino</b>	6869848	21,9
<b>Avicultura</b>	5728705	18,3
<b>Ovino/caprino</b>	1713962	5,5
<b>Animales de compañía</b>	954302	3
<b>Conejos</b>	502166	1,6
<b>Multiespecie</b>	408033	1,3
<b>Equino</b>	195341	0,6
<b>Peces</b>	132803	0,4
<b>Otras especies</b>	38667	0,1
<b>Animales de peletería</b>	15061	0,05
<b>TOTAL</b>	31330851	100

La distribución de piensos indicada en la Tabla 8 es similar a la de años anteriores, siendo la producción de piensos destinados a alimentación de porcino la mayoritaria, seguido de la de piensos para el sector bovino y para aves. Por tipo de pienso, aproximadamente el 73% del pienso producido corresponde a pienso completo, siendo el restante 23%, pienso complementario.

En cuanto a la producción de piensos por CCAA, Cataluña es la primera productora, con el 21,6% de la producción, seguida de Aragón (13,7%) y Castilla y León (13,4%).

En relación a la utilización de materias primas para la fabricación de piensos, en el año 2015 se utilizaron aproximadamente 32 millones de toneladas métricas (32441109 Tm), siendo los cereales y productos derivados el más numeroso (66,3%), seguido de oleaginosas y productos derivados (19,4%). La utilización de otros componentes de los piensos (leguminosas, tubérculos y raíces, semillas, forrajes, etc.), fue mucho más minoritaria.

Como se comentará tanto en la realización experimental como en la discusión de resultados de los objetivos cuarto y quinto de esta Tesis, la selección de muestras de piensos comerciales, sujeta a la disponibilidad existente, se realizó siguiendo la distribución de los tipos de piensos comentada en este apartado.



**Figura 19.** Evolución de cantidad de pienso producido durante 2014-2015 por CCAA (en toneladas métricas) Informe SILUM 2015

## 7. Sistema APPCC para la prevención y control de micotoxinas en piensos

El sistema análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC, “Hazard Analysis Critical Control Point”, HACCP), es un sistema de gestión preventivo, reconocido internacionalmente y ampliamente utilizado actualmente por los distintos operadores de la cadena alimentaria, como herramienta para la identificación, evaluación y control de los posibles peligros microbiológicos, químicos y físicos que puedan surgir en los procesos de producción de un producto alimenticio. Además de las empresas del sector alimentario, también está siendo implantado, de forma gradual, en otros sectores vinculados al mismo como el farmacéutico (aditivos, vitaminas, hormonas, etc.), el de envases y materiales en contacto con alimentos, etc.

La diferencia fundamental del sistema APPCC frente a sistemas de calidad tradicionales, basados en la inspección del producto final, radica en que el sistema APPCC se centra en los aspectos del producto que puedan afectar a la seguridad alimentaria, no a la calidad final del producto, e identifica los posibles peligros que puedan afectar al mismo durante todas las fases del



proceso productivo del mismo (“de la granja a la mesa”), y no al final del mismo.

El origen del sistema APPCC hay que situarlo en la década de los sesenta del siglo pasado, como un trabajo conjunto entre la Administración Nacional de la Aeronáutica y del Espacio de los Estados Unidos (NASA), los laboratorios del ejército de los Estados Unidos sitos en Natick (Massachussets), y la empresa alimentaria Pillsbury, para garantizar la seguridad de los primeros alimentos en los vuelos espaciales. El sistema de APPCC tuvo como base para su desarrollo inicial el sistema Análisis Modal de Fallos y Efectos (AMFE), desarrollado a finales de la década de los cincuenta para el estudio de fallos en los sistemas de armamento utilizados en el ejército de los Estados Unidos. Debido a su utilidad para controlar la inocuidad de los alimentos, se ha incorporado a la legislación de distintos países como requisito legal, como en Estados Unidos, a través del título 21 del CFR (Code of Federal Regulations) partes 120 y 123, y en Europa, a través del Reglamento (EC) N° 852/2004 (European Parliament, 2004a) en el caso de productos alimenticios, o el Reglamento (EC) N° 183/2005 (European Parliament, 2005) para los piensos. En el año 2003, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) publicó un manual de implantación práctica de sistemas APPCC para la prevención y control de las micotoxinas a modo orientativo para países e instituciones interesadas (FAO, 2003).

El sistema APPCC proporciona un enfoque estructurado y sistemático para controlar la inocuidad de los alimentos a través de la identificación, evaluación y control de los peligros alimentarios, y por tanto requiere de un buen conocimiento de las posibles relaciones causa efecto (FAO, 2003; Binder, 2007). Aunque tiene muchos elementos en común con los sistemas generales de gestión de la calidad, como los basados en la norma ISO 9000, su función no es substituirlos, sino complementarlos. Aunque no es imprescindible, sí que es recomendable que previamente a la implantación de un sistema APPCC en un determinado proceso productivo, se encuentren implantados programas de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH) ya que actúan como base sólida para un establecimiento posterior y satisfactorio del mismo (FAO, 2003).

En el caso del control de micotoxinas, la estrategia aplicada a través del sistema APPCC está enfocada en dos aspectos complementarios: La

prevención de la contaminación de alimentos o piensos por los hongos toxigénicos para evitar la posible producción de micotoxinas, y su destrucción o detoxificación en el caso de que ya existan en el producto (Binder, 2007; Kabak et al., 2006).

Para establecer, aplicar y mantener un plan de APPCC son necesarias siete actividades distintas, que en las Directrices del Codex (CAC, 1997) se denominan los “siete principios”, y que también están recogidos en el artículo 5 del Reglamento Nº 852/2004 y el artículo 6 del Reglamento Nº 183/2005. Estos siete principios, llevan asociados un total de 12 tareas que son:

**Principio 1:** Realizar un análisis de peligros. Se deben identificar los peligros que deban evitarse, eliminarse o reducirse a niveles aceptables. Las tareas necesarias asignadas para este primer principio serían:

1. Establecer un equipo de APPCC. Será el responsable del desarrollo e implantación del sistema APPCC, y debe ser interdisciplinar. Una primera tarea que deberá realizar es determinar el ámbito de aplicación del estudio, indicando si abarcará todo el proceso productivo o solamente determinados componentes.
2. Describir el producto. Para poder identificar correctamente los peligros “reales” debe elaborarse una descripción completa del producto, incluyendo todos los aspectos de composición, propiedades físicas y químicas de las materias primas y del producto final, con especial atención a la  $a_w$ , el pH, y la temperatura de almacenamiento. Además, se debe recopilar información relativa a la vida útil y de etiquetado del producto.
3. Identificar el uso al que ha de destinarse el producto. Se deberá determinar si el producto se consumirá directamente o se someterá a un proceso posterior (cocción, esterilización, etc.), así como al grupo de población al que va dirigido el mismo, especialmente si este es de riesgo (ancianos, embarazadas, diabéticos, etc.).
4. Elaborar el diagrama de flujo del producto (DFP) para el sistema del producto o para la parte de este que sea pertinente.
5. Confirmar el diagrama DFP elaborado *in situ*. Los miembros del equipo deberán realizar un “recorrido de la línea de proceso”, es decir, visitar el sistema del producto (por ejemplo, una explotación agrícola, un

almacén o una zona de fabricación) con el fin de contrastar la información recogida en el DFP con la situación real.

6. Identificar y analizar el peligro o peligros (físicos, químicos, microbiológicos) de manera satisfactoria. En el caso de las micotoxinas se centrará en los hongos (peligro biológico) y las micotoxinas (peligro químico).

Únicamente se trasladan a la tarea 7, correspondiente al principio 2, aquellos peligros que en opinión del equipo de APPCC presenten un riesgo inaceptable de que se produzcan.

**Principio 2** (tarea 7): Determinar los puntos críticos de control (PCC).

Un punto de control crítico (PCC) es una fase en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro para la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable. Para poder identificar los PCCs, el equipo auditor debe recorrer, para cada peligro identificado a partir del principio 1, todas las etapas del diagrama de flujo del producto (DFP), determinando si puede producirse el peligro en cada fase y, en caso afirmativo, si existen medidas de control. Si el peligro puede controlarse adecuadamente, es esencial para la inocuidad del alimento, y no es preferible realizar ese control en otra fase, entonces esta fase es un PCC para dicho peligro. Si se identifica una fase en la que existe un peligro para la inocuidad de los alimentos, pero no pueden establecerse medidas de control adecuadas, ya sea en esa fase o más adelante, se debe considerar que el producto no es apto para el consumo humano o animal, hasta que se dispongan de medidas de control. Habitualmente, en la toma de decisiones sobre PCCs, se utilizan árboles de decisiones como el indicado en la figura 20.

**Principio 3:** Establecer límites críticos para cada PCC

Los límites críticos para cada PCC deben especificarse, validarse e incluir sus correspondientes tolerancias admisibles. Habitualmente los criterios aplicados incluyen mediciones de temperatura, tiempo, pH,  $a_w$ , contenido en humedad, o parámetros sensoriales (color, etc.). En el caso de las micotoxinas, habitualmente se establecen límites críticos en relación a la temperatura y la  $a_w$ .

**Principio 4:** Establecer un procedimiento de vigilancia

Para confirmar el cumplimiento de los límites críticos establecidos en cada PCC, será necesario determinar un método de vigilancia sensible y con rápida respuesta, de manera que se puedan detectar desviaciones y aplicar medidas correctoras. Habitualmente se incluyen dentro del sistema de vigilancia mediciones de temperatura, contenido de humedad, pH y tiempo. Siempre que sea posible, se debe incluir un sistema de alerta cuando el valor del parámetro seleccionado se encuentre próximo a límite crítico establecido, así como incluir el estudio de tendencias.

**Principio 5** (tarea 10): Establecer medidas correctoras

Si a través de la vigilancia se determina un incumplimiento de los límites críticos, se deberán adoptar medidas correctoras inmediatamente. Su diseño, deberá basarse en la evaluación de peligros realizada, los posibles riesgos y la gravedad de los mismos y el destino final del producto, teniendo en cuenta siempre la situación más desfavorable. Las medidas correctoras deberán asegurar que, tras su aplicación, el PCC vuelve a estar dentro de los límites críticos establecidos y contemplar la posible eliminación de los productos afectados durante el periodo de incumplimiento.

**Principio 6** (tarea 11): Verificar el plan de APPCC

Una vez elaborado completamente el plan de APPCC, validado sus PCCs y establecidos los límites críticos y medidas correctoras, debe verificarse en su totalidad. Así mismo, una vez implantado, debe reevaluarse de forma periódica, para lo cual pueden utilizarse pruebas microbiológicas y/o químicas. Además, será necesario establecer un plan de auditorías internas del sistema APPCC para verificar su cumplimiento y mantenerlo actualizado.

En dicha verificación puede incluirse:

- Toma de muestras de producto, para su análisis mediante métodos de ensayo distintos a los incluidos dentro del sistema APPCC.
- Observaciones visuales de las operaciones realizadas en los PCCs y entrevistas con el personal encargado de su vigilancia.
- Auditorías externas independientes, entre la que pueden estar incluidas las realizadas habitualmente por los técnicos de las administraciones públicas responsables del control oficial de productos alimenticios, etc.

**Principio 7** (tarea 12): Mantener registros.

El mantenimiento de registros es una parte esencial del proceso de APPCC ya que permite demostrar documentalmente el cumplimiento de los procedimientos establecidos y límites críticos fijados, durante todo el proceso, asegurando la trazabilidad.

Puede utilizarse para identificar aspectos problemáticos o para detectar oportunidades de mejora del mismo. Entre los registros necesarios se encuentran:

- a. Los habituales vinculados a los sistemas BPF, BPA y BPH, como los relativos a:
  - Plan de control de la calidad del agua
  - Plan de limpieza y desinfección
  - Plan de control de plagas
  - Plan de gestión de residuos
  - Plan de aseguramiento de la trazabilidad
  - Plan de mantenimiento de instalaciones y equipos
  - Plan de control de materias primas y proveedores
  - Plan de formación de personal
  - Plan de mantenimiento de la cadena de frío
- b. Los relativos a la vigilancia de los PCC, desviaciones detectadas y medidas correctoras adoptadas.
- c. También deberán conservarse los documentos en los que conste el estudio del sistema APPCC original, y el estudio realizado para la identificación de peligros y la selección de límites críticos.

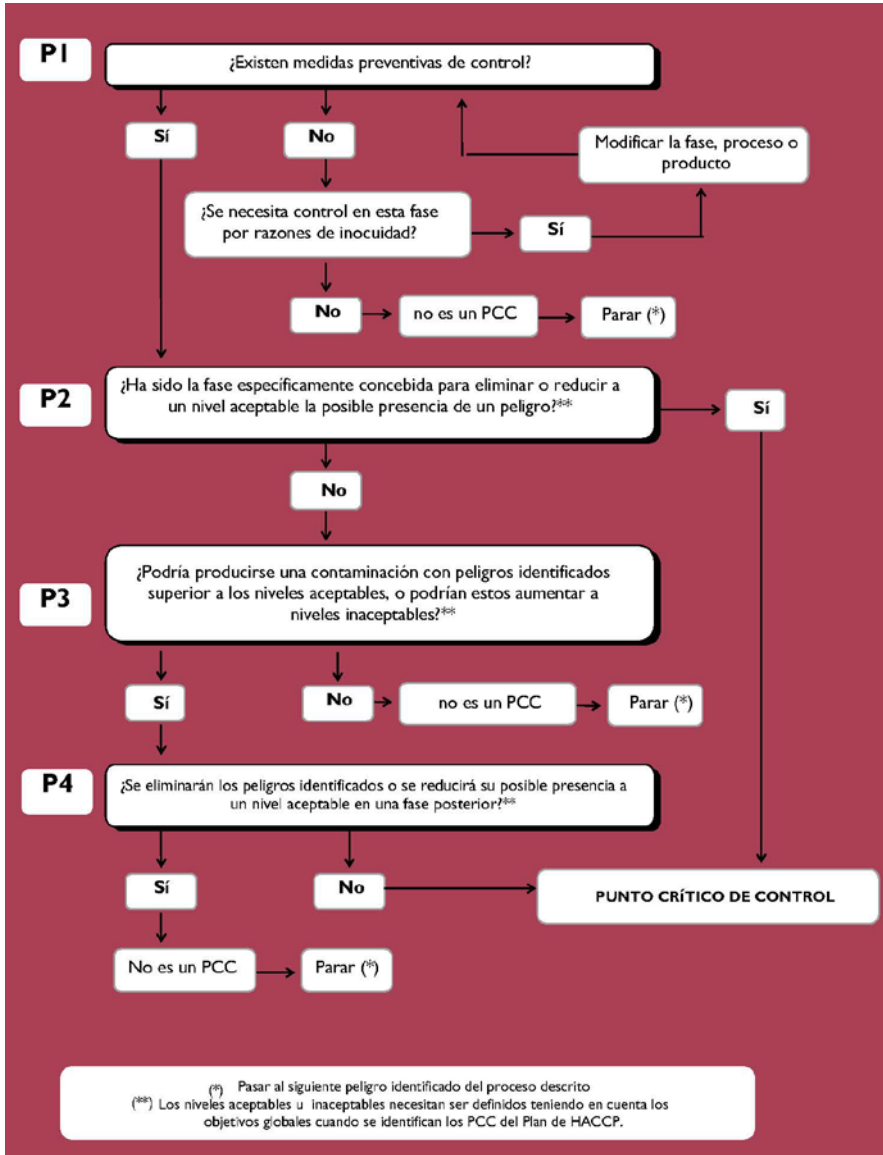
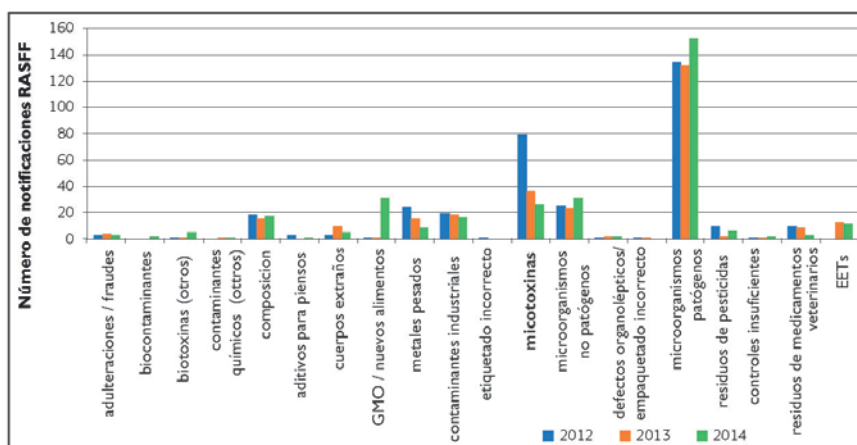


Figura 20. Árbol o secuencia de decisiones para identificar PCCs

## 7.1. Aplicación del sistema APPCC en la fabricación de piensos para ganadería

El informe publicado por la Comisión Europea en 2014, del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos, (RASFF, “Rapid Alert System for Food and Feed”) puso de manifiesto la importancia de los piensos en los controles realizados en la cadena alimentaria, ya que de 3097 notificaciones realizadas sobre piensos y alimentos, 309 (en torno al 10%) correspondieron a piensos, siendo la presencia de micotoxinas, en especial aflatoxinas, la segunda razón, tras la presencia de microorganismos patógenos (RASFF, 2014; van Egmond, 2004; van Egmond et al., 2007).



**Figura 21.** Numero de notificaciones realizadas al RASFF (European Union, 2014)

El Reglamento N° 183/2005 (European Parliament, 2005) estableció en su artículo 6, que todos los explotadores de empresas de piensos deben disponer de un sistema APPCC, excepto los que exclusivamente realicen operaciones de:

- Transporte, almacenamiento y manipulación de productos primarios en el lugar de producción
- Operaciones de transporte para entregar los productos primarios del lugar de producción a un establecimiento

- Mezcla de piensos exclusivamente para las necesidades de su explotación sin utilizar aditivos ni premezclas de aditivos con excepción de los aditivos de ensilado.

Por ello, la Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para Animales (CESFAC), elaboró en el año 2005 la guía práctica para desarrollar e implementar un sistema APPCC para los fabricantes de piensos, semejante a otras guías publicadas en España en otros sectores alimentarios (CESFAC, 2005), y que actúa como referente en la elaboración de sistemas de APPCC en el sector de la fabricación de piensos.

El sistema de APPCC desarrollado establece los siguientes requisitos a tener en cuenta en su elaboración:

- Control de agentes contaminantes como micotoxinas, metales pesados y material radiactivo.
- Utilización de agua, residuos orgánicos y fertilizantes.
- Uso correcto y apropiado de productos fitosanitarios y biocidas y su trazabilidad.
- Uso correcto y apropiado de medicamentos veterinarios y aditivos para piensos y su trazabilidad.
- Preparación, almacenamiento y trazabilidad de materias primas para piensos.
- Eliminación adecuada de los animales muertos, los residuos y las yacijas.
- Medidas de protección para evitar la introducción de enfermedades contagiosas transmisibles a los animales a través de los piensos, y cualquier obligación de notificación al respecto a la autoridad competente.
- Los procedimientos, las prácticas y los métodos que garanticen que los piensos se producen, preparan, embalan, almacenan y transportan en condiciones higiénicas adecuadas, incluidas medidas eficaces de limpieza y de control de plagas.
- Detalles relativos al modo de llevar los registros.



Además de todo lo comentado, incluye los planes de apoyo que forman parte de BPA, BPF y BPH, y que son:

- Plan de formación continua del personal
- Plan de limpieza de los equipos e higienización de las instalaciones y dispositivos
- Plan de control de plagas: desinfección, desratización y desinsectación
- Plan de control de proveedores
- Plan de mantenimiento de equipos e instalaciones
- Plan de identificación y eliminación de residuos
- Plan de control del agua de abastecimiento
- Sistema de trazabilidad

El diagrama de flujo (DFP) correspondiente a las fases de procesos de producción de piensos se indica en la Figura 22.

De la aplicación de los principios del APPCC, se puede establecer que el PCC para control de micotoxinas estaría en las siguientes fases del proceso de fabricación de piensos:

#### 1. Recepción de materias primas

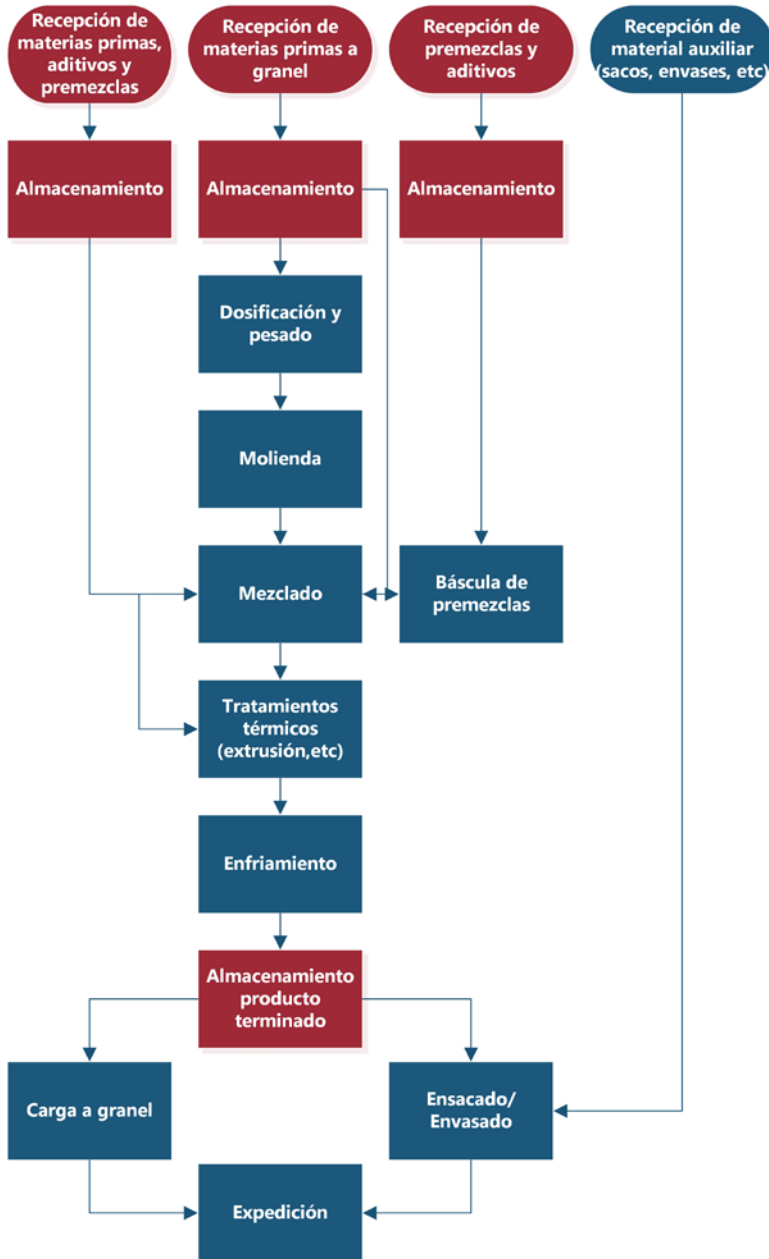
La fuente fundamental de la existencia de micotoxinas en piensos es su presencia en sus materias primas, especialmente los cereales (Binder, 2007; Magan y Olsen, 2004). Por ello, el límite crítico establecido en esta fase de la producción será la ausencia de las principales micotoxinas contempladas en la legislación (aflatoxinas, OTA, fumonisinas, ZEA, DON y toxinas T-2 y HT-2). La vigilancia a ese límite crítico puede establecerse mediante el control eficaz de proveedores (homologación), solicitando certificados de análisis de micotoxinas donde se corrobore su ausencia, así como mediante la toma de muestras de forma periódica y aleatoria en las materias primas y su remisión a un laboratorio independiente para su análisis. La medida correctora en caso de incumplimiento del límite crítico es el rechazo completo del lote de materia prima implicada.

#### 2. Almacenamiento de producto terminado

La posible presencia de micotoxinas durante el almacenamiento es debida al crecimiento fúngico en determinadas partes del producto en una zona de almacenamiento, y la posterior producción de estas. Al igual que en el caso anterior, el límite crítico establecido en esta fase de la producción será la ausencia de las principales micotoxinas contempladas en la legislación. La vigilancia a ese límite crítico puede establecerse mediante:

- Control sobre el cumplimiento del plan de limpieza de equipos e higienización de las instalaciones y dispositivos utilizados durante el almacenamiento.
- Control sobre la distribución y almacenamiento del producto, asegurando una correcta rotación de las partidas almacenadas, aplicando el criterio FIFO (“first in, first out”, que significa que, para distintos lotes del mismo tipo de producto, el primer lote que entra en la instalación de almacenamiento debe ser el primero que debe salir de la misma).
- Control sobre el cumplimiento del plan de mantenimiento de equipos.
- Toma de muestras periódicas, de carácter muestral y de forma aleatoria sobre los lotes de producto almacenado y su remisión a un laboratorio independiente para su análisis.

La medida correctora en caso de incumplimiento del límite crítico sería el rechazo completo de la partida de materia prima almacenada implicada (Binder, 2007; Magan, 2006; Magan y Olsen, 2004; Sanchis y Magan, 2004).



**Figura 22.** Diagrama de flujo (DFP) de los procesos en la fabricación de piensos. Los PCCs detectados están marcados en rojo. (CESFAC, 2005)

---

## 7.2. Aplicación del sistema APPCC en el cultivo y cosecha de cereales

---

A nivel mundial, se estima que un 20-25% de la producción mundial de cereales está contaminada por micotoxinas (FAO, 2004), especialmente en tricotecenos A y B, OTA, aflatoxinas y fumonisinas (Anklam et al., 2002; Binder et al., 2007). Los cereales, principalmente maíz, trigo y cebada, constituyen el principal componente de los piensos, suponiendo aproximadamente entre un 50 y un 70% del peso final del producto, y, por tanto, la principal fuente de micotoxinas en los piensos (Binder et al., 2007).

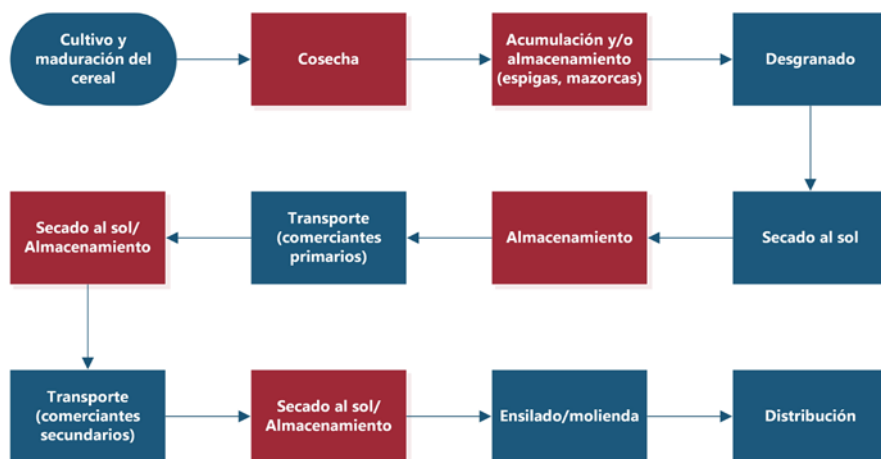
La aplicación de la sistemática APCC en todo el proceso de producción de cereales, desde su siembra y crecimiento hasta su cosecha y tratamientos posteriores puede ser muy complejo, debido a las variables que pueden influir tanto el crecimiento de los hongos productores (principalmente *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp.), como en la producción de micotoxinas (Magan y Olsen, 2004).

La implantación del sistema APPCC requerirá, como ocurre en su aplicación en otros productos alimenticios, de una previa implantación de las recomendaciones, procedimientos y planes incluidos dentro de las buenas prácticas agrícolas (BPA), las buenas prácticas de fabricación (BPF), y las buenas prácticas de higiene (BPH). Además, y a nivel de la contaminación fúngica de cereales, es interesante que, en la elaboración del sistema APPCC, se tengan en cuenta las indicaciones recogidas en el código de buenas prácticas para la prevención y reducción de micotoxinas en cereales que publicó la FAO en 2003 (CAC, 2003).

Aunque el proceso de producción de cada cereal tiene características específicas, el diagrama de flujo de proceso (DFP) general que describiría el proceso productivo del mismo sería el indicado en Figura 23.

Durante el crecimiento del cultivo y la cosecha de un cereal, tanto la contaminación fúngica como la posible producción posterior de micotoxinas, vienen marcadas principalmente por dos factores; el contenido en humedad existente y la posible presencia de daños producidos por insectos, roedores o aves. En las etapas previas, englobadas dentro la etapa de precosecha del cereal, será necesario la aplicación de las recomendaciones e indicaciones

incluidas dentro de las BPA, como, por ejemplo, la lucha contra insectos y roedores, etc.



**Figura 23.** Diagrama de flujo de proceso (DFP) general de cultivo de cereales (FAO, 2003). Los PCCs detectados están marcados en rojo.

Al realizar el análisis de los PCC, se puede determinar que el primero de ellos correspondería a la fase de cosecha del cereal. El límite crítico para ese PCC vendría determinado por el control del contenido en humedad, que puede establecerse en un valor  $\leq 22\%$  (FAO, 2003; Codex, 2003), utilizando el secado al sol en el campo, que habitualmente se realiza tras la misma, como medida correctora a tomar en caso de incumplimiento. En estas condiciones la micobiota con mayor necesidad de presencia de agua, como es la micotoxigénica, será reemplazada por otra con mayor carácter xerófilo. Para controlar el límite crítico establecido, además de la inspección visual para detectar la posible presencia en el producto de signos de enmohecimiento, en el sistema de vigilancia se pueden incluir también muestreos sistemáticos, representativos y aleatorios para verificar dicho contenido mediante su análisis en laboratorio.

La segunda de las causas que originan el PCC es la presencia de insectos, roedores y aves que provoquen daños físicos en el cereal. Dado que su detección puede ser difícil, se puede establecer como límite crítico la ausencia de daños físicos en el grano por presencia de insectos, roedores y aves, por lo que, en caso de detectarse en más de un porcentaje de la partida, 5-10% (FAO, 2003), se deberá proceder a su rechazo. La vigilancia del límite crítico establecido a incluir en el plan de vigilancia será la inspección visual

del estado del producto por parte del agricultor antes y durante la cosecha, para lo cual deberá estar capacitado para detectar los signos de su presencia.

El segundo de los PCC correspondería a la fase de almacenamiento de producto, la cual se produce varias veces, tanto en la cosecha como en los procesos postcosecha. Al igual que en el caso anterior, el contenido en humedad y los posibles daños provocados por presencia de insectos y roedores, serían las dos principales causas del crecimiento fúngico y la posible contaminación del producto por micotoxinas. Además de una correcta aplicación de las indicaciones incluidas en las buenas prácticas de almacenamiento (BPAL), se puede establecer, en relación con el contenido en humedad, un límite crítico  $\leq 16\%$  (FAO, 2003; Codex, 2003) especialmente si el producto va a ser almacenado durante mucho tiempo (1-6 meses). Entre las medidas correctoras que pueden incluirse estaría la utilización de equipos de control de humedad en las instalaciones de almacenamiento, y cuya supervisión y registros deberán ser incluidos dentro del plan de vigilancia. Respecto a los posibles daños causados por insectos y roedores, además de las recomendaciones relativas a la lucha contra insectos incluidas en las BPA, se puede establecer el mismo límite crítico indicado en el apartado referido a la fase de cosecha (Binder, 2007; Magan, 2006; Magan y Olsen, 2004; Magan y Aldred, 2007).

## **8. Modelos de predicción de crecimiento fúngico y producción de micotoxinas en alimentos y piensos**

---

Como ya se ha comentado en esta introducción, el crecimiento fúngico de las especies productoras de micotoxinas, así como su producción depende de un conjunto de factores (temperatura,  $a_w$ , etc.), que los hacen susceptibles de ser incluidos en el diseño de modelos matemáticos que puedan permitir, para un determinado alimento o pienso, la predicción en su crecimiento fúngico o la posterior producción de micotoxinas.

En cuanto al nivel de crecimiento y comportamiento microbiano, durante las últimas décadas se han ido desarrollando diversos modelos matemáticos que predicen la posible presencia de microorganismos patógenos en alimentos (Dantigny et al., 2005; Lahlali et al., 2006).

En los últimos años ha surgido el interés en la aplicación de estos modelos matemáticos al crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas, basado en el hecho de que, aunque no hay relación directa unívoca entre el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas, sí que la hay, en el hecho de que si no hay crecimiento del mismo en alimentos o piensos, no puede haber una posterior producción de las mismas (García et al., 2009; Parra y Magan, 2004).

Esto puede ser debido a las diferencias sustanciales que existen entre el crecimiento bacteriano y el fúngico. El crecimiento bacteriano a grandes rasgos es más simple porque se trata de organismos unicelulares, cuya división se produce por fisión, y cuyo crecimiento es homogéneo tanto en medios líquidos como en la superficie de medios sólidos, proporcionando curvas de crecimiento poblacional fáciles de obtener (Dantigny et al., 2005). En las etapas iniciales del crecimiento bacteriano, las unidades formadoras de colonia (UFC) pueden ser determinadas mediante recuento, pudiéndose expresarse dicho crecimiento en UFC/mL o UFC/g, dependiendo de la matriz.

En cambio, los hongos son organismos pluricelulares y durante su crecimiento, las hifas del micelio se ramifican en todo el medio de crecimiento, no solamente en la superficie, dificultando su posible cuantificación mediante el recuento de UFCs, por lo que dicha metodología solamente se puede aplicar al recuento de esporas (Vindeløv y Arneborg, 2002). No obstante, se han descrito otras vías para la determinación del crecimiento fúngico como son la medida de la extensión radial de la hifa, o la medida del diámetro de las colonias, siendo este último el método más común y simple de determinación del mismo (Gibson y Hocking, 1997).

Los modelos predictivos de crecimiento bacteriano, aplicables también a crecimiento fúngico, pueden clasificarse en tres tipos (García et al., 2009; Whiting, 1995): primarios, secundarios y terciarios.

En los modelos primarios se describe el crecimiento poblacional de microorganismos en función del tiempo, en condiciones ambientales específicas. Pueden ser clasificados en modelos primarios de germinación de esporas, de crecimiento y de inactivación (Soboleva et al., 2000).

En relación con los modelos primarios de germinación, existen dos modelos teóricos que describen la cinética en la germinación de esporas frente al tiempo: el modelo de Gompertz y el modelo logístico. Aunque ambos modelos son similares en relación a los resultados globales (Dantigny et al.,

2007), el modelo Gompertz tiene una mejor precisión en la fase lag (fase de latencia de las esporas), mientras que el modelo logístico la tiene en el tiempo de germinación.

Los modelos primarios de crecimiento describen la fase de crecimiento fúngico que tiene lugar cuando, una vez producida la germinación, se produce la formación de colonias macroscópicas y elongación de las hifas. En la cuantificación de dicho crecimiento, el método más usado es la medida del diámetro de colonia, aunque también son utilizados el número de UFC/g para sustratos líquidos y la cuantificación de ergosterol (Marín et al., 2008). Se considera de forma general que el crecimiento de los hongos, en sustratos sólidos y en condiciones óptimas, es lineal una vez finalizada la fase lag y hasta alcanzar la fase estacionaria. A nivel matemático, los modelos primarios de crecimiento más utilizados son el modelo de Baranyi y Roberts (Baranyi y Roberts, 1994), la ecuación modificada de Gompertz (Zwietering et al., 1996, 1991) y el modelo lineal.

El modelo de Baranyi y Roberts, muy utilizado para describir el crecimiento bacteriano, se caracteriza por ser un modelo trifásico, en el cual, tras un periodo de ajuste, se produce un crecimiento lineal que termina en una fase asintótica final. Es descrito a través de algoritmos de regresión no lineal. El modelo lineal es muy utilizado para describir el crecimiento de micelios en placas de Petri, y permite estimar el crecimiento en la fase lag a través del cálculo de la intersección de la línea de regresión lineal con el eje de abscisas (tiempo). El modelo de la ecuación modificada de Gompertz describe el crecimiento a través de una curva sigmoideal asimétrica. Varios autores (López et al., 2004; Marín et al., 2008) han comparado los resultados obtenidos a través de los tres modelos, indicando que, en términos generales, el modelo de Baranyi y Roberts es el que más se ajusta a la mayoría de las posibles situaciones en el crecimiento fúngico.

Existen pocos modelos matemáticos que describan la inactivación de esporas fúngicas, siendo el modelo lineal el más utilizado (Baggerman y Samson, 1988).

Los modelos secundarios describen la influencia, en los modelos primarios de crecimiento fúngico, de variables ambientales como la temperatura, el pH, la  $a_w$ , concentración de solutos, etc. De estos factores, la  $a_w$  y la temperatura son los parámetros ambientales que más influyen en el mismo, y siendo el primero el de más importancia en crecimiento fúngico, a



diferencia de las bacterias, en el que es la temperatura (Holmquist et al., 1983).

Los modelos secundarios más utilizados son el modelo lineal de Arrhenius-Davey (Davey, 1989), y el de la raíz cuadrada de Ratkowsky (Ratkowsky et al., 1983), aplicables en un principio a la temperatura, pero que también se ha extendido su cálculo para el pH o la  $a_w$ , el modelo cardinal de Rosso (Rosso et al., 1993), que utiliza valores experimentales obtenidos de temperaturas y  $a_w$  (valores cardinales) y el modelo de Gibson (Gibson et al., 1994), que fue el primero especialmente desarrollado para el crecimiento fúngico y no una adaptación de modelos preexistentes para crecimiento bacteriano. Otros modelos secundarios utilizados son los modelos polinómicos desarrollados específicamente para determinar el crecimiento fúngico de forma cuantitativa y que son construidos, a partir de regresiones lineales múltiples, teniendo en cuenta la temperatura, el pH y la  $a_w$ , y los modelos basados en el concepto Gamma, propuesto por Zwietering (Zwietering et al., 1996), que permiten evaluar la contribución de cada una de las variables que puedan afectar al crecimiento fúngico (temperatura, agua y pH) por separado.

Una característica importante para cualquiera de los modelos descritos anteriormente es que, al utilizar datos experimentales, es necesario realizar su validación experimental antes de su aplicación, ya que, de no ser así, puede dar lugar a la obtención de datos no aplicables posteriormente.

Los modelos terciarios predictivos de crecimiento surgen por la necesidad de integrar y tratar mediante software, la base de datos obtenida y construida con los datos experimentales obtenidos en la validación y aplicación de los modelos primarios y secundarios. Ejemplos de modelos terciarios son los obtenidos para microorganismos patógenos, como el programa PMP v.7.0 (USDA, 2003) o Combbase ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)).

En relación al crecimiento y la producción de micotoxinas, actualmente hay pocos modelos que permitan predecir ambos debido a que la relación entre crecimiento fúngico y producción de micotoxinas, para una determinada cepa productora y en determinadas condiciones ambientales es, de momento, poco conocida (García et al., 2009).

Por una parte, esto es debido a que la presencia de crecimiento fúngico de especies productoras de micotoxinas no implica necesariamente la producción de las mismas y, además, los efectos de los factores que influyen

en su crecimiento fúngico no tienen que ser necesariamente iguales en la producción de micotoxinas. Por otra parte, también es debido a que la no presencia de los hongos productores de micotoxinas en una determinada fase de la cadena alimentaria, no implica necesariamente la ausencia de micotoxinas en la misma. Por ello, y a nivel de seguridad alimentaria, una de las líneas actuales de trabajo está encaminada a la prevención de crecimiento fúngico en todas las fases de la cadena, para evitar la posible producción posterior de micotoxinas (Marín et al., 2008, 2006). Dentro de esa línea de trabajo se encuentra la posible aplicación de modelos cinéticos específicos de crecimiento fúngico y, además, la aplicación de modelos probabilísticos aplicados tanto al crecimiento fúngico como a la producción micotoxigénica. La principal utilidad de los modelos cinéticos de crecimiento fúngico, es que permiten predecir cómo será este en determinadas condiciones, aunque no si este se producirá o no, que es la información más importante que proporcionan los modelos probabilísticos (García et al., 2009).

En el diseño de modelos cinéticos de crecimiento fúngico es necesario, además de la aplicación de modelos matemáticos, la realización de análisis cuantitativos de concentraciones de micotoxinas en la matriz a estudio, para lo cual surge la necesidad de disponer de métodos de ensayo apropiados, siendo este uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral. Entre los modelos cinéticos de predicción de producción de micotoxinas que han surgido en los últimos años, se puede destacar el propuesto por Molina y Giannuzzi (Molina y Giannuzzi, 2002), que establecieron, a través de un modelo primario, la posible relación entre crecimiento fúngico de *A. parasiticus* y la concentración de aflatoxinas. Ejemplos de modelos secundarios de producción de micotoxinas son el tipo Arrhenius-Davey establecido por Pitt (Pitt, 1993), en la que relacionó, en función de las condiciones ambientales, la producción de aflatoxinas y el crecimiento fúngico de *A. flavus* y *A. parasiticus* y más recientemente, el de Bellí et al. (2004), que determinaron un modelo de la producción de OTA por el agregado *A. niger* en uva y en función de la  $a_w$ , y el presentado por Marín et al. (2006), describiendo la cinética en la producción de OTA y la acumulación de *A. carbonarius* en uva en función de la temperatura.

La clave en el diseño de modelos probabilísticos, es establecer experimentalmente el punto temporal en el que existe o no crecimiento fúngico. Para ello, se utiliza como herramienta, la regresión logística, que determina la probabilidad de que un determinado escenario se produzca o no en función de distintas variables (Bott, 2014; Brul y Klis, 1999; Gortmaker

et al., 1994). Aunque existen aún pocos estudios sobre modelos probabilísticos, se pueden indicar como ejemplos, el realizado por Battey (Battey et al., 2001), de predicción de la probabilidad de crecimiento de *A. niger* y *P. spinulosum* en bebidas, en función de la presencia de determinados conservantes, el pH, contenido en azúcar y acidez, o el realizado por Char relativo a la probabilidad de crecimiento de *Eurotium chevalieri* en dulce de leche en función de la  $a_w$ , sorbato potásico, pH, y tiempo de almacenamiento (Char et al., 2005).

Actualmente, aún no han surgido modelos cinéticos o probabilísticos de predicción del crecimiento fúngico micotoxigénico o de producción de micotoxinas en piensos, siendo esta una de las posibles futuras líneas de investigación en este campo.

---

## 9. Determinación de micotoxinas

---

### 9.1. Muestreo

---

Un aspecto clave en los métodos analíticos de micotoxinas es el muestreo previo de las muestras a analizar. Debido a la gran heterogeneidad en la distribución de la contaminación por micotoxinas en un mismo lote o partida, ha sido necesario establecer legalmente criterios que garanticen la representatividad del lote en las tomas de muestras que se realizan para su control (Whitaker, 2006). Así, tanto la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, "Food and Drug Administration") de Estados Unidos, como la Unión Europea, han incluido estos criterios en su legislación (Spanjer, 2006).

En la Unión Europea, los criterios de muestreo de micotoxinas en alimentos están recogidos en el Reglamento N° 401/2006 (European Commission, 2006b). El Reglamento N° 401/2006 establece distintos planes de muestreo en función del producto alimenticio. Para cada uno de ellos, en función del tamaño del lote, se establecen el número de muestras (muestras elementales) del mismo que han de tomarse. Cada una de estas muestras elementales debe tener un peso mínimo de 100 g, mientras que el peso de la muestra global del lote, una vez agrupadas todas las muestras elementales tomadas, debe tener un peso mínimo de 1 kg pudiendo llegar a tener un máximo de 30 kg, en función del tamaño del lote y del producto alimenticio,

como es el caso del muestreo de aflatoxinas en higos secos. También establece que, durante la realización de la toma de muestra de las fracciones (muestras elementales), estas deben ser tomadas en distintos puntos del lote, para que la toma de muestras sea representativa y que, en el caso de muestras globales cuyo peso sea superior a 10 kg, antes de su envío al laboratorio, deben ser divididas en partes iguales o inferiores a 10 kg (European Commission, 2006b; SANCO 2010, 2014).

En Estados Unidos la FDA también estableció los criterios de muestreo de micotoxinas a aplicar, en función del tipo de producto alimenticio, mediante el documento "Investigative Operation Manual" (FDA 2016), que constantemente actualiza. En líneas generales, sigue el planteamiento establecido por el Reglamento N° 401/2006, determinando, en función del tipo de producto alimenticio, el número de muestras elementales a seleccionar, variando el peso de la muestra global entre los 4,5 y los 34 kg.

## **9.2. Preparación de la muestra: extracción y purificación**

---

Prácticamente todas las técnicas analíticas de rutina utilizadas habitualmente en la determinación de micotoxinas requieren procesos de extracción y purificación previos al análisis. En la fase de extracción, se utilizan diversas técnicas extractivas, entre las que destacan las extracciones líquido-líquido por ser las más habituales. En ellas, se utilizan combinaciones de diferentes disolventes en función de la solubilidad de las micotoxinas objeto de análisis, y del tipo de proceso de purificación que se realizará posteriormente. Entre los disolventes más utilizados, se encuentran metanol, agua, acetonitrilo, acetato de etilo, cloroformo y acetona. Estas mezclas de disolventes suelen estar acompañadas con la adición, en pequeñas cantidades, de modificadores (ácidos débiles, sales, etc.) para aumentar el rendimiento extractivo, y también suele ser habitual la inclusión en la composición de las mezclas extractivas, de una fracción de disolventes no polares (hexano, etc.), con el objeto de eliminar lípidos presentes en matrices grasas como, por ejemplo, pistachos. (Rahmani et al., 2009).

Otras técnicas extractivas más recientes y utilizadas en métodos de determinación de micotoxinas son la extracción acelerada de disolventes (ASE), la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción con fluidos supercríticos (SFE).

Las técnicas ASE (Royer et al., 2004; Sheibani y Ghaziaskar, 2009; Urraca et al., 2005, 2004) y MAE (Krska et al., 2008a; Pallaroni et al., 2002), tienen, entre sus ventajas, el ser técnicas que permiten la automatización del proceso extractivo de forma reproducible, y permiten un ahorro importante tanto en el tiempo de trabajo necesario para su realización como en el volumen global de disolventes utilizados. Sin embargo, su uso no se ha generalizado debido principalmente al coste de adquisición y mantenimiento de los equipos y también a problemas derivados de la selectividad de micotoxinas en matrices complejas (Cigić y Prosen, 2009). En iguales circunstancias se encuentra la técnica de extracción con fluidos supercríticos (Zougagh y Ríos, 2008) que, a pesar de su gran capacidad selectiva de compuestos no polares, especialmente con el uso de CO<sub>2</sub> supercrítico, el coste de adquisición y mantenimiento de equipos ha impedido la generalización de su uso.

Posteriormente a la fase extractiva, habitualmente se realiza una fase de purificación del extracto obtenido con el objetivo de concentrar los analitos y para eliminar posibles interferencias. Entre los sistemas de purificación utilizados en determinaciones de micotoxinas se encuentran los cartuchos convencionales de extracción en fase sólida (SPE), los cartuchos Mycosep®, las columnas de inmunoafinidad (IAC), y los cartuchos de polímeros de impronta molecular (MISPE) (Cigić y Prosen, 2009; Krska, 1998; Krska et al., 2007; Rodríguez-Mozaz et al., 2007; Valle-Algarra et al., 2005; Zöllner y Mayer-Helm, 2006).

Los cartuchos convencionales SPE se caracterizan porque en su relleno se utilizan distintos sorbentes en función de su finalidad, como, por ejemplo, materiales poliméricos de propiedades químicas variables (hidrofóbicos, etc.), de fase inversa, o conteniendo intercambiadores de iones aniónicos y catiónicos. Aunque han sido desplazados en su uso en los métodos de determinación de rutina de micotoxinas por las columnas IAC, son utilizados en algunos métodos debido a su menor especificidad.

Entre las técnicas especialmente diseñadas para la purificación de extractos con micotoxinas y su preconcentración antes del análisis se encuentran los cartuchos Mycosep® (Romer Labs), las columnas IAC y los cartuchos MISPE (Núñez et al., 2012; Pereira et al., 2014).

Los cartuchos Mycosep (Weingaertner et al., 1997) contienen una mezcla de resinas de intercambio iónico y otros materiales en su relleno y son utilizados en la purificación de extractos de aflatoxinas, ZEA y derivados,

ocratoxinas, tricotecenos tipo A y B, y fumonisinas (Krska, 1998; Valle-Algarra et al., 2005).

Las columnas IAC contienen, inmovilizados en la fase estacionaria o relleno, anticuerpos específicos para retener determinadas micotoxinas o grupo de micotoxinas de similar naturaleza química. Debido a su alta especificidad, los extractos obtenidos tras su utilización tienen niveles de posibles interferentes cromatográficos mucho más bajos en comparación con otros métodos de purificación, mejorando la sensibilidad y la relación señal/respuesta. Son por ello, la técnica de purificación más extendida en métodos de determinación de micotoxinas. El principal problema que plantea su uso es la posible desnaturalización de los anticuerpos en presencia de disolventes orgánicos, y su coste de adquisición (Scott y Trucksess, 1997; Senyuva y Gilbert, 2010; Joerg Stroka et al., 2000).

Los cartuchos MISPE son cartuchos de extracción en fase sólida que contienen polímeros de impronta molecular (MIPs). Los MIPs son materiales sintéticos que actúan como receptores biomiméticos artificiales, capaces de reconocer selectivamente un determinado analito al disponer de lugares de unión específicos para este. Los MIPs se diseñan a medida, a través de la polimerización de monómeros funcionales utilizando una molécula “plantilla”, y dan lugar a un complejo macromolecular. Como molécula plantilla se utiliza la molécula diana (micotoxina diana), o un análogo estructural del analito (Baggiani et al., 2008, 2007; Cigić y Prosen, 2009; Núñez et al., 2012). Los MIPs muestran menor afinidad y selectividad que los anticuerpos de las columnas IAC, pero en cambio, presentan la ventaja de ser muy estables químicamente, lo que permite un rango de condiciones de trabajo (temperatura, pH, disolventes orgánicos utilizados, etc.), mucho más amplio que el utilizado para las columnas IAC, sin perder la afinidad por el analito. Otra ventaja importante es su coste económico, ya que pueden ser producidos a gran escala y en más formatos (membranas, bloques, etc.) que los habituales como cartuchos o columnas (Baggiani et al., 2007; Maier et al., 2004; Urraca et al., 2008). Actualmente, una de las líneas de investigación en sistemas de purificación para micotoxinas es el desarrollo de MIPs específicos para las principales micotoxinas: ZEA (Navarro-Villoslada et al., 2007; Urraca et al., 2006), OTA (Maier et al., 2004) o DON (Pascale et al., 2008).

---

### 9.3. Determinación convencional de micotoxinas

---

En cuanto a las metodologías analíticas actuales utilizadas en determinación de micotoxinas, esta se puede diferenciar entre unas que se pueden denominar convencionales y habituales en el control rutinario de micotoxinas o para confirmar nuevas técnicas de cuantificación desarrolladas, y otras más recientes y desarrolladas durante los últimos años, donde estarían incluidos los nuevos métodos multimicotoxinas basados en espectrometría de masas o las nuevas técnicas inmunológicas rápidas de cribado (o “screening”).

La gran mayoría de los métodos analíticos convencionales para la determinación de micotoxinas se basan en el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, “high-performance liquid chromatography”) utilizando varios tipos de sistemas de detección, siendo la detección por fluorescencia (FLD) y por ultravioleta (UVD, DAD “diode array detector” o PDA “photodiode array detector”) las más habituales. Para algunas micotoxinas volátiles y termoestables, como los tricotecenos, la cromatografía de gases (CG), combinada con detección por ionización de llama (“Flame ionization detector”, FID) o por captura de electrones (“Electron capture detector”, ECD) también es muy utilizada (Kos et al., 2002; Kotal et al., 1999; Valle-Algarra et al., 2011, 2005). Ambas técnicas (HPLC y CG) son usadas por su buena sensibilidad y selectividad, y tienen en común que, para obtener unos resultados precisos, se requiere de una buena separación cromatográfica, razón por la cual las muestras inyectadas deben tener un bajo nivel de posibles interferentes. Por ello, y como se ha comentado anteriormente, se requiere de la utilización durante la fase de preparación de la muestra, de técnicas selectivas de purificación, siendo la más habitual el uso de columnas de inmutofinidad (Cigić y Prosen, 2009; Krska et al., 2005; Scott y Trucksess, 1997; Jörg Stroka et al., 2000; Zhou et al., 2002).

Los métodos HPLC-FLD se utilizan de forma extensa para la determinación de muchas micotoxinas, especialmente de aquellas fluorescentes, como aflatoxinas y OTA, pero también para otras que no lo son, para lo cual es necesario el uso de agentes derivatizantes antes de su separación cromatográfica (precolumna) o posteriormente (post-columna) (Kok, 1994). Debido a que su sensibilidad puede ser equiparable a la proporcionada por la espectrometría de masas (Rahmani et al., 2009), es la metodología más habitual en el control rutinario de micotoxinas, siendo

necesaria la eliminación de posibles interferentes cromatográficos en la fase de extracción y purificación, mediante columnas IAC o cartuchos SPE.

La bibliografía relativa a métodos HPLC-FLD en micotoxinas es muy amplia. A modo de ejemplo, y para cada micotoxina o grupo de micotoxinas, se puede indicar la siguiente:

- OTA (Blesa et al., 2004; Jornet et al., 2000; Medina et al., 2005, 2006; Sáez et al., 2004; Sibanda et al., 2002; Visconti et al., 1999).
- Aflatoxinas (Akiyama et al., 2001; Blesa et al., 2003; Calleri et al., 2007; Chan et al., 2004; Manetta et al., 2005; Quinto et al., 2009).
- Micotoxinas de *Fusarium* (Berthiller et al., 2007; Dall'Asta et al., 2004; Duncan et al., 1998; Jiménez et al., 2000; Krska et al., 2007; Langseth y Rundberget, 1998; Lino et al., 2006; Mateo et al., 2001, 2002a, 2002b; Shephard, 1998; Silva et al., 2009; Stroka et al., 2002; Wilkes y Sutherland, 1998).
- ZEA (Krska et al., 2007; Mateo et al., 2002a; Visconti y Pascale, 1998).

Debido a que la mayoría de las micotoxinas más importantes no tienen capacidad de absorción en la región del ultravioleta (por ej. fumonisinas) o solamente en la zona de longitudes de onda no específicas (200-225 nm), como las ocratoxinas o el DON (Nielsen y Smedsgaard, 2003), el desarrollo de la metodología analítica basada en HPLC-DAD ha sido menor en comparación con la desarrollada para HPLC-FLD. A modo de ejemplo, en la literatura podemos encontrar métodos HPLC-DAD para la determinación de DON y sus metabolitos (Cahill et al., 1999; Mateo et al., 2001; Pascale et al., 2012) y ZEA (Krska et al., 2007).

Debido a las limitaciones propias de la cromatografía de gases (CG), ya que solamente se pueden determinar micotoxinas estables térmicamente y volátiles, su desarrollo metodológico también ha sido menos extenso que el desarrollo a través de HPLC. En la literatura, se han descrito métodos basados en CG para análisis de tricotecenos, ZEA y otras micotoxinas de *Fusarium* (Cahill et al., 1999; Langseth y Rundberget, 1998; Mateo et al., 2001; Schothorst y Jekel, 2001; Valle-Algarra et al., 2011).

Por último, se ha de mencionar, como metodología convencional de cribado de la posible presencia de micotoxinas en muestras, la utilización de



la cromatografía de capa fina (TLC, "Thin-layer chromatography"). Y aunque actualmente está siendo desplazada en su uso por otras técnicas cromatográficas más sensibles y reproducibles (HPLC-FLD/DAD, CG-ECD/FID), aún sigue siendo usada para la realización de cribados de la posible presencia de micotoxinas en muestras de alimentos y piensos debido a su bajo costo y rapidez, permitiendo realizar incluso análisis semicuantitativos del contenido de micotoxinas (Lin et al., 1998).

#### **9.4. Metodologías de cribado rápido de micotoxinas**

---

Con el objetivo de poder determinar la posible presencia de micotoxinas en alimentos de forma rápida, han surgido un conjunto de nuevos métodos de cribado (o "screening") durante los últimos años, que están en constante evolución. Se pueden clasificar en métodos inmunoquímicos de cribado y en otros no invasivos (Cigić y Prosen, 2009).

Todos estos métodos se caracterizan por su sensibilidad, especificidad y rapidez, ya que no se requiere de una purificación o preconcentración previa de la muestra. Además, otra característica que tienen en común, es su accesibilidad desde un punto de vista económico, y la poca preparación previa necesaria del personal técnico responsable de su realización. El principal problema que tienen en todos los casos es la posible presencia de reacciones cruzadas (Krska et al., 2008a), por lo que los resultados positivos obtenidos deben ser confirmados posteriormente por métodos cuantitativos selectivos.

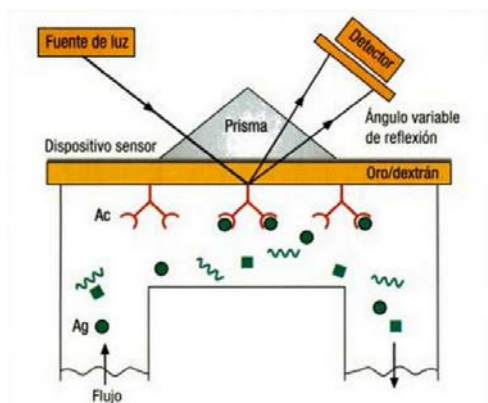
Los métodos inmunoquímicos se basan en las interacciones entre anticuerpos y antígenos (micotoxinas), utilizando un segundo compuesto, denominado marcador o trazador, que proporciona una señal identificable cuando se produce la unión antígeno-anticuerpo. En función de las características de esos marcadores, se pueden tener radioinmunoensayos, donde el marcador utilizado es radiactivo, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA, "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"), donde el marcador es un compuesto cromogénico, o inmunoensayos de fluorescencia (FIA, "fluorescence immunoassay"), si este es fluorogénico. Habitualmente, es ELISA la metodología más utilizada, existiendo actualmente en el mercado tests comerciales para las principales micotoxinas (Krska et al., 2007; Zheng et al., 2006).

Como complemento y/o alternativa a los ensayos ELISA, han surgido en los últimos años, una serie de biosensores, basados en interacciones

inmunoquímicas (Maragos, 2004; Selvaraj et al., 2015; Wang y Wang, 2008). Entre ellos destacan:

- Los inmunosensores ópticos, entre los que se encuentran los basados en la espectroscopía OWLS (“Optical waveguide lightmode spectroscopy”), utilizados para la detección de aflatoxinas y OTA (Adányi et al., 2013, 2007) y los inmunosensores quimioluminiscentes (Selvaraj et al., 2015; Vdovenko et al., 2014).
- Los sensores electroquímicos, fruto de la combinación de la técnica ELISA y electrodos serigrafados, utilizados para la determinación de AFB1 (Masoomi et al., 2013) y OTA (Prieto-Simón et al., 2008).
- Los biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR, “surface plasmon resonance”). Se basan en el acoplamiento de anticuerpos de micotoxinas en una superficie metálica (oro, etc.), que a su vez se encuentra acoplada con un prisma de vidrio, y que refleja la luz total e interna en un ángulo determinado. En presencia del antígeno, al formarse la unión con el anticuerpo, se produce una modificación del índice de reflexión en la superficie metálica, que puede ser detectada por el sensor que se encuentra situado en una película metálica acoplada al prisma de cristal (Figura 24). Se ha utilizado para la detección, entre otros, de FB1 (Mullett et al., 1998) y OTA (Yu y Lai, 2004).

Dentro de los métodos no invasivos, se pueden destacar los basados en la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, “Fourier Transform infrared spectroscopy”), en reflexión difusa (DR, “diffuse reflection”) o en reflexión total atenuada (ATR, “attenuated total reflection”), que han sido utilizados para la determinación de DON en trigo (Abramović et al., 2007), o la espectroscopía de transmitancia en el infrarrojo cercano (Pettersson y Åberg, 2003).



**Figura 24.** Esquema de funcionamiento de la resonancia plasmón de superficie (Delves y Roitt, 2011)

## 9.5. Métodos multimicotoxinas por espectrometría de masas

En los últimos años se ha producido un gran avance en el desarrollo de la cromatografía líquida (LC o HPLC) acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), que han permitido el desarrollo de una nueva metodología en determinación de micotoxinas basada en la cuantificación, con límites de cuantificación y detección por debajo de los establecidos legalmente en piensos y alimentos, y en un único análisis, de un conjunto variado de micotoxinas muy distintas entre sí químicamente. Para ello, se utilizan procedimientos de extracción y purificación más sencillos y menos selectivos que en la metodología convencional, con lo que aumenta considerablemente la rapidez de esa fase.

Aunque para otro tipo de analitos, como por ejemplo los plaguicidas, la metodología de análisis multielemento, utilizando cromatografía de gases acoplada en espectrometría de masas (CG-MS), también se ha desarrollado de forma muy importante, a nivel de micotoxinas su desarrollo ha sido mucho más limitado debido a que los analitos susceptibles de ser analizados deben ser termoestables y volátiles, característica propia de los plaguicidas, pero no de muchas de las micotoxinas. No obstante, en la literatura existen varios trabajos, de análisis de grupos numerosos de micotoxinas, principalmente

tricotecenos y ZEA, mediante CG-MS (Razzazi-Fazeli et al., 2002; Tanaka et al., 2000; Valle-Algarra et al., 2011).

Las razones principales del rápido desarrollo de métodos multimicotoxinas mediante LC-MS ó LC-MS/MS se deben, por una parte, a los avances producidos en las interfaces de ionización, siendo las principales la ionización por electrospray ("Electrospray ionization", ESI) y la ionización a presión atmosférica ("Atmospheric-pressure chemical ionization", APCI), y por otra, a los avances en la capacidad de resolución de los espectrómetros de masas, de forma única, o acoplados en tándem. De hecho, la posibilidad de utilizar, en una única inyección en los sistemas LC-MS o LC-MS/MS, y en cualquiera de las dos interfaces ESI o APCI, los dos modos de ionización (positivo y negativo), ha supuesto un avance muy importante, al permitir la optimización de los parámetros de detección para cada analito durante el desarrollo de los métodos analíticos. Actualmente, la interfaz ESI, se ha estandarizado como la habitual de uso, apareciendo en aproximadamente un 82% de la literatura publicada relativa a cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Holčapek et al., 2012).

Los primeros métodos LC-MS aplicados al análisis de micotoxinas, con un papel principalmente cualitativo, surgieron por la necesidad de construir bases de datos para identificar metabolitos en el campo de la micología (Smedsgaard y Frisvad, 1996) y no fue hasta el año 2003 (Nielsen y Smedsgaard, 2003) cuando surgieron los primeros métodos cuantitativos para la determinación de aflatoxinas, OTA, y otras toxinas de *Fusarium*, aunque con pobres resultados en los controles de precisión y exactitud.

Durante los siguientes años, surgieron diversos métodos de análisis, que al basarse en el uso de columnas SPE o Mycosep®, excluían en el análisis algunas micotoxinas de interés, o las recuperaciones obtenidas para algunas de ellas eran bajas (Berthiller et al., 2005; Lattanzio et al., 2007; Ren et al., 2007; Sørensen y Elbæk, 2005; Tanaka et al., 2006). Para evitar esto, varios de los métodos multimicotoxinas publicados posteriormente, optaron por la inyección de los extractos de las muestras directamente en el sistema sin realizar ninguna purificación previa mediante SPE, columnas IAC o cartuchos Mycosep®, lo cual aumentó el número de micotoxinas incluidas en cada análisis, pero también necesariamente los requisitos de selectividad en los métodos, dada la cantidad de posibles interferentes presentes en los extractos (efecto matriz) e inyectados en los sistemas LC-MS ó LC-MS/MS. Estos requerimientos en cuanto a selectividad han podido ser satisfechos gracias a

la utilización de la espectrometría de masas acoplada en tándem, siendo actualmente el sistema de detección de elección en el desarrollo de metodologías analíticas multimicotoxinas (Lattanzio et al., 2011; Soleimany et al., 2012a; Spanjer et al., 2008; Sulyok et al., 2007a, 2007b, 2006).

La diferenciación actual entre los distintos espectrómetros de masas puede establecerse en función de su poder de resolución y su precisión en la medición de la masa molecular ("mass accuracy", MA). El poder de resolución ("resolving power", RP o "full width at half maximum", FWHM) de un espectrómetro de masas puede definirse como el valor de carga/masa ( $m/z$ ) para un determinado pico cromatográfico dividido por la anchura de pico a mitad de altura (FWHM). Dado que a mayor relación  $m/z$ , mayor RP, este debe estar siempre referido a un determinado valor  $m/z$ . Por ejemplo, si para un determinado espectrómetro de masas el valor RP para una determinada  $m/z=850$  es de 18000, y en otro, para la misma  $m/z$ , el valor de RP es de 15000, el primero tiene mayor capacidad de resolución que el segundo.

La precisión de masa molecular (MA) puede definirse como la diferencia relativa entre el valor  $m/z$  obtenido por el espectrómetro, y el valor teórico asignado para esa relación  $m/z$ , teniendo en cuenta la carga eléctrica del ion molecular y expresada en ppm. Cuanto menor es la diferencia, mayor es la precisión de la masa molecular del espectrómetro de masas.

Junto a los dos parámetros mencionados en el apartado anterior, hay que incluir otros dos parámetros adicionales para completar la información fundamental de un espectrómetro de masas, y que son el intervalo de trabajo en función de la relación  $m/z$ , y la velocidad de adquisición. El intervalo de trabajo marca la mínima y máxima relación  $m/z$  capaz de ser medida por el espectrómetro de masas, mientras que la velocidad de adquisición, como indica su nombre, mide el tiempo que tarda en medir una determinada masa y se expresa en hercios (Hz).

En función de su RP y MA, los distintos espectrómetros de masas existentes actualmente a nivel comercial pueden dividirse en tres clases: de bajo poder de resolución y precisión de masas ( $RP < 10000$ ,  $MA > 5$  ppm), alto ( $RP$  entre 10000-100000,  $MA < 5$  ppm), y muy alto ( $RP > 100000$ ,  $MA < 1$  ppm). La mayoría de los espectrómetros con un único cuadrupolo (Q), con triple cuadrupolo (QqQ), o basado en detección por trampa de iones (IT) estarían dentro del primer grupo o de bajo poder de resolución. Los espectrómetros de tiempo de vuelo (TOF, QTOF), estarían en el segundo y finalmente dentro del tercero, estarían los espectrómetros de resonancia ciclotrónica de iones (ICR)

y los Orbitrap, siendo ambos espectrómetros de transformada de Fourier (IT). Su precio de adquisición y mantenimiento, es inverso a su poder de resolución, aunque dado el dinamismo en el sector y los constantes avances que se producen, sus precios van abaratándose paulatinamente. Actualmente, en función de la literatura publicada relativa a cromatografía líquida y espectrometría de masas, los equipos IT (35%), TOF+Q-TOF (26%), y QqQ (23%), son los más utilizados, representando en su conjunto, el 82% del total de la literatura publicada sobre espectrometría de masas (Holčapek et al., 2012).

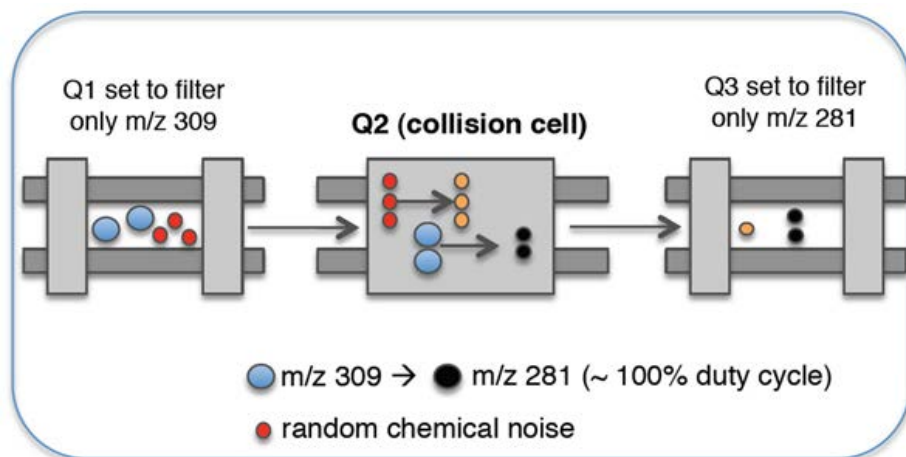
Las especificaciones, según el fabricante, del detector Q-TOF-MS (TripleTOF 5600, AB SCIEX) utilizado en la presente Tesis Doctoral fueron: RP=35000 m/z, MA: 0,5 ppm (mediante calibración interna) y 2 ppm (mediante calibración externa), con un intervalo de trabajo m/z de (5-40000), y una velocidad de adquisición de 25 Hz en modo MS, y 100 Hz en modo MS/MS. Según la clasificación de equipos de espectrometría de masas comentada anteriormente, el equipo se encontraría en el grupo intermedio o de alto poder de resolución. En relación al detector QqQ (Acquity TQD, Waters) también utilizado en esta tesis, y aunque la información proporcionada por el fabricante no incluyó una descripción comparable del valor RP o de la MA, si indica que el intervalo de trabajo m/z de equipo era 2-2048 y su velocidad de adquisición, de 10 Hz, confirmando, junto con el resto de la información técnica, que se encontraría dentro del primer grupo de la clasificación mencionada.

Recientemente, la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC o UPLC), basada en la utilización de columnas cromatográficas con un menor tamaño de partícula (< 2  $\mu\text{m}$ ) y de presiones superiores a 1300 bares, ha supuesto un avance importante a nivel cromatográfico ya que ha permitido obtener mayores resoluciones en los picos cromatográficos, mayor sensibilidad, mejorar la eficiencia en la separación cromatográfica y reducir considerablemente los tiempos de análisis. En análisis por HPLC-MS, los picos cromatográficos se recomienda que tengan al menos 12-15 puntos por pico cromatográfico (mínimo 8-10 picos). Dentro del tiempo de análisis, estos picos se obtienen en el intervalo de 1 a 3 segundos, que pueden reducirse a 1s en condiciones óptimas. Con estos parámetros, la velocidad de adquisición de los espectrómetros de masas oscila entre 3-10 Hz para una anchura media de los picos de 1-3 s, y de 10-20 Hz para una anchura media de 0,7-1 s. Dado que en UHPLC los picos cromatográficos tienen una anchura temporal menor, es necesario la utilización de espectrómetros de masas de mayor velocidad de adquisición, como son los espectrómetros de masas triple cuádruplo más

recientes, o los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) (Fekete et al., 2014; Holčapek et al., 2012; Nováková y Vičková, 2009). Su aplicación al desarrollo de métodos multimicotoxinas, ha supuesto la aparición de varios métodos U(H)PLC-MS/MS utilizados principalmente en cereales y frutos secos (Mol et al., 2008; Pereira et al., 2014; Soleimany et al., 2012b; Varga et al., 2013; Wang et al., 2013).

Un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QqQ), ofrece, en el desarrollo de métodos multimicotoxinas, una alta sensibilidad, selectividad y especificidad, permitiendo realizar cuantificaciones precisas de concentraciones en piensos o alimentos gracias al modo de trabajo MRM ("monitorización de reacciones múltiples") con el que habitualmente se trabaja. En el modo MRM, el primer cuadrupolo Q1 del detector, selecciona la molécula del analito de interés, previamente ionizada mediante las interfaces ESI o APCI, en función de su relación  $m/z$ , siendo dirigida al segundo de los cuadrupolos (q) donde se fragmenta. Los fragmentos generados (iones hijos o producto) son seleccionados en el tercer cuadrupolo (Q2), a través de su relación  $m/z$ , dando lugar a los picos (espectros MS/MS) que se aprecian en el cromatograma resultante. La identificación y confirmación de la presencia del analito viene determinada por la especificidad en los fragmentos seleccionados en el cuadrupolo Q2, lo que permite, por una parte, reducir el ruido de fondo por posibles interferencias presentes en la matriz y por otra, la cuantificación correspondiente al analito de interés, dado que las condiciones de trabajo (fragmentación, etc.) en los equipos QqQ son reproducibles en el tiempo. Dado que los detectores QqQ habitualmente se asocian con equipos de cromatografía líquida, trabajando en modo MRM, los sistemas conjuntos reciben el nombre de (HP)LC-MS/MS, haciendo referencia a los cuadrupolos analizadores del sistema. La Figura 25 representa el esquema de funcionamiento un espectrómetro QqQ en modo MRM.

Mientras que los analizadores cuadrupolos seleccionan las masas a través de su relación  $m/z$ , un analizador TOF mide el tiempo que tarda una molécula, previamente cargada electrostáticamente, y dentro de un campo eléctrico, en recorrer una determinada distancia hasta el detector. Es decir, que, a diferencia de un cuadrupolo, un analizador TOF, mide además de la relación  $m/z$ , la velocidad de la molécula ionizada. Por lo tanto, las moléculas ionizadas con menor masa y mayor relación  $m/z$ , serán las que tengan mayor velocidad.

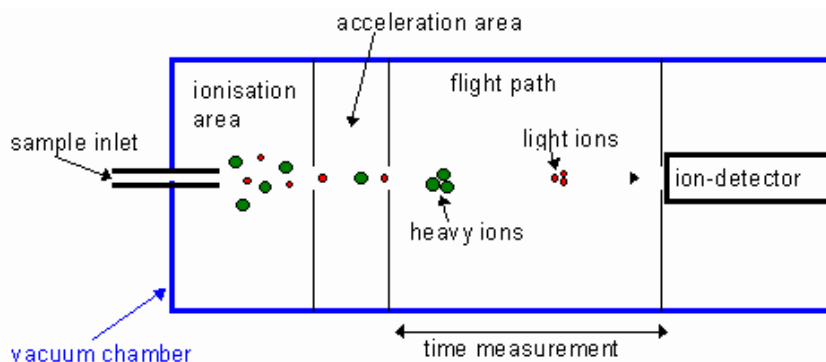


**Figura 25.** Esquema de funcionamiento de un espectrómetro de masas QqQ en funcionamiento en modo MRM. Adaptado de <http://www.foodsafetymagazine.com/>

La Figura 26 muestra un esquema del funcionamiento teórico de un espectrómetro TOF. Habitualmente, el modo de trabajo utilizado en TOF, es el otro modo de trabajo más usual en espectrometría de masas, denominado “full-scan”, y que se diferencia fundamentalmente del modo MRM visto para los sistemas QqQ, en que se miden todos los iones presentes dentro de un intervalo  $m/z$  preestablecido, y no solamente los preseleccionados según su relación  $m/z$ .

Fruto de la combinación de ambos modos de trabajo, surgieron a principio del s. XXI, los espectrómetros Q-TOF-MS. Son instrumentos híbridos, que combinan las propiedades de un analizador de masas TOF y las de un cuadrupolo con el que se encuentra acoplado. Los espectrómetros Q-TOF-MS son muy utilizados en la caracterización estructural de compuestos ya que permiten combinar las medidas de masa molecular precisas, gracias a la alta precisión en la medición de la masa (MA) proporcionada por el analizador TOF, con la obtención de espectros MS/MS debido al cuadrupolo con el que se encuentra en combinación. Sin embargo, su precisión y reproducibilidad para fines cuantitativos no es tan buena como la de los sistemas QqQ, por lo que habitualmente se utilizan para realizar cribados rápidos y precisos de posibles analitos predeterminados en una base de datos o la identificación de analitos no predeterminados en función tanto de la masa como de los espectros MS/MS obtenidos (Wang et al., 2013).





**Figura 26.** Esquema de funcionamiento de un espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) <http://alevelnotes.com/Mass-Spectrometry/124>

## 10. Determinación de hongos productores

La identificación y cuantificación de hongos productores de micotoxinas es más difícil que en bacterias y levaduras debido a que, como ya se ha comentado en esta introducción, su crecimiento vegetativo se produce a través del crecimiento vegetativo de las hifas, y puede resultar difícil diferenciar este del sustrato. Por ello, es en la fase de esporulación donde se pueden realizar recuentos de colonias. Hasta el desarrollo de la biología molecular, la identificación y cuantificación de la micobiota productora de micotoxinas de un sustrato se realizaba mediante el estudio de su morfología macro y microscópica (Kirk et al., 2001). Para realizar el mismo, es necesario que el medio de cultivo utilizado (Pitt y Hocking, 2009b), reúna las siguientes condiciones:

- Debe inhibir el crecimiento bacteriano completamente sin afectar el fúngico.
- Debe ser nutricionalmente adecuado y promover el crecimiento de los hongos de interés.
- Debe evitar el crecimiento de hongos del suelo o irrelevantes.
- Debe permitir un crecimiento radial lento de los hongos para poder realizar el recuento, pero sin inhibir la germinación de las esporas.

Como medio general de crecimiento, habitualmente se utiliza, para los principales hongos productores de micotoxinas, agar PDA (“potato dextrose agar”) utilizando un tiempo de incubación de 5 a 7 días y una temperatura entre 25 °C y 30 °C. Este medio generalmente presenta un pH neutro para inhibir el crecimiento bacteriano. Para asegurar la inhibición del mismo, se utilizan antibióticos, como el cloranfenicol. Además, habitualmente estos medios generales también suelen contener inhibidores del crecimiento rápido de hongos, como 2,6 dicloro-4-nitroaloinina (diclorán) y/o rosa de bengala (Hocking et al., 2006). Los medios agar DRBC (Diclorán-Rosa bengala-Cloranfenicol) y agar DG18 (Diclorán-Glicerol-Cloranfenicol) son los medios más utilizados, y en su denominación recogen lo anteriormente expuesto.

En el estudio de un determinado género y/o especie fúngico micotoxigénico, se utilizan medios de crecimientos selectivos, siendo los principales:

- Hongos productores de aflatoxinas. Las especies más frecuentes son *A. flavus* y *A. parasiticus*. Habitualmente se utiliza agar AFPA (“agar *A. flavus* y *A. parasiticus*”), que contiene diclorán y cloranfenicol para inhibir el crecimiento radial excesivo de las colonias fúngicas, y de las bacterias respectivamente. Las condiciones habituales de incubación son 30 °C durante 42-72 h dando lugar a colonias naranja-amarillentas. Otro medio muy utilizado es el agar CCA (“Coconut cream agar”), utilizado para detectar la producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus* mediante observación de los cultivos utilizando luz ultravioleta. Las colonias de las cepas productoras presentan fluorescencia blanca o blanca-azulada. Las condiciones de incubación de los cultivos suelen ser 30 °C durante 5-7 días (Pitt et al., 1983).
- Hongos productores de OTA: Para las principales especies del género *Aspergillus* productoras de OTA no hay un medio selectivo específico y habitualmente se utiliza medio agar CCA y medio DG18, que da lugar a colonias de color ocre. En el caso de las cepas productoras de ocratoxinas del género *Penicillium* (*P. verrucosum* principalmente) se utiliza medio DYSG (agar diclorán, extracto de levadura, sacarosa al 18% y glicerol), dando lugar a colonias marrón-rojizas, a una temperatura de 25 a 30 °C.
- Hongos del género *Fusarium* : Los medios selectivos más utilizados son el agar DCPA (agar diclorán cloranfenicol peptona)

(Andrews y Pitt, 1986) y el agar Czapek iprodione diclorán (Abildgren et al., 1987).

Durante mucho tiempo la identificación de los hongos productores de micotoxinas en alimentos se ha realizado mediante el estudio de la morfología macro- y microscópica del hongo (Hawksworth et al., 1995) y, todavía, esta información sigue siendo un pilar básico en la taxonomía fúngica, cuyo desarrollo ha ido ligado al de las técnicas de microscopía y a los estudios sobre la fisiología de los hongos y, más recientemente, a los estudios sobre su genética (Frisvad et al., 2004; Samson et al., 2004; Pettersson et al., 2008; Pildain et al., 2008; Yin et al., 2009; de Kupler et al., 2011).

El estudio morfológico del hongo implica métodos laboriosos, requiere personal muy experto y no distingue variabilidad intra-específica, e incluso, a veces, tampoco es evidente la inter-específica. Ello ha hecho necesario el estudio de caracteres fisiológicos basados en el perfil de producción de metabolitos secundarios, como son las micotoxinas (Samson et al., 2004; 2006; 2007; Frisvad et al., 2007a; 2008).

Por otra parte, el avance en las técnicas basadas en el DNA, al igual que para el resto de organismos, también en el caso de los hongos filamentosos ha tenido un fuerte impacto en su taxonomía y filogenia (Abdin et al., 2010; Hayat et al., 2012; Niessen, 2007; Pitt y Hocking, 2009b) y ha resuelto los problemas asociados a la subjetividad de la identificación fenotípica y a la variabilidad morfológica y fisiológica debida a las condiciones de cultivo del hongo. En este sentido, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto una herramienta de gran impacto en el diagnóstico fúngico. Esta técnica es rápida, específica, fácil de realizar y requiere muy poca cantidad de DNA molde, permitiendo la detección de moléculas diana en mezclas complejas como puede ser un pienso (Russell y Paterson, 2006; Niessen, 2007). Son además técnicas complementarias y alternativas a otras, como las basadas en hibridaciones de DNA, entre las que destacan el “DNA-fingerprinting” y el “Southern Blot” (Majer et al., 1996; Såde y Björkroth, 2014) o la electroforesis en gel de campo pulsante (Niessen, 2007).

Las principales técnicas de PCR utilizadas para la detección e identificación de hongos productores de micotoxinas son el polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs, “Restriction Fragment Length Polymorphism”) y de fragmentos amplificados (AFLPs, “Amplified Fragment Length Polymorphism”), el ensayo de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD, “Random 20 Amplified Polimorphic DNA”), la PCR cuantitativa

(qPCR), la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) y la PCR con cebadores específicos (Patiño et al., 2005; 2007; Abdin et al., 2010; Gil-Serna et al., 2013; Hayat et al., 2012; Mateo et al., 2011; Niessen, 2007; González-Salgado et al., 2005; Jurado et al., 2005; 2006; 2008; 2010).

## II. OBJETIVOS





Los objetivos generales propuestos en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Optimización de la metodología analítica, para la determinación de aflatoxina B1, zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas B1 y B2 y toxinas T-2 y HT-2 en piensos mediante cromatografía líquida de alta resolución.
2. Optimización de la metodología analítica para la determinación de las principales micotoxinas legisladas a nivel europeo (AFB1, ZEA, OTA, DON, FB1, FB2, T-2, HT-2) y de otras micotoxinas de interés toxicológico (AFB2, AFG1, AF2, FUSX, 3 y 15-ADON, DAS) mediante cromatografía líquida de ultra alta definición acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS).
3. Optimización de la metodología para la identificación de otras micotoxinas de interés presentes en piensos mediante cromatografía líquida de ultra alta definición acoplada a cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-QTOF-MS).
4. Determinación de las micotoxinas presentes en piensos comerciales de España, mediante la aplicación de la metodología cromatográfica desarrollada en los objetivos 1, 2 y 3.
5. Caracterización de la micobiota productora de micotoxinas contaminante de las muestras de piensos analizadas en el objetivo 4 mediante técnicas convencionales y métodos de PCR específicos de especie.





# III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL





## **I. Optimización de la metodología analítica, para la determinación de micotoxinas en piensos mediante cromatografía líquida de alta resolución.**

---

Uno de los principales problemas que encuentran todos los agentes productores, comercializadores y autoridades de control, implicados en la cadena de producción y comercialización de piensos, es la de disponer de técnicas analíticas sensibles, robustas y económicamente viables para la determinación del contenido de micotoxinas.

Tal y como se ha visto en la introducción, los niveles de concentración de micotoxinas establecidos actualmente en la legislación para piensos son lo suficientemente bajos para que técnicas cualitativas o semicuantitativas habitualmente utilizadas en laboratorios de control, como las basadas en ELISA o TLC, puedan no ser lo suficientemente sensibles o precisas. Por ello surge la necesidad de optimizar métodos analíticos sencillos, sensibles, robustos, reproducibles y económicamente viables para la determinación de las principales micotoxinas en piensos, siendo este el primer objetivo de esta Tesis Doctoral. Para su consecución, los reactivos, materiales y métodos utilizados fueron los que se describen a continuación:

### **I.1. Patrones, reactivos e instrumentación**

---

Los patrones sólidos utilizados de aflatoxina B<sub>1</sub>, zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y toxinas T-2 y HT-2, fueron adquiridos a Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España) y mantenidos en oscuridad a -18 °C.

El agua pura se obtuvo a través de un aparato Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA), mientras que metanol, tolueno, acetona, y acetonitrilo, todos con grado de pureza HPLC, fueron adquiridos a Panreac (Castellar del Vallés, España) y J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). También fueron adquiridos yodo cristalino, dihidrogenofosfato sódico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), hidrogenofosfato disódico dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), cloruro sódico (NaCl), ácido orto-fosfórico al 85%, ftalaldehído, tetraborato disódico decahidrato y 2-mercaptoetanol, que fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania), y su grado de calidad, para análisis. Así mismo, se utilizaron microfiltros de teflón de 0,22 µm de Whatman (Maidstone, Reino Unido). Para el método de determinación de las toxinas T-2 y HT-2, fueron adquiridos 1-antróilnitrilo (1-AN) a Wako (Wako

Chemicals GmbH, Neuss, Alemania) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) a Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España), ambos con grado de calidad para análisis.

Debido al posible efecto de la luz solar en la estabilidad de las micotoxinas, especialmente las aflatoxinas, se utilizó material preparado para ello (color ámbar) o se protegió frente a la misma.

En función de la micotoxinas a determinar, se prepararon distintas **disoluciones de extracción**, tomando los volúmenes correspondientes de H<sub>2</sub>O, ACN y MeOH, tal y como se indican en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Disoluciones utilizadas durante la fase de extracción de los métodos

Nº	Micotoxina	Disolución de extracción utilizada
1	Aflatoxina B1	Acetona/H <sub>2</sub> O 85/15 (v/v)
2	Zearalenona	ACN//H <sub>2</sub> O 75/25 (v/v)
3	Deoxinivalenol	H <sub>2</sub> O
4	Fumonisinás B1 y B2	H <sub>2</sub> O/MeOH/ACN 50/25/25 (v/v)
5	Toxinas T-2 y HT-2	MeOH/H <sub>2</sub> O 90/10 (v/v)

Asímismo se prepararon las siguientes **disoluciones de trabajo**:

1. Disolución tampón fosfato salino (PBS Buffer) pH =7,4.

Se preparó una disolución tampón fosfato salino (PBS buffer) 20 mM, con pH 7,4, a partir de 9 g de NaCl, 2,85 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0,55 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, y enrasando a 1 litro con H<sub>2</sub>O MilliQ. Se le asignó una caducidad de 2 meses, conservándose a 5 °C de temperatura.

2. Disolución de derivatización post-columna para la determinación de AFB1 por HPLC-FLD:

Se preparó utilizando 250 mg de yodo y 5 mL de MeOH para su disolución, enrasando posteriormente a 500 mL con H<sub>2</sub>O MilliQ. Está disolución se almacenó en una botella protegida de la luz solar para evitar su posible degradación por la luz, y se mantuvo a 5 °C, asignándole una caducidad de 2 meses.

3. Reactivo de derivatización pre-columna para la determinación de fumonisinas FB1 y FB2 por HPLC-FLD.

Se preparó una disolución 0,1 M de tetraborato disódico, a partir de 0,95g de tetraborato disódico decahidrato, enrasando a 25 mL con H<sub>2</sub>O. Esta disolución se almacenó a 5 °C, asignándole una caducidad de 7 días desde su preparación.

El reactivo de derivatización pre-columna utilizado para la determinación de fumonisinas FB1 y FB2, se preparó utilizando 120 mg de orto-ftalaldehído y disolviéndolos en 3mL de MeOH, diluyendo posteriormente con 15 mL de la disolución 0,1 M de tetraborato disódico preparada. A la disolución resultante se le adicionaron 150 µL de 2-mercaptoetanol, homogeneizando completamente. Esta disolución se almacenó a -18 °C, asignándole una caducidad de 15 días.

#### 4. Disolución de 0,1 M de dihidrógeno fosfato sódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Se preparó una disolución 0,1M de dihidrógeno fosfato sódico, a partir de 3,45g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y enrasándolo a 250 mL con H<sub>2</sub>O MiliQ. Esta disolución se almacenó a 5 °C, asignándole una caducidad de 7 días desde su preparación.

#### 5. Reactivos de derivatización pre-columna para la determinación de T2 y HT2 por HPLC-FLD.

- Disolución de 325 µg/mL de DMAP.

Se preparó pesando 125 mg de DMAP sólido y diluyendo con 5 mL de tolueno. A partir de dicha disolución, se tomaron 130 µL, se vertieron en un matraz aforado de 10 mL, aforando a volumen con tolueno.

- Disolución de 300 µg/mL de 1-AN.

Se preparó pesando 100 mg de 1-AN sólido y diluyendo con 5 mL de tolueno. A partir de dicha disolución, se tomaron 150 µL, se vertieron en un matraz aforado de 10 mL, aforando a volumen con tolueno.

A ambas disoluciones se les asignó una caducidad de 6 meses, preservándolas en oscuridad a una temperatura de -18 °C.

Las **disoluciones patrón** preparadas fueron las siguientes:

#### 1. Disoluciones patrón de AFB1

Se preparó una disolución patrón de AFB1 de concentración de 20 µg/mL, a partir de 1,0 mg de patrón sólido de AFB1, disuelto en 50 mL de una mezcla tolueno/ACN 98/2 (v/v), y asignándole una caducidad de 6 meses. A partir de esta disolución patrón se prepararon otras dos, de 1000 ng/mL y de 50 ng/mL

respectivamente, utilizando la misma mezcla indicada en el apartado anterior y asignándole una caducidad de 3 y 1 mes respectivamente. Las disoluciones se mantuvieron en oscuridad, a -18 °C.

## 2. Disoluciones patrón de ZEA

Se preparó una disolución patrón de ZEA de concentración de 20 µg/mL, a partir de 1,0 mg de patrón sólido de ZEA, en 50 mL de ACN, y asignándole una caducidad de 6 meses. A partir de esta disolución patrón se prepararon otras dos disoluciones, de 1000 ng/mL y de 50 ng/mL respectivamente, utilizando también ACN como disolvente y asignándole una caducidad de 3 y 1 mes respectivamente. Las disoluciones se mantuvieron en oscuridad, a -18 °C.

## 3. Disoluciones patrón de DON

Se preparó una disolución patrón de DON de concentración de 100 µg/mL, a partir de 5 mg de patrón sólido de DON, en 50 mL de ACN, y asignándole una caducidad de 6 meses. A partir de esta disolución patrón se preparó otra disolución de 250 ng/mL utilizando una mezcla H<sub>2</sub>O/MeOH/ACN 93/4/3 v/v y asignándole una caducidad de 1 mes. Las disoluciones se mantuvieron en oscuridad, a -18 °C.

## 4. Disoluciones patrón de FB1 y FB2

Se prepararon disoluciones individuales de fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> de 75 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente, a partir de 3,75 mg del patrón sólido de fumonisinas B<sub>1</sub> y de 1,25 mg del patrón sólido de fumonisinas B<sub>2</sub>, utilizando matraces aforados de 50 mL y enrasando a volumen con una mezcla de ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v). Se le asignó una caducidad de 6 meses.

A partir de las mismas, se preparó 50 mL de una disolución patrón conjunta de 100 ng/mL de ambas fumonisinas, 75 ng/mL de FB<sub>1</sub> y 25 ng/mL de FB<sub>2</sub>, tomando 50 µL de cada una de las disoluciones individuales, vertiéndolas en un matraz aforado de 50 mL y enrasando a volumen con una mezcla de ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v). Se le asignó una caducidad de 1 mes. Todas las disoluciones se mantuvieron en oscuridad a -18 °C.

## 5. Disoluciones patrón de toxinas T-2 y HT-2

Se preparó una disolución patrón de toxinas T-2 y HT-2 de concentración 100 µg/mL (cada una), a partir de 1 mg de cada uno de los patrones sólidos de

toxinas T-2 y HT-2, en un matraz aforado de 10 mL, y enrasando a volumen con ACN. Se le asignó una caducidad de 6 meses.

A partir de esta disolución patrón, se preparó otra de 500 ng/mL, tomando 50 µL de la disolución patrón de 100 µg/mL en un matraz aforado de 10 mL, y llevando a volumen con mezcla ACN/H<sub>2</sub>O 70/30 v/v. Se le asignó una caducidad de 3 meses. Todas las disoluciones se mantuvieron en oscuridad a -18 °C.

A nivel **instrumental**, los análisis cromatográficos se realizaron utilizando una bomba Waters 600 y un inyector automático Waters 717 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Los datos fueron procesados utilizando como software Millennium 32 versión 3.05.01 (Waters Corp., Milford, MA, EUA). El sistema cromatográfico fue conectado a dos detectores:

- Detector de fluorescencia Waters 474, para la determinación de AFB<sub>1</sub>, ZEA, FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, T-2 y HT-2.
- Detector de ultravioleta por red de fotodiodos (DAD) Waters PDA 996, para la determinación de DON.

Para la derivatización postcolumna utilizada en la determinación de AFB<sub>1</sub>, se utilizó una bomba para líquidos con rango de trabajo 0,1-5 mL/min, acoplada a un horno cromatográfico (rango de trabajo 30-150 °C).

Dentro del equipamiento utilizado para los procesos de preparación de muestras, se utilizó:

- Agitador de alta velocidad Ultraturrax T25 y un molinillo de laboratorio A-10 IKA (Stauffen, Alemania).
- Agitador orbital Infors-HT Aerotron (Infors-HT, Bottmingen, Suiza).
- Centrífuga Heraeus Multifuge 1 S-R (Heraeus holding, Hanau, Alemania).

## **2. Determinación de aflatoxina B<sub>1</sub> mediante HPLC-FLD**

---

La determinación de aflatoxina B<sub>1</sub> en piensos se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia (FLD). El proceso de preparación de las muestras a analizar y su determinación cromatográfica posterior fue el que se describe a continuación.

---

## Extracción y purificación

---

De cada muestra de pienso homogeneizada, se tomó 25 g añadiéndole 125 mL de solución de extracción (Nº 1, Tabla 9) en un Erlenmeyer de 250 mL. Las muestras se agitaron durante 30 minutos, utilizando un agitador orbital Infors-HT Aerotron. El extracto se filtró utilizando filtros de papel Whatman nº5 (Whatman, Maidstone, UK), y se tomó 5 mL, vertiéndolo a un matraz aforado de 100 mL, enrasando a volumen con la disolución PBS Buffer.

La purificación se realizó utilizando columnas de inmunoafinidad (IAC) AFLAPREP (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia). Para ello, se tomaron 50 mL extracto diluido con PBS Buffer, y utilizando una jeringa de 50 mL de plástico estéril, se hizo pasar el mismo a través de la columna a un flujo de 2 a 3 mL/min. Posteriormente, se lavó la columna utilizando 25 mL de H<sub>2</sub>O a un flujo de 2-3 mL/min, permitiendo una vez finalizado, el paso de aire para su secado. Finalmente, se procedió a eluir el analito retenido utilizando 2 mL de MeOH, en dos etapas. En un primer paso, se añadió 0,5 mL de MeOH a cada columna durante 5 minutos y transcurrido el tiempo, se recogió el eluato en un matraz aforado de 10 mL protegido de la luz, permitiendo el paso de aire a través de la columna IAC. Posteriormente, se añadió 1,5 mL de MeOH a cada columna, repitiendo el proceso indicado anteriormente. Cada matraz se enrasó a volumen con H<sub>2</sub>O, y tras realizar una homogeneización completa, se procedió a su filtrado a vial de HPLC utilizando filtros de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 µm.

---

## Determinación cromatográfica

---

La separación cromatográfica fue realizada utilizando una columna C<sub>18</sub> de fase inversa Waters Symmetry (Waters Corp., Milford, MA, USA) con las siguientes características: 150 mm de longitud, 2,1 mm diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula. En la fase móvil, se utilizó una mezcla de H<sub>2</sub>O/MeOH 60/40 (v/v), desgasificándola previamente mediante el uso de ultrasonidos. El flujo de trabajo de fase móvil utilizado fue de 0,35 mL/min. La columna cromatográfica se mantuvo a 25 °C al igual que la temperatura del inyector automático. El volumen de inyección utilizado fue de 30 µL y fue inyectado en el sistema directamente.

Para la derivatización de AFB<sub>1</sub>, se utilizó la disolución de derivatizante post-columna establecida para esta determinación (sección 1.1) utilizando una bomba



de líquidos que se programó con un flujo de trabajo de 0,1 mL/min, mientras que la temperatura del horno de derivatización establecida fue de 70 °C.

El FLD fue programado con una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) de 360 nm y una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) de 420 nm.

---

### Calibración

---

Para la cuantificación se preparó una curva de calibrado de 5 puntos, con concentraciones de 0,05, 0,2, 0,3, 0,5 y 1 ng/mL, utilizando el patrón de 50 ng/mL de AFB1 y matraces aforados de 25 mL. En cada matraz se introdujo el volumen correspondiente del patrón de 50 ng/mL, desecando mediante el uso de corriente de nitrógeno, y redisolviendo con 10 mL de MeOH. Finalmente se aforó a volumen con H<sub>2</sub>O, mezclando para conseguir una completa homogeneización, y filtrando a vial de HPLC mediante el uso de jeringas y filtros PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ . La curva de calibrado fue ajustada mediante el método de regresión lineal por mínimos cuadrados, siendo los criterios de aceptación preestablecidos los siguientes:

- Coeficiente de determinación (o de regresión lineal)  $R^2 \geq 0,99$
- Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVFR):  $\leq 20\%$ .

El cálculo de la concentración de AFB1 en muestras ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), se realizó a partir del producto de la concentración obtenida en el sistema HPLC expresada en ng/mL multiplicada por 20.

### 3. Determinación de zearalenona mediante HPLC–FLD

---

La determinación de zearalenona en piensos se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC), acoplada a un FLD. El proceso de preparación de las muestras a analizar y su determinación cromatográfica posterior fue el que se describe a continuación.

---

#### Extracción y purificación

---

De cada muestra de pienso homogeneizada, se tomó 25 g añadiéndole 100 mL de solución de extracción (Nº 2, Tabla 9) en un Erlenmeyer de 250 mL. Las muestras se agitaron durante 30 minutos, utilizando un agitador orbital Infors-HT Aerotron. El extracto se filtró utilizando filtros de papel Whatman nº4 (Whatman,

Maidstone, UK), y se tomó 10 mL, vertiéndolo a un matraz aforado de 50 mL, enrasando a volumen con la disolución PBS Buffer.

La purificación se realizó utilizando columnas IAC EASI-EXTRACT (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia). Para ello, se tomaron 50 mL de extracto diluido con PBS Buffer, y utilizando una jeringa de 50 mL de plástico estéril, se hizo pasar el mismo a través de la columna a un flujo de 3-5 mL/min. Posteriormente, se lavó la columna utilizando 25 mL de H<sub>2</sub>O a un flujo de 3-5 mL/min, permitiendo una vez finalizado, el paso de aire para su secado. Finalmente, se procedió a eluir el analito retenido en dos etapas. En un primer paso, se añadió 2 mL de ACN a cada columna, esperando 2 minutos antes de recoger el eluato por gravedad en un matraz aforado de 5 mL, y permitiendo al finalizar el paso de aire a través de la columna IAC. Posteriormente, se añadió 2 mL de H<sub>2</sub>O a cada columna, repitiendo el proceso indicado anteriormente. Cada matraz se enrasó a volumen con ACN, y tras su completa homogeneización, se procedió a su filtrado a viales de HPLC utilizando filtros PTFE de 0,45 µm.

---

### Determinación cromatográfica

La separación cromatográfica fue realizada utilizando una columna C<sub>18</sub> de fase inversa Waters Symmetry (Waters Corp., Milford, MA, USA) con las siguientes características: 150 mm de longitud, 2,1 mm diámetro interno y, 5 µm de tamaño de partícula. En la fase móvil, se utilizó una mezcla de ACN/H<sub>2</sub>O 60/40 (v/v), desgasificándola previamente mediante el uso de ultrasonidos. El flujo de trabajo de fase móvil utilizado fue de 0,35 mL/min.

La columna cromatográfica se mantuvo a 25 °C y la temperatura del inyector automático también se estableció en 25 °C. El volumen de inyección utilizado fue de 30 µL y fue inyectado en el sistema directamente.

Las condiciones establecidas para el FLD fueron una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 274 nm y una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 450 nm.

---

### Calibración

Para la cuantificación se preparó una curva de calibrado de 5 puntos, con concentraciones de 12,5, 25, 50, 100 y 250 ng/mL, utilizando el patrón de 1000 ng/mL de ZEA y matraces aforados de 10 mL. En cada matraz de 10 mL se introdujo el volumen correspondiente del patrón de 1000 ng/mL de ZEA, y se añadió 4 mL de H<sub>2</sub>O. Finalmente se aforó a volumen con ACN, mezclando para conseguir una completa homogeneización, y filtrando a vial de HPLC mediante el

uso de jeringas y filtros PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ . La curva de calibrado fue ajustada mediante el método de regresión lineal por mínimos cuadrados, siendo los criterios de aceptación preestablecidos los siguientes:

- $R^2 \geq 0,99$
- CVFR  $\leq 20\%$ .

El cálculo de la concentración de ZEA en muestras ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), se realizó a partir del producto de la concentración obtenida en el sistema HPLC expresada en  $\text{ng}/\text{mL}$  multiplicada por 2.

#### **4. Determinación de deoxinivalenol mediante HPLC-DAD**

---

La determinación de deoxinivalenol en piensos se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC), acoplada a un detector de ultravioleta por red de fotodiodos (DAD). El proceso de preparación de las muestras a analizar y su determinación cromatográfica posterior fue el que se describe a continuación.

##### **Extracción y purificación**

---

De cada muestra de pienso homogeneizada, se tomó 25 g añadiéndole 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (Nº3, Tabla 9). Las muestras se mezclaron durante 3 minutos mediante el uso de un homogeneizador Ultraturrax T25, y posteriormente los extractos resultantes se filtraron utilizando filtros de microfibra de vidrio Whatman GF/A (Whatman, Maidstone, UK).

La purificación se realizó utilizando columnas IAC DONPREP (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia). Para ello, se tomaron 2 mL de extracto filtrado y utilizando una jeringa de 10 mL de plástico estéril, se hizo pasar el mismo a través de la columna a un flujo de 1-3 mL/min. Posteriormente, se lavó la columna utilizando 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  a un flujo de 3-5 mL/min, permitiendo una vez finalizado, el paso de aire para su secado. Finalmente, se procedió a eluir el analito retenido en dos etapas. En un primer paso, se añadió 0,5 mL de MeOH a cada columna, esperando 2 minutos antes de recoger el eluato por gravedad en un tubo de evaporación y permitiendo al finalizar el paso de aire a través de la columna. Posteriormente, se añadió 1 mL de MeOH a cada columna, repitiendo el proceso anterior. Cada eluato obtenido se evaporó a sequedad utilizando corriente de nitrógeno a 50  $^\circ\text{C}$ , y posteriormente se redisolvió el residuo desecado mediante 1 mL de mezcla  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{ACN}$  93/4/3 v/v (fase móvil). Finalmente, tras una

homogeneización completa, se procedió al filtrado a vial de HPLC utilizando filtros PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### **Determinación cromatográfica**

---

La separación cromatográfica fue realizada utilizando una columna C18 de fase inversa Waters Symmetry (Waters Corp., Milford, MA, USA) con las siguientes características: 150 mm de longitud, 2.1 mm diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

En la fase móvil, se utilizó una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{ACN}$  93/4/3 (v/v), desgasificándola previamente mediante el uso de ultrasonidos. El flujo de trabajo de fase móvil utilizado fue de 0,35 mL/min.

La columna cromatográfica se mantuvo a 25  $^{\circ}\text{C}$  al igual que la temperatura del inyector automático. El volumen de inyección utilizado fue de 60  $\mu\text{L}$  y fue inyectado en el sistema directamente.

La longitud de onda de absorción establecida para el detector ultravioleta por red de fotodiodos fue de 219 nm.

### **Calibración**

---

Para la cuantificación se preparó una curva de calibrado de 5 puntos, con concentraciones de 100, 250, 500, 750 y 1250 ng/mL en matraces aforados de 25 y utilizando patrón de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DON. En cada matraz se introdujo el volumen correspondiente del patrón de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , enrasando a volumen mediante mezcla  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{ACN}$  93/4/3 (v/v), homogeneizando y procediendo a su filtrado a vial de HPLC mediante el uso de jeringa y filtros PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ . La curva de calibrado fue ajustada mediante el método de regresión lineal por mínimos cuadrados, siendo los criterios de aceptación preestablecidos los siguientes:

- $R^2 \geq 0,99$
- CVFR  $\leq 20\%$ .

El cálculo de la concentración de DON en muestras ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), se realizó a partir del producto de la concentración obtenida en el sistema HPLC expresada en ng/mL, multiplicada por 4.

---

## 5. Determinación de fumonisinas mediante HPLC–FLD

---

La determinación de las fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en piensos se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC), acoplada a un FLD.

---

### Extracción y purificación

---

De cada muestra de pienso homogeneizada, se tomó 25 g añadiéndole 125 mL de solución de extracción de H<sub>2</sub>O/ MeOH/ACN 50/25/25 (v/v) (N<sup>o</sup>4, Tabla 9) y 2,5 g de cloruro sódico (N<sup>o</sup>4 Tabla 9). Las muestras se mezclaron durante 3 minutos mediante el uso de un homogeneizador Ultraturrax T25 seguido de agitación orbital durante 30 minutos y utilizando un agitador orbital Infors-HT Aerotron. El extracto obtenido se filtró utilizando filtros de papel Whatman n<sup>o</sup>4 (Whatman, Maidstone, UK), y se tomó 2,5 mL de cada extracto, vertiéndolo a un matraz aforado de 50 mL y enrasando a volumen con la disolución PBS. Finalmente, se volvieron a filtrar los extractos obtenidos, con filtros de papel Whatman GF/A (Whatman, Maidstone, UK).

La purificación se realizó utilizando columnas IAC FUMONIPREP (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia). Para ello, se tomaron 10 mL de extracto diluido con H<sub>2</sub>O, y utilizando una jeringa de 10 mL de plástico estéril, se hizo pasar el mismo a través de la columna a un flujo de 1-3 mL/min. Posteriormente, se lavó la columna utilizando 10 mL de disolución PBS a un flujo de 3-5 mL/min, permitiendo una vez finalizado, el paso de aire para su secado. Finalmente, se procedió a eluir el analito retenido en dos etapas. En un primer paso, se añadió 0,5 mL de MeOH a cada columna, esperando 2 minutos antes de recoger el eluato por gravedad en un tubo de evaporación y permitiendo al finalizar el paso de aire a través de la columna. Posteriormente, se añadió 0,5 mL de MeOH a cada columna, repitiendo el proceso anterior. Finalmente, se añadió 1 mL de H<sub>2</sub>O a cada tubo de evaporación.

---

### Derivatización pre-columna

---

De cada muestra, se tomaron 500 µL y se vertieron a tubo de evaporación, añadiendo 500 µL de la disolución de derivatización para fumonisinas (sección 1), homogeneizándose cuidadosamente. Transcurridos al menos 4 minutos, se procedió a su filtración a vial de HPLC, utilizando filtros PTFE de 0,45 µm.

---

## Determinación cromatográfica

---

La separación cromatográfica fue realizada utilizando una columna C18 de fase inversa Waters Symmetry (Waters Corp., Milford, MA, USA) con las siguientes características: 150 mm de longitud, 2,1 mm diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

En la fase móvil, se utilizó una mezcla de MeOH y la disolución 0,1M de dihidrógeno fosfato sódico (sección 1), con la proporción 75/25 (v/v) y ajustándola a pH=3,35 con ácido orto-fosfórico 85%. Previamente a su uso, fue desgasificada mediante el uso de ultrasonidos. El flujo de trabajo de fase móvil utilizado fue de 0,35 mL/min.

La columna cromatográfica se mantuvo a 25 °C, al igual que la temperatura del inyector automático. El volumen de inyección utilizado fue de 60  $\mu\text{L}$  y fue inyectado en el sistema directamente.

El FLD fue programado con una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) de 335 nm y una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) de 440 nm.

---

## Calibración

---

Para la cuantificación se preparó una curva de calibrado de 5 puntos, con concentraciones de 30, 75, 150, 375 y 750 ng/mL para FB1 y de 10, 25, 50, 125 y 250 ng/mL para FB2, utilizando el patrón conjunto de 100  $\mu\text{g/mL}$  de fumonisinas (75  $\mu\text{g/mL}$  FB1 y 25  $\mu\text{g/mL}$  de FB2) en matraces aforados de 25. En cada matraz se introdujo el volumen correspondiente del patrón de 100  $\mu\text{g/mL}$  (10, 25, 50, 125 y 250  $\mu\text{L}$  respectivamente), procediendo a su derivatización pre-columna y filtrando a vial de HPLC mediante el uso de jeringas y filtros PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Las curvas de calibrado utilizadas para FB1 y FB2 fueron ajustadas mediante el método de regresión lineal por mínimos cuadrados, siendo los criterios de aceptación preestablecidos los siguientes:

- $R^2 \geq 0,99$
- CVFR  $\leq 20\%$ .

El cálculo de la concentración de FB1 o FB2 en muestras ( $\mu\text{g/kg}$ ), se realizó a partir del producto de la concentración obtenida en el sistema HPLC expresada en ng/mL, multiplicada por 20.

---

## 6. Determinación de toxinas T-2 y HT-2 mediante HPLC-FLD

---

La determinación de toxinas T-2 y HT-2 en piensos se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC), acoplada a un FLD.

---

### Extracción y purificación

---

De cada muestra de pienso homogeneizada, se tomó 25 g añadiéndole 100 mL de solución de extracción (Nº5, Tabla 9) y 1 g de NaCl. Las muestras se mezclaron durante 3 minutos mediante el uso de un homogeneizador Ultraturax T25 y posteriormente se agitaron durante 30 minutos, utilizando un agitador orbital Infors-HT Aerotron. El extracto se filtró utilizando filtros de microfibra de vidrio Whatman GF/A (Whatman, Maidstone, UK), y se tomó 10 mL, vertiéndolo a un matraz aforado de 50 mL y enrasando a volumen con H<sub>2</sub>O, volviéndose a filtrar con filtros de papel Whatman GF/A.

La purificación se realizó utilizando columnas IAC EASI-EXTRACT T-2 y HT-2 (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia). Para ello, se tomaron 10 mL de extracto diluido con H<sub>2</sub>O, y utilizando una jeringa de 10 mL de plástico estéril, se hizo pasar el mismo a través de la columna a un flujo de 1-3 mL/min. Posteriormente, se lavó la columna utilizando 20 mL de H<sub>2</sub>O a un flujo de 3-5 mL/min, permitiendo una vez finalizado, el paso de aire para su secado. Finalmente, se procedió a eluir el analito retenido en dos etapas. En un primer paso, se añadió 1,5 mL de MeOH a cada columna, esperando 2 minutos antes de recoger el eluato por gravedad en un tubo de evaporación, permitiendo al finalizar el paso de aire a través de la columna. Posteriormente, se añadió 1 mL de MeOH a cada columna, repitiendo el proceso indicado anteriormente.

---

### Derivatización pre-columna

---

Cada eluato se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno a 50 °C. Al residuo desecado se le adicionó 50 µL de las disoluciones de 300 y 325 µg/mL de 1-AN y DMAP respectivamente, homogeneizando cuidadosamente, e introduciendo inmediatamente los tubos de evaporación en un baño a 50 °C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se procedió a enfriar los tubos de evaporación mediante baño de H<sub>2</sub>O con hielo durante 15 minutos, y a continuación, a una segunda evaporación a sequedad con corriente de nitrógeno a 50 °C. Finalizada esta, se redisolvió el residuo con 1 mL de una disolución ACN/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v) y se procedió a su filtrado a vial de HPLC utilizando filtros de PTFE de 0,45 µm.

---

### Determinación cromatográfica

La separación cromatográfica fue realizada utilizando una columna Phenyl-Hexyl Luna® (Phenomenex, USA), con las siguientes características: 150 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

En la fase móvil, se utilizó una variación de una mezcla de disolventes con respecto al tiempo (gradiente de fase móvil), combinando ACN y H<sub>2</sub>O con un flujo de trabajo 0,35 mL/min (Tabla 10), y manteniendo segmentos de gradiente lineales (curva 6). El volumen de inyección utilizado fue de 30  $\mu\text{L}$  y fue inyectado en el sistema directamente.

**Tabla 10.** Programa de gradiente utilizado en la fase móvil para la determinación de T-2 y HT-2 por HPLC-FLD

Tiempo	%A	%B	Curva
0	70	30	6
5	70	30	6
14	85	15	6
24	85	15	6
27	100	0	6
32	100	0	6
34	70	30	6
37	70	30	6

El FLD fue programado con una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) de 381 nm y una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) de 470 nm.

### Calibración

Para la cuantificación se preparó una curva de calibrado de 5 puntos, con concentraciones de 60, 100, 250, 500 y 750 ng/mL, tanto para T2 como para HT2, utilizando el patrón de 100  $\mu\text{g/mL}$  de T2 y HT2 y matraces aforados de 25 (para los patrones de 60 y 100 ng/mL) y 10 mL. En cada matraz se introdujo el volumen correspondiente del patrón de 100  $\mu\text{g/mL}$ , procediendo a su derivatización pre-columna. Finalmente se aforó a volumen con mezcla ACN/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v), mezclando para conseguir una completa homogeneización, y filtrando a vial de HPLC mediante el uso de jeringas y filtros PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ . Las curvas de calibrado utilizadas para T2 y HT-2 fueron ajustadas mediante el método de



regresión lineal por mínimos cuadrados, siendo los criterios de aceptación preestablecidos los siguientes:

- $R^2 \geq 0,99$
- CVFR  $\leq 20\%$ .

El cálculo de la concentración de T2 o HT2 en muestras ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), se realizó a partir del producto de la concentración obtenida en el sistema HPLC expresada en  $\text{ng}/\text{mL}$ , multiplicada por 2.

---

## 2. Optimización de la metodología analítica para la determinación de las principales micotoxinas legisladas a nivel europeo y de otras micotoxinas de interés toxicológico mediante UHPLC-MS/MS

---

Aunque los métodos tradicionales para la determinación de micotoxinas por HPLC son actualmente la metodología rutinaria de referencia para la determinación de micotoxinas con estructura química similar, gracias a su sensibilidad y reproducibilidad, han demostrado sus limitaciones para el análisis simultáneo de varias micotoxinas de diferente naturaleza química, además del coste de mantenimiento que implica el uso de columnas de inmunoafinidad o el coste laboral en tiempo de los procesos de preparación de las muestras necesarios.

La tendencia actual es el reemplazo de esta metodología por procedimientos que utilicen una fase extractiva lo más sencilla posible. En el caso del análisis de micotoxinas, una de las posibles metodologías analíticas a emplear es la utilización de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS).

Para la consecución del objetivo 2, el material y métodos utilizados son los que se describen a continuación.

### Patrones, reactivos e instrumentación

---

Los patrones sólidos utilizados, de aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), diacetoxiscirpenol (DAS), ocratoxina A (OTA), fusareona X (FUSX), fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) y B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) y toxinas T-2 (T-2) y HT-2 (HT-2), fueron adquiridos a Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España) y mantenidos en oscuridad a -18 °C.

En relación a los reactivos utilizados, el H<sub>2</sub>O pura se obtuvo a través de un aparato Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA), mientras que el MeOH y ACN, todos con grado de pureza HPLC, fueron adquiridos a Panreac (Castellar del Vallés, España) y J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). También fueron adquiridos formiato amónico y ácido fórmico, que fueron adquiridos a Panreac (Castellar del Vallés, España), y su grado de calidad fue para análisis.

En relación a las **disoluciones patrón**, se prepararon las siguientes:

Disoluciones patrón individuales de 10 µg/mL para AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, OTA y ZEA, y de 100 µg/mL para DON, DAS, T-2, HT-2, FUSX, 3-ADON, 15-ADON, FB1 y FB2, utilizando como disolvente una mezcla de ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) y asignándole una caducidad de 6 meses.

A partir de las disoluciones patrón individuales, se preparó una disolución patrón multimitoxinas, utilizando una mezcla de ACN/H<sub>2</sub>O 75/25 (v/v) y asignándole una caducidad de 3 meses. Sus concentraciones fueron las indicadas en la Tabla 11. Las disoluciones se almacenaron en oscuridad a -18°C.

**Tabla 11.** Concentraciones de las micotoxinas en la disolución patrón multimitoxinas.

Micotoxina	Concentración (µg/l)
AFB1	200
AFB2	200
AFG1	200
AFG2	200
ZEA	5000
OTA	2500
DON	25000
FB1	37500
FB2	12500
T2	2500
HT2	2500
3-ADON	10000
15-ADON	10000
DAS	10000
FUSX	10000

A nivel **instrumental**, los análisis cromatográficos se realizaron utilizando un sistema UHPLC Waters Acquity™ (Waters Corp., Milford, MA, USA) equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un desgasificador en línea, un muestreador automático y un horno para columnas cromatográficas. El detector utilizado fue un espectrómetro de masas Waters Acquity TQD® equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI). Los datos fueron procesados utilizando como software Masslynx 4.1™ (Waters Corp., Milford, MA, EUA).

## Extracción y purificación

De cada muestra de pienso homogeneizada, se tomó 2 g en tubo de centrifuga, añadiéndole 8 mL de una disolución de extracción compuesta por una mezcla de ACN/H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 80/19/1 (v/v), y se agitaron durante 60 minutos mediante agitación orbital (Infors-HT Aerotron, Bottminghen, Switzerland). Después, los extractos fueron centrifugados a 5500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se filtró 2 mL de sobrenadante de cada muestra a vial de HPLC, utilizando filtros de 0,22 µm PVDF.

## Determinación cromatográfica

La determinación cromatográfica se realizó mediante cromatografía de ultra alta resolución (UHPLC), utilizando una columna Waters BEH C18 Acquity™ UPLC™ (Waters Corp., Manchester, UK) con las siguientes características: 50 mm de longitud, 2,1 mm de diámetro interno y 1,7 µm de tamaño de partícula.

En relación a la fase móvil, se utilizó un gradiente programado combinando dos disoluciones:

- A. Disolución acuosa con 0,15 mmol/L de formiato amónico y 0,1% (v/v) de ácido fórmico.
- B. MeOH

El flujo de fase móvil fue establecido en 0,35 mL/min. En la Tabla 12 se indican las condiciones específicas del mencionado gradiente. El volumen de inyección utilizado fue establecido en 30 µl, y fue inyectado directamente (sin fraccionar o “split”). La temperatura de la columna cromatográfica fue mantenida en 30 °C, y la del muestreador, en 15 °C.

**Tabla 12.** Programa de gradiente utilizado en la fase móvil de UHPLC-MS/MS

Tiempo (min)	%A	%B	Curva
0	95	5	6
2	80	20	6
13	0	100	6
15	0	100	6
15.1	95	5	6
17	95	5	6

**Tabla 13.** Iones precursores, parámetros MS/MS optimizados e iones producto utilizados. \* Relación m/z correspondiente al ion cuantificador.

Micotoxina	Formula molecular	Masa molecular exacta (Da)	Ion precursor (m/z) (Da)	Iones producto (m/z) (Da)	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)
DON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	296,126	297,0	[M + H] <sup>+</sup>	249,0*	15
					231,0	20
3-ADON/ 15-ADON	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	338,137	339,0	[M + H] <sup>+</sup>	231,0*	15
					279,0	35
AFBI	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312,063	313,0	[M + H] <sup>+</sup>	285,0*	70
					241,0	70
AFB2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,079	315,0	[M + H] <sup>+</sup>	259,0*	70
					287,0	70
AFGI	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,058	329,0	[M + H] <sup>+</sup>	243,0*	70
					283,0	70
AFG2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,074	315,0	[M + H] <sup>+</sup>	245,0*	70
					285,0	70
DAS	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	366,138	384,0	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	307,0*	20
					247,0	20
ZEA	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	318,147	319,0	[M + H] <sup>+</sup>	187,0*	20
					185,0	20
OTA	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	403,082	404,0	[M + H] <sup>+</sup>	239,0*	25
					221,0	40
HT2	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	424,21	442,0	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	263,0*	20
					215,0	20
T2	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	414,227	484,0	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	305,0*	20
					245,0	20
FBI	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	705,394	706,0	[M + H] <sup>+</sup>	336,0*	50
					318,0	50
FB2	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub>	721,388	722,5	[M + H] <sup>+</sup>	334,0*	50
					352,0	50
FUSX	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	354,131	355,0	[M + H] <sup>+</sup>	247,0*	40
					229,0	40

\* Ion cuantificador

Respecto a la adquisición de espectros de masas realizada, esta fue obtenida en modo de monitorización de reacción múltiple o MRM (“multiple reaction monitoring”), utilizando una fuente de ionización por electrospray positiva (ESI+), en las siguientes condiciones: voltaje capilar (capillary voltaje) de 3 kV; temperatura de la fuente y de desolvatación de 120 °C y 300 °C respectivamente,

y como gas utilizado en la interfaz ESI, nitrógeno de alta pureza a un flujo de trabajo de 35 L/h.

Para cada micotoxina, se seleccionaron dos transiciones, una a efectos de realizar la cuantificación posterior (“quantitative daughter ion”), y una segunda seleccionada para realizar la confirmación positiva del analito (“qualifier daughter ion”). Los parámetros de relación carga/masa ( $m/z$ ), y los parámetros de colisión tanto de los iones precursores (o “padres”) y de los iones producto (o “hijas”), de los 14 analitos incluidos en el análisis se indican en la Tabla 13.

---

### Calibración

---

Para la cuantificación se preparó una curva de calibrado de 5 puntos, tomando 25, 25, 20 y 50  $\mu\text{L}$  del patrón de trabajo multimicotoxinas y vertiéndolos en matraces de 10 y 5 mL (los dos primeros volúmenes), y en matraces de 2 mL el resto. Se aforó a volumen utilizando extractos obtenidos de piensos exentos de micotoxinas y filtrando, junto con el extracto utilizado para aforar, a vial de HPLC mediante el uso de jeringas y filtros PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Los criterios de aceptación preestablecidos de las curvas de calibrado fueron:

- $R^2 \geq 0,99$
- CVFR  $\leq 20\%$ .

El cálculo de la concentración para cada micotoxina en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), se realizó a partir del producto de la concentración obtenida en el sistema UHPLC-MS/MS expresada en  $\text{ng}/\text{mL}$  multiplicada por 4. El límite de detección (LOD), el de cuantificación (LOQ), y el rango de cuantificación lineal en muestra se indican en la Tabla 14.

**Tabla 14.** LOD, LOQ y rango de cuantificación lineal para cada micotoxina

Micotoxinas	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Rango de cuantificación lineal ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
AFB1	1	2	LOD-20
AFB2	2	4	LOD-20
AFG1	2	4	LOD-20
AFG2	2	4	LOD-20
ZEA	25	50	LOD-500
OTA	12,5	25	LOD-250
DON	125	250	LOD-2500
FBI	187,5	375	LOD-3750
FB2	62,5	125	LOD-1250
T-2	12,5	25	LOD-250
HT-2	12,5	25	LOD-250
3-ADON + 15-ADON	50	100	LOD-1000
DAS	25	50	LOD-500
FUSX	50	100	LOD-500

---

### 3. Optimización de la metodología para la identificación de otras micotoxinas de interés presentes en piensos mediante UHPLC-QTOF-MS

---

En los últimos años, la espectrometría de tiempo de vuelo (TOF), acoplada a sistemas de cromatografía, ha demostrado ser una buena metodología analítica para la identificación de analitos no establecidos a priori gracias a una combinación entre la exactitud en la medida de su espectro de masas y su alta capacidad de resolución. Otra ventaja es que permite el análisis de forma retrospectiva, a diferencia de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), en la que se deben definir los analitos objetivo previamente al análisis.

Los espectrómetros cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF-MS), son espectrómetros de tiempo de vuelo híbridos, con capacidad para el análisis MS/MS, es decir, que combinan las ventajas de los espectrómetros de masas TOF, con la información proporcionada por los espectros de masas de los iones precursores y producto obtenidos, mejorando su capacidad para la identificación de compuestos desconocidos.

Para la consecución del tercer objetivo, se combinó el método UHPLC desarrollado en el apartado anterior con un espectrómetro de masas QTOF-MS, con el fin del estudio de la presencia de otras micotoxinas en muestras de piensos contaminados por micotoxinas legisladas dentro de la UE, previamente analizadas tanto por HPLC como por UHPLC-MS/MS, así como para obtener una segunda confirmación de su presencia. Para ello, se utilizaron el material y métodos siguientes.

#### Patrones, reactivos e instrumentación

---

Tanto los reactivos, como los patrones utilizados en el desarrollo y optimización del método UHPLC-QTOF-MS, fueron los mismos que los utilizados en el apartado referido al método UHPLC-MS/MS.

A nivel **instrumental**, los análisis cromatográficos se realizaron acoplado el sistema UHPLC Waters Acquity™ (Waters Corp., Milford, MA, USA) descrito para el método UHPLC-MS/MS a un detector QTOF-MS Triple TOF 5600 (AB SCIEX, Toronto, ON, Canada), que contenía acoplados en tándem, un cuadrupolo y un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal, y con una fuente de ionización por electrospray (ESI). La adquisición de datos y su



procesado fue realizado utilizando como software Analyst TF 1.5, PeakView™ 1.2 y LibraryView™ (AB Sciex, Toronto, Canada).

### **Determinación cromatográfica**

Las muestras inyectadas fueron las utilizadas y analizadas previamente mediante UHPLC-MS/MS.

La determinación cromatográfica se realizó mediante cromatografía de ultra alta resolución (UHPLC), utilizando una columna Waters BEH C18 Acquity™ UPLC™ (Waters Corp., Manchester, UK) con las siguientes características: 50 mm de longitud, 2,1 mm de diámetro interno y 1,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, e idéntica a la utilizada en el método UHPLC-MS/MS.

En relación a la fase móvil, se utilizó un gradiente programado combinando las disoluciones indicadas para el método UHPLC-MS/MS, pero con variaciones:

- A. Disolución acuosa con 0,15 mmol/L de formiato amónico y 0,1% (v/v) de ácido fórmico.
- B. MeOH

El flujo de fase móvil fue establecido en 0,3 mL/min. En la Tabla 15 se indican las condiciones específicas del mencionado gradiente. El volumen de inyección utilizado fue establecido de 5  $\mu\text{l}$ , y fue inyectado directamente (sin fraccionar o "split"). La temperatura de la columna cromatográfica fue mantenida en 30 °C, y la del muestreador, en 15 °C.

En relación a la adquisición de espectros de masas realizada, esta se efectuó en modo full scan IDA ("information dependent acquisition"), combinando barridos de masas realizado por la parte TOF-MS del detector, con la obtención de espectros de fragmentación en modo MS/MS. Este modo de trabajo es posible gracias a la capacidad que tiene el detector QTOF-MS de realizar mediciones de masas moleculares tanto en modo MS, como MS/MS.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, en cada barrido realizado en modo IDA y para un tiempo de retención determinado, se generaron una lista de picos de iones presentes en cada espectro denominado XIC ("extracted ion chromatogram"). Con la información obtenida de las masas moleculares medidas y los espectros MS/MS obtenidos, se puede realizar una comparación con los valores de una base de datos para la identificación de compuestos.

**Tabla 15.** Programa de gradiente utilizado en la fase móvil para el método UHPLC QTOF-MS.

Tiempo (min)	%A	%B	Curva
0	95	5	6
6	50	50	6
10	5	95	6
25	5	95	6
25.1	95	5	6
28	95	5	6

Las condiciones seleccionadas para el modo IDA fueron las siguientes:

- En modo MS, el intervalo de selección de iones establecido fue de 100 a 2000 m/z, utilizando modo centroide y una tolerancia en la medida de la masa ("mass tolerance") de 10 mDa, así como un umbral de intensidad para cada pico cromatográfico ("intensity threshold") de 100 cps.
- En modo MS/MS, se utilizó una energía de colisión común de 35 eV en un intervalo de trabajo de selección de iones precursores establecido entre 50 y 500 m/z, y utilizando un tiempo de acumulación de 75 ms, seleccionando un máximo de 3 iones precursores para su fragmentación en cada ciclo.
- El tiempo total para cada ciclo de lectura fue de 1,1 s, siendo de 250 ms para el modo MS.

Cada muestra de pienso seleccionada para su análisis por UHPLC-QTOF-MS fue inyectada y analizada dos veces utilizando ionización por electrospray en modo positivo (ESI+) y una en modo negativo (ESI-). Los parámetros correspondientes a la fuente de ionización fueron: presión del gas 1 y gas 2 de la fuente de ionización 50 psi, presión del Curtain Gas™ (N<sub>2</sub>) 25 psi, la temperatura del gas del calentador en la sonda TurbolonSpray® (TEM) 450°C y el voltaje aplicado al pulverizador en la sonda TurbolonSpray® ("IonSpray Voltage Floating", ISVF) 5500 V.

En modo ESI+, se seleccionaron las especies ionizadas [M+H]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> mientras que en modo ESI-, se seleccionó la especie [M-H]<sup>-</sup>. Es decir, para cada posible analito con masa molecular M ("base mass") se determinó la posible presencia de las 4 formas ionizadas del mismo a partir de la medición de

su correspondiente masa molecular (modo MS), y a partir de ellas, el correspondiente espectro de masas de fragmentación (modo MS/MS).

Para la identificación de posibles micotoxinas presentes, se programó la realización de un cribado automático de los datos obtenidos mediante la utilización del software PeakView™ y LibraryView™ (AB Sciex, Toronto, Canada), combinado con la utilización de la biblioteca de espectros de masas para micotoxinas Mycotoxin Spectral Library v1.1 (AB Sciex, Toronto, Canada), que incluía las siguientes características:

- Los datos de espectros de masas de 245 micotoxinas y otros metabolitos fúngicos y bacterianos, con tres transiciones para cada compuesto, y obtenidos tanto en modo de ionización positivo como negativo.
- 236 espectros completos MS/MS de los compuestos anteriores, adquiridos con tres energías de colisión (20, 35 y 50 eV) y uno representativo con la suma de todos.

Los criterios seleccionados y establecidos para la identificación positiva automatizada de analitos fueron:

- 1) La diferencia entre la masa teórica y real medida (error másico, "mass error") <5 ppm.
- 2) Diferencias entre tiempos de retención  $\leq 0,3$  min
- 3) Coincidencia del espectro MS/MS obtenido con la base de datos de la librería ("Purityscore") > 50.
- 4) Error en la coincidencia con el patrón isotópico de la base de datos ("Isotope pattern") < 20%.
- 5) Buena resolución de los picos cromatográficos obtenidos.

---

## **4. Caracterización de la microbiota productora de micotoxinas contaminante de las muestras de piensos**

---

Tal como se ha descrito en la introducción de esta Tesis Doctoral, la contaminación por micotoxinas en un sustrato puede ser muy heterogénea, y dificulta la realización de toma de muestras representativas. Varios autores (Gil-Serna et al., 2013; Magan, 2006; Mateo et al., 2011; Niessen, 2007) han puesto de manifiesto, que la identificación en muestras, de especies productoras de micotoxinas, puede ser un buen indicador de la presencia de determinadas micotoxinas en tales muestras.

Por ello, y con el objetivo de realizar un estudio del peligro potencial de la presencia de micotoxinas en las muestras de piensos analizadas en el objetivo 4 de la Tesis se procedió a la evaluación de la microbiota potencialmente productora de micotoxinas en esas muestras mediante recuento en placa de colonias de posibles especies fúngicas productoras de micotoxinas, identificación microscópica de estos hongos y aplicación de técnicas de PCR especie específicas.

### **4.1. Identificación mediante cultivo en placa de posibles especies fúngicas productoras de micotoxinas**

---

#### **Reactivos, materiales y medios de cultivo**

---

En relación a los reactivos utilizados, el H<sub>2</sub>O pura se obtuvo a través de un aparato Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA), mientras que la glucosa y el agar fueron adquiridos a Panreac (Castellar del Vallés, España), etanol (grado LC) y cloruro sódico fueron adquiridos a J.T. Baker (Deventer, Holanda) y diclorán (2,4-dicloro-4-nitroanilina) fue adquirido a Tecnidex (Paterna, España).

Se prepararon dos medios de cultivo:

a) Patata glucosa agar (PDA), que se preparó hirviendo 300 g de patata fresca, previamente pelada y troceada, durante una hora en H<sub>2</sub>O destilada. El caldo obtenido fue filtrado a Erlenmeyer, añadiéndole H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar en volumen 1 litro. Posteriormente, se añadió 2% p/v de agar y 1% p/v de glucosa, y se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 115 °C.

b) Patata diclorán agar: Se preparó siguiendo la sistemática del apartado anterior, pero posteriormente a su esterilización en autoclave, se dejó enfriar el medio hasta alcanzar 45-50 °C y se le añadió 1 mL de una disolución de diclorán al 0,2% p/v en etanol.

### **Identificación y recuento de hongos productores de micotoxinas**

---

De cada muestra de pienso previamente homogeneizado, se prepararon diluciones decimales seriadas en solución salina esteril. Se tomaron 0,5 g, y se vertieron en tubo de ensayo, vertiéndole a este posteriormente 4,5 ml de agua con un 0,9 % de cloruro sódico (p/v), y se homogeneizó cuidadosamente. A partir de la misma se realizaron diluciones 1 a 10 utilizando agua con un 0.9% de cloruro sódico (p/v).

De cada una de las diluciones se tomaron 0,2 mL y se transfirieron a la superficie de placas de Petri conteniendo medio PDA y medio PDA con diclorán, tras su reparto usando el asa acodada esteril. Las placas se incubaron durante 5 días a 25°C. En este periodo de tiempo, se realizó un seguimiento diario de la evolución del crecimiento fúngico, y al final del periodo, se procedió a la identificación de las colonias en base a su morfología macroscópica siguiendo las claves para cada género (Barnett y Hunter, 1972; Klich y Pitt 1988; Pitt, 1991; Pitt y Hocking, 2009b), y al recuento de colonias para el cálculo de UCF/g.

## **4.2. Identificación mediante PCR de especies fúngicas descritas como productoras de micotoxinas en las muestras de piensos**

---

Los principales productores de micotoxinas son hongos del género *Aspergillus* y *Fusarium*. Siguiendo los protocolos descritos por Mateo et al. (2011) y referencias asociadas, y las de *Fusarium* spp. previamente descrita por Gil-Serna et al. (2013) y referencias asociadas, se procedió a la identificación por PCR de las especies fúngicas.

### **Extracción de DNA**

---

La extracción de DNA se realizó mediante el equipo DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, España) según las instrucciones del fabricante, obteniendo DNA genómico a partir de 200 mg de pienso homogeneizado (sin incubación previa). Además, las muestras fueron analizadas después de 24 y 48 h de incubación antes de la extracción del DNA. Para ello se colocó 1 g de pienso

molido en frasco Erlenmeyer conteniendo 50 ml de caldo Sabouraud-Chloramphenicol (Pronadisa, España). Los frascos se incubaron a  $28\pm 1$  °C en agitación, utilizando un agitador orbital (140 rpm). Una vez finalizado el periodo de incubación (24 ó 48 h) el medio fue filtrado, congelado con nitrógeno líquido y posteriormente pulverizado usando un mortero. Seguidamente se realizó la extracción de DNA. Todas las extracciones se realizaron por triplicado. La concentración de DNA obtenido fue determinada usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA).

---

### Detección específica por PCR

---

Los ensayos específicos de PCR se realizaron utilizando el equipo Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando volúmenes de 25  $\mu$ L que contenían 200 ng de ADN molde, 1  $\mu$ L de cada primer (20  $\mu$ M), 2,5  $\mu$ L de 10x PCR buffer, 1  $\mu$ L de cloruro magnésico ( $MgCl_2$ , 50 mM), 0,2  $\mu$ L de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 100 mM) y 0,15  $\mu$ L de Taq DNA polimerasa (5 U/ $\mu$ L), proporcionado por Biotools (Madrid, España).

La presencia de DNA fúngico se comprobó, en todas las muestras, usando primers universales 5.8S1/5.8S2 (Gil-Serna et al., 2009) y para la identificación de las especies productoras de micotoxinas en concreto, se aplicaron protocolos de PCR de especie específicos que fueron utilizados para detectar las principales especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas (sección *Liseola*) siguiendo la metodología descrita por Jurado et al. (2006) y Patiño et al. (2004), tricotecenos B y ZEA (sección *Discolor*) siguiendo la metodología descrita por Jurado et al., (2005) y las principales especies de *Aspergillus* productoras de: aflatoxinas (sección *Flavi*) siguiendo la metodología descrita por González-Salgado et al. (2008) y Sardiñas et al. (2010) y ocratoxina A (secciones *Nigri* y *Circumdati*) según la metodología descrita por González-Salgado et al. (2005) y Gil-Serna et al. (2009). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La elección de las especies fúngicas diana a identificar mediante protocolos de PCR en las muestras de piensos se realizó en base a los resultados obtenidos en los recuentos de esporas viables en placa, a la observación microscópica de los hongos crecidos en tales placas y diagnóstico tentativo de su identidad y a los resultados de presencia de micotoxinas concretas en las muestras de piensos analizadas en el objetivo 4.

# IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN







---

## **I. Optimización y validación de métodos cromatográficos para la determinación de las principales micotoxinas legisladas a nivel europeo en piensos mediante HPLC-FLD y HPLC-DAD**

---

Como se ha visto en la introducción, existe diferente metodología para la determinación de micotoxinas, entre las que destaca por su sensibilidad, robustez y reproducibilidad, el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), habitualmente asociada a detectores denominados “clásicos” como son los de fluorescencia (FLD) o ultravioleta con red de fotodiodos (DAD).

Estos métodos se basan habitualmente en el uso de una combinación de ACN, MeOH y H<sub>2</sub>O en la fase de extracción seguida del uso de cartuchos de extracción en fase sólida o columnas de inmovilización debido a que es necesario la eliminación o una reducción significativa de posibles interferentes presentes en la matriz, para que la cuantificación cromatográfica sea satisfactoria. Aunque dicha metodología es muy utilizada en matrices denominadas “simples” como pueden ser los cereales, su utilización en matrices complejas, como son los piensos, está mucho menos extendida. Por la propia composición de los piensos, pueden existir una gran variedad de interferentes que pueden afectar a la detección y determinación de las micotoxinas.

La actual legislación incluye requisitos muy estrictos con respecto a las concentraciones de micotoxinas en piensos y la tendencia en futuras revisiones de la misma, es que sean cada vez más cercanos a los niveles establecidos en alimentación humana.

Durante los últimos años, los equipos de HPLC acoplados a detectores de FLD o DAD han sufrido un importante abaratamiento, que los hacen accesibles a laboratorios de pequeño tamaño, como son los laboratorios de control de calidad de industrias, por lo que se ha podido generalizar su uso.

Por todo ello, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral, fue la optimización de métodos de ensayo, basados en HPLC-FLD o HPLC-DAD, para la determinación de las principales micotoxinas incluidas en la actual legislación sobre micotoxinas en piensos. Además, se establecieron como requisitos previos que los métodos fueran sensibles, robustos, reproducibles, económicamente viables para su utilización en laboratorios de rutina, y ajustados a los niveles de concentración establecidos en la legislación, y a los requisitos en cuanto a su funcionamiento, estipulados para los métodos de cuantificación aplicables en

---

alimentación humana, por el Reglamento N° 401/2006 (European Commission, 2006b).

## **I.1. Optimización y validación del método de cuantificación de aflatoxina BI por HPLC-FLD**

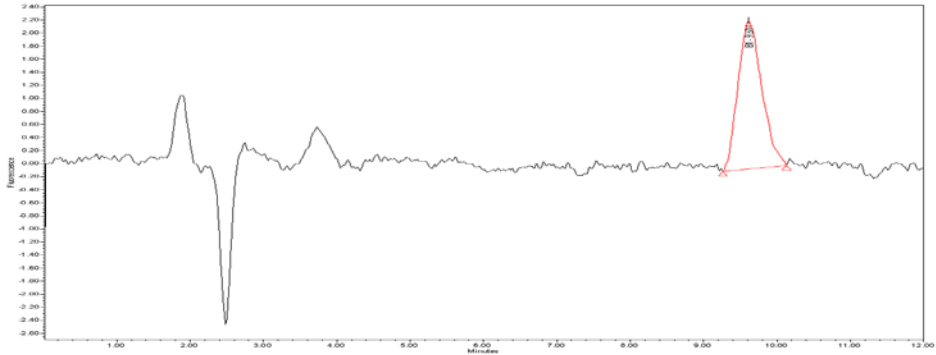
---

### **Optimización del método cromatográfico**

---

Existen numerosos métodos basados en cromatografía líquida para la determinación de aflatoxinas, siendo actualmente los más extendidos, los que utilizan una fase de purificación mediante el uso de columnas de inmunoafinidad y el uso de agentes derivatizantes (Papp et al., 2002). Tomando como punto de partida el trabajo realizado por varios autores (Muscarella et al., 2011; Papp et al., 2002; Simonella et al., 1987; Joerg Stroka et al., 2000; Jörg Stroka et al., 2000) , se procedió a la optimización de un método por HPLC-FLD para la cuantificación de AFB1 como se describe a continuación.

En primer lugar, se procedió a la elección de la columna cromatográfica y la fase móvil a utilizar en el método cromatográfico. La columna escogida (Waters Symmetry C<sub>18</sub> de fase inversa, 150 mm x 2,1 mm x 5 µm) fue seleccionada al proporcionar una buena resolución cromatográfica en la bibliografía (Papp et al., 2002), y por su bajo coste de adquisición. Para la optimización de la composición de la fase móvil se realizaron distintas pruebas, variando la proporción de H<sub>2</sub>O, MeOH y ACN en la misma, a un flujo de 0,35 mL/min, e inyectando un patrón de AFB1 de 50 ng/mL. Las combinaciones de disolventes utilizadas fueron H<sub>2</sub>O/MeOH (40/60, 45/55, 50/50, 60/40, 65/35 y 70/30 v/v) y H<sub>2</sub>O/MeOH/ACN (70/20/10, 60/30/10, 60/20/20, 50/40/10 y 50/30/20 v/v). El criterio para la selección de la composición de la fase móvil, fue la obtención de un pico cromatográfico con una buena resolución y dentro de un tiempo de análisis razonable para evitar la posible aparición de interferentes, el cual fue obtenido utilizando una fase móvil compuesta con H<sub>2</sub>O/MeOH 60/40 (v/v), y con un tiempo de retención de 8,9 min (Figura 27), fijándose el tiempo de análisis completo de cada inyección en 12 minutos.



**Figura 27.** Cromatograma de un patrón de AFB1 en el LOD (0,05 ng/mL)

Aunque las aflatoxinas tienen capacidad de luminiscencia fluorescente intrínseca, y son, por tanto, susceptibles de poder ser determinadas mediante el uso de detectores de fluorescencia, es necesario aumentar la misma químicamente, especialmente para AFB1 y AFG1, para poder obtener menores límites de detección en la detección cromatográfica y poder determinar los niveles de concentración de aflatoxinas establecidos en la legislación actual. Se han descrito varios agentes derivatizantes para la determinación por cromatografía líquida de aflatoxinas (Muscarella et al., 2011; Papp et al., 2002; Simonella et al., 1987) que se pueden clasificar en función de si la reacción de derivatización se realiza antes de su separación cromatográfica en la columna (pre-columna), o después (post-columna). En derivatizaciones de AFB1 precolumna, el agente derivatizante más habitual es el ácido trifluoroacético (TFA), con el objetivo de obtener los correspondientes productos hemiacetales de las aflatoxinas (Simonella et al., 1987), mientras que en la derivatización post-columna habitualmente se utiliza como agentes de derivatización bromo o yodo para la formación de los correspondientes derivados bromados o yodados de aflatoxinas (Kok, 1994; Manetta et al., 2005).

Dado que, no existen diferencias sustanciales en relación con el nivel de sensibilidad proporcionada por los agentes derivatizantes (Kok, 1994), se optó, en consonancia con el objetivo de esta Tesis Doctoral, por el uso como agente derivatizante una solución de yodo, al ser este, económico, de fácil uso y proporcionar una excelente capacidad derivatizante. Para su uso se optó por la utilización durante la derivatización post-columna, de una bomba para líquidos y de un horno de derivatización, siendo ambos componentes de bajo coste de adquisición y de mantenimiento. Asimismo, para conseguir una completa homogeneización del agente derivatizante con la fase móvil antes de llegar el conjunto al FLD, se realizaron distintas pruebas, variando el flujo de caudal de la bomba encargada de impulsar la disolución de agente derivatizante al horno de

derivatización (0,1-0,5 mL/min), y la temperatura de trabajo del mismo (60-90 °C), comprobándose que con un flujo de fase móvil de 0,35 mL/min, la derivatización era completa utilizando una temperatura de 70 °C y un flujo de caudal de agente derivatizante de 0,1 mL/min.

La selección de la disolución de extracción a utilizar en las muestras se realizó en función de la solubilidad de la AFB1, y la posible presencia de interferentes que pudieran afectar en el uso de columnas IAC a utilizar en la purificación. Siguiendo las instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante de las columnas IAC AFLAPREP seleccionadas, se realizaron pruebas en paralelo, utilizando combinaciones de MeOH y H<sub>2</sub>O (60/40, 50/50, 40/30 v/v) y acetona/ H<sub>2</sub>O (85/15, 70/30 y 60/40 v/v) para la extracción y filtrando posteriormente estos con filtros de microfibras de vidrio Whatman GF/A (Whatman, Maidstone, UK), comprobándose que la combinación acetona/H<sub>2</sub>O 85/15 (v/v) proporcionaba una buena disolución de la posible AFB1 presente en el pienso, y un tiempo de filtración menor.

Los extractos a utilizar en el uso habitual de columnas de inmunoafinidad deben tener los mínimos interferentes posibles que puedan afectar a la interacción de los anticuerpos específicos que se encuentran en el soporte físico (relleno) de las mismas. Por ello, se procedió a realizar distintas pruebas de filtración mediante el uso de filtros de fibra de vidrio GF/A, y de papel n<sup>o</sup>1, n<sup>o</sup>2 y n<sup>o</sup>5 de Whatman (Whatman, Maidstone, UK) con el fin de obtener el extracto con el menor número posible de interferentes. Se comprobó que, mediante la utilización de la combinación acetona/H<sub>2</sub>O 85/15 v/v seleccionada previamente, la filtración realizada con filtros de papel Whatman n<sup>o</sup>5, los más selectivos de los utilizados en las pruebas realizadas, se llevaba a cabo completamente la filtración en un tiempo de 5 minutos. Para evitar la posible desnaturalización de los anticuerpos presentes en el relleno de las columnas IAC por la presencia de acetona en el extracto, se introdujo una dilución previa del mismo (5 mL, dilución 1/20), con disolución tampón PBS.

En la determinación de aflatoxinas por HPLC en otras matrices como cereales, habitualmente se utilizan columnas IAC y cartuchos SPE para eliminar, en la medida de lo posible, cualquier componente presente en la muestra que pudiera interferir en su cuantificación cromatográfica (Gilbert y Anklam, 2002; Papp et al., 2002; Joerg Stroka et al., 2000). Las columnas IAC son el método de purificación preferido porque suelen tener mejor rendimiento cuantitativo, especialmente en los límites de cuantificación (LOQ) a pesar de las desventajas que presentan, entre las que destacan su elevado coste económico, y el tiempo y

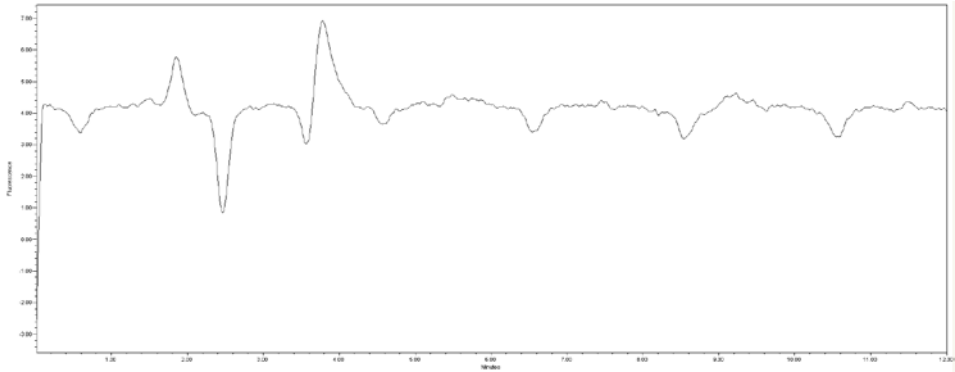
pericia necesarios durante todo el proceso de purificación (Scott y Trucksess, 1997; Jörg Stroka et al., 2000).

Por ello, en la elección del método de purificación a utilizar, se seleccionó el uso de columnas IAC AFLAPREP (R-Biopharm Rhone Ltd) por su buena capacidad de retención y bajo límite de detección (LOD: AFB1=0,031 ng/mL, AFB2=0,015 ng/mL, AFG1=0,015 ng/mL, AFG2=0,007 ng/mL). Para minimizar el tiempo empleado durante la purificación de los extractos, pero con el fin de asegurar la completa retención de AFB1 por los anticuerpos presentes en la columna IAC, se optimizó el flujo de paso del extracto a través de las mismas, siendo establecido como óptimo 2-3 mL/min. También se modificó el proceso de elución de la AFB1 de las columnas IAC sugerido por el fabricante con el fin de asegurar la completa separación de la AFB1 de los anticuerpos, realizándose el mismo en dos fases (0,5 mL y 1,5 mL de MeOH), y permitiendo el paso de aire por la columna IAC entre ambas.

### **Validación del método cromatográfico**

Para la validación del método se seleccionaron muestras de piensos (porcino, avícola y ovino) previamente analizados (denominados en adelante como “piensos blancos”), en los que se comprobó ausencia de señal cromatográfica en el tiempo de retención de AFB1 ( $t_R=8,9$  min), determinándose a continuación el límite de detección y cuantificación del método.

El LOD se estableció siguiendo como criterio que fuera como mínimo 3,3 veces el cociente entre la desviación estándar de la respuesta, definida como la señal cromatográfica obtenida para un pienso blanco en la zona del tiempo de retención de AFB1 ( $t_R= 8,9$  min), y calculada a partir de la curva de calibrado obtenida para AFB1 (Miller y Miller, 1993). Para ello, se procedió a preparar una curva de calibrado, utilizando como eluyente una mezcla de los extractos finales obtenidos en la extracción de los piensos blancos e inyectados en el sistema HPLC (Figura 28). A partir de la desviación estándar de los residuos obtenida y de la pendiente de la curva, se pudo establecer, como punto de partida, un LOD de 0,020 ng/mL para AFB1 (0,4  $\mu\text{g/kg}$  en muestra). El criterio establecido para determinar el LOQ del método, fue que este fuera como mínimo 3 veces el LOD determinado, y que tuvo un valor de 0,06 ng/mL para AFB1 (1,2  $\mu\text{g/kg}$  en muestra). Se comprobó que la relación señal/ruido (S/N) para el LOD y LOQ era superior a 3:1 y 10:1, respectivamente (ICH, 2005).

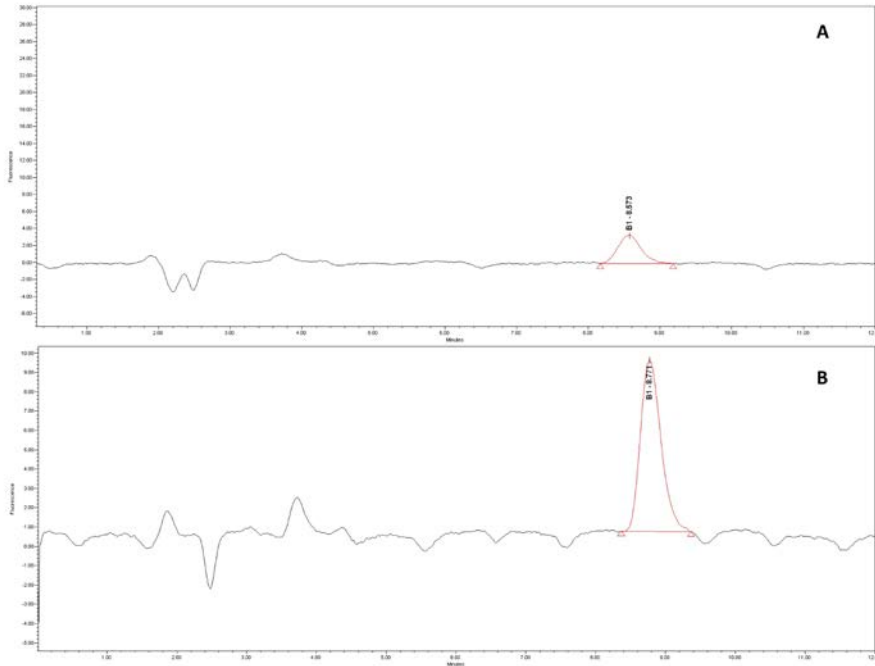


**Figura 28.** Cromatograma de un pienso blanco (porcino) utilizado para la determinación de LOD.

Debido a la necesidad de tener en cuenta posibles interferencias en los piensos comerciales a analizar y los límites legales establecidos en la legislación europea, finalmente se determinó un LOD de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (0,05 ng/mL en vial), y de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para el LOQ (0,1 ng/mL en vial), siendo la relación S/N para el LOD y LOQ, superior a 3:1 y 10:1, respectivamente. El rango de cuantificación del método fue de 2 a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB1, y se comprobó además que no existían efectos de supresión en la señal cromatográfica por efecto matriz (Figura 29).

Tanto el LOD, el LOQ, como el rango de cuantificación del método establecido son adecuados para los límites marcados por la Directiva N° 32/2002 (European Parliament, 2002b) para AFB1 en piensos, cuyo límite legal más bajo está establecido en 0,005 mg/kg en piensos compuestos para vacas lecheras y terneros, ovejas lecheras y corderos, cabras lecheras y cabritos, lechones y aves de corral jóvenes.

La cuantificación de AFB1 se realizó a través del área del pico cromatográfico obtenido en el tiempo de retención establecido para AFB1 ( $t_R=8,9$  min) y mediante el uso de una curva de calibración preparada para tal fin. Las curvas de calibración fueron en todos los casos lineales, y cumplieron los criterios de linealidad establecidos previamente ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ), siendo la pendiente mínima obtenida de  $4,95 \times 10^5$  mL/ng.



**Figura 29.** Cromatograma de un pienso blanco (avícola) con adición de AFB1 en A) LOD (1 µg/kg), y B) LOQ (2 µg/kg)

El método fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en el Reglamento de la Comisión Europea N° 401/2006 (European Commission, 2006b), en relación con su exactitud y precisión. Para ello se seleccionaron tres piensos blancos distintos (porcino, avícola y ovino) y se adicionaron cantidades conocidas de AFB1, a tres niveles distintos (2, 5 y 20 µg/kg) y utilizando 6 réplicas en cada uno de ellos. Los resultados de la media de las recuperaciones obtenidas en las adiciones, así como su correspondiente desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad ( $RSD_r$ ), se indican en la Tabla 16. También se indica la media de las recuperaciones y la desviación estándar relativa ( $RSD_R$ ), para cada nivel de adición, obtenida en condiciones de reproducibilidad y calculada a partir de las recuperaciones obtenidas en la validación e incluyendo las obtenidas a través de las muestras fortificadas de control utilizadas para controlar la precisión y exactitud en las series analíticas realizadas para las muestras comerciales de piensos. Para facilitar la revisión de los datos, también se indican los valores máximos del intervalo de recuperación y de  $RSD_r$  y  $RSD_R$  establecidos por el Reglamento N° 401/2006, según el nivel de concentración.

**Tabla 16.** Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para AFB1.

AFBI Nivel de fortificación en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetibilidad						Reproducibilidad		Reglamento UE No 401/2006		
	Pienso blanco N°1		Pienso blanco N°2		Pienso blanco N°3		%Rec <sub>R</sub>	RSD <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (Ec. Horwitz)	RSD <sub>R</sub> (Ec. Horwitz)	Intervalo % recuperación
2	91,4	4,7	89,3	4,1	88,6	5,7	90,1	7,8	26,9	40,8	70 al 110%
5	95,0	5,8	93,7	5,3	91,5	6,1	93,8	7,5	23,4	35,5	70 al 110%
20	94,7	3,7	4,1	95,3	4,2	94,1	6,2	20,5	31,1	80 al 110%	

De los datos obtenidos durante la validación, se puede establecer que el método desarrollado es sensible, robusto, reproducible y acorde a los límites legales de concentración establecidos para AFB1 en piensos, dentro de la Unión Europea y también acorde a los criterios de calidad establecidos actualmente para métodos de ensayo de micotoxinas según el Reglamento N° 401/2006, aunque sean aplicables exclusivamente a los métodos de ensayo de determinación de micotoxinas en alimentos. Además, tanto los reactivos, materiales y equipos utilizados son accesibles desde un punto de vista económico, por lo que el método desarrollado puede ser transferido de forma sencilla para su implantación como método de rutina.

## 1.2. Optimización y validación del método de cuantificación de zearalenona por HPLC-FLD

### Optimización del método cromatográfico

Aunque la metodología analítica de cuantificación para ZEA es variada, incluyendo el análisis a través de cromatografía de gases (Tanaka et al., 2000) o HPLC con detección por ultravioleta (Kruger et al., 1999), actualmente la gran mayoría de los métodos de ensayo de rutina para la cuantificación de zearalenona se basan en el uso de columna IAC y la utilización de cromatografía líquida con detección por fluorescencia debido a su sensibilidad y reproducibilidad (Bagneris et al., 1986; Krska et al., 2007). Tomando como punto de partida el trabajo desarrollado por De Saeger (De Saeger et al., 2003), Visconti (Visconti y Pascale, 1998) y el método oficial AOAC 985 (AOAC 985) se procedió a la optimización de un método por HPLC-FLD para la cuantificación de ZEA en piensos como se describe a continuación.

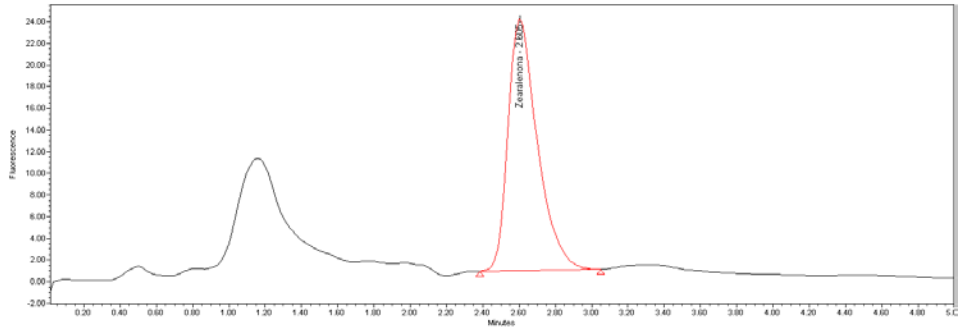
La ZEA presenta problemas de estabilidad en presencia de MeOH, siendo recomendable la utilización de ACN como disolvente de la misma en la preparación de disoluciones (Josephs et al., 2004). Por esa razón, se escogió el



uso de ACN con H<sub>2</sub>O tanto como disolvente de las disoluciones patrón, en la solución utilizada durante la extracción y en la fase móvil del método cromatográfico.

En primer lugar, se procedió a la selección de la columna cromatográfica a utilizar y la optimización de la fase móvil del método. La columna cromatográfica seleccionada (Waters Symmetry C<sub>18</sub> de fase inversa, 150 mm x 2,1 mm x 5 µm) fue la misma que la utilizada en el método HPLC-FLD para AFB<sub>1</sub>, al proporcionar una buena resolución cromatográfica para ZEA (Rahmani et al., 2009; De Saeger et al., 2003) y tener un bajo coste de adquisición. Utilizando las condiciones de detección indicadas en el método AOAC 985 (AOAC 985), se procedió a la optimización de la composición de la fase móvil, inyectando un patrón de 25 ng/mL de ZEA, y utilizando diferentes proporciones de H<sub>2</sub>O y ACN (70/30, 60/40, 55/45 y 50/50 v/v) en cada una de ellas. Los criterios para la selección de la composición de la fase móvil, fueron la obtención de un pico cromatográfico con una buena resolución, y en un tiempo de análisis razonable para evitar la posible aparición de interferentes cercanos al tiempo de retención de ZEA, y que se obtuvieron utilizando una fase móvil compuesta con ACN/H<sub>2</sub>O 60/40 (v/v), y un tiempo de retención de 2,6 min para ZEA (Figura 30), fijándose el tiempo de análisis completo de cada inyección en 5 minutos.

La mayoría de las publicaciones relativas a métodos de cuantificación por fluorescencia de ZEA utilizan, para su detección, longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) dentro del rango de 230 a 240 y 270 a 280 nm, así como un rango entre 415 y 460 nm para las longitudes de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) (Krska et al., 2007; Llorens et al., 2002; De Saeger et al., 2003; Visconti y Pascale, 1998), siendo las más habituales 236 nm y 274 nm como longitudes de onda de excitación, y 418 y 440 nm como longitudes de onda de emisión. Con el objetivo de optimizar las mismas en el equipo cromatográfico elegido, se realizaron diversas pruebas utilizando un patrón de 25 ng/mL de ZEA, y las combinaciones de longitudes de excitación y emisión (236/418, 236/440, 236/450, 274/418, 274/440 y 274/450 nm) más habituales, comprobándose que la combinación que proporcionaba mayor señal cromatográfica y mejor relación señal/ruido era la 274/450 nm, tanto en las mencionadas pruebas como posteriormente, durante la inyección de las muestras con ZEA utilizadas durante la validación.



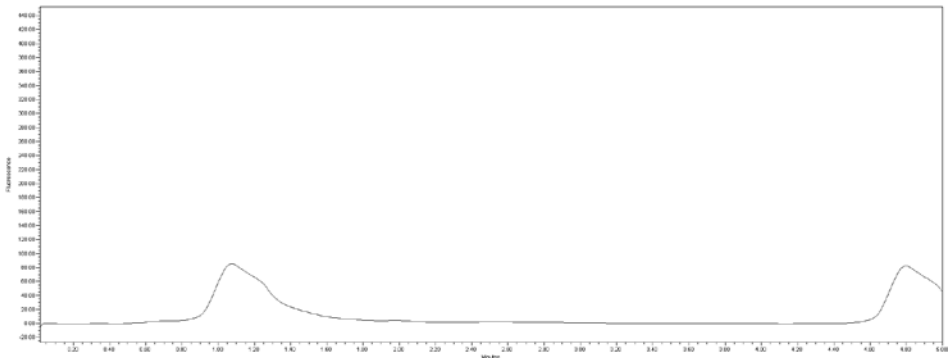
**Figura 30.** Cromatograma de un patrón de ZEA en el LOD (12,5 ng/mL)

Se seleccionó, como disolución de extracción, una mezcla ACN /H<sub>2</sub>O 75/25 (v/v) debido a su facilidad para solubilizar la posible ZEA presente en otras matrices, como cereales (Bagneris et al., 1986; Krska et al., 2007; Llorens et al., 2002; De Saeger et al., 2003), y se procedió a realizar distintas pruebas para la elección del material de filtración a utilizar con el fin de minimizar la interacción de posibles interferentes presentes en los mismos. Se realizaron pruebas utilizando filtros de fibra de vidrio GF/A, y de papel n<sup>o</sup>1, n<sup>o</sup>4 y n<sup>o</sup>5 de Whatman (Whatman, Maidstone, UK), comprobándose que, con la utilización de filtros Whatman n<sup>o</sup>4, se obtenían extractos que no presentaban problemas en su uso posterior con las columnas de inmunoafinidad seleccionadas, y el tiempo de filtración era sensiblemente más rápido (15 minutos), que el obtenido utilizando filtros Whatman n<sup>o</sup>5. Para evitar la posible desnaturalización de los anticuerpos presentes en el relleno de las columnas IAC por la presencia de ACN en el extracto, se introdujo una dilución previa del mismo (10 mL) con disolución tampón PBS (dilución 1/5).

Al igual a como se ha comentado en el método HPLC-FLD desarrollado para AFB<sub>1</sub>, para ZEA también existen disponibles distintos medios para purificar y concentrar extractos de muestras (cartuchos SPE, etc.), aunque son las columnas IAC el medio preferido por su rendimiento cuantitativo para ZEA (De Saeger et al., 2003). Por ello, se seleccionaron para su uso durante la fase de purificación del método las columnas IAC Easi-Extract Zearalenone (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia) debido a su bajo límite de detección (1,56 ng/mL), y su estabilidad en presencia de ACN. Se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, no siendo necesario realizar modificaciones en sus condiciones de uso para su optimización en la purificación de muestras de piensos.

## Validación del método cromatográfico

Para la validación del método se seleccionaron muestras de piensos (porcino, avícola y ovino) exentos de zearalenona (“piensos blancos”), en los que se comprobó ausencia de señal cromatográfica en el tiempo de retención de ZEA ( $t_R=2,6$  min), determinándose a continuación los límites de detección y cuantificación del método. El LOD se estableció siguiendo el criterio de que fuera como mínimo 3,3 veces el cociente entre la desviación estándar de la respuesta (señal cromatográfica obtenida para un pienso blanco en la zona del tiempo de retención de ZEA ( $t_R=2,6$  min), y calculada a partir de la curva de calibrado obtenida para ZEA (Miller y Miller, 1993). Para ello, se procedió a preparar una curva de calibrado, utilizando como eluyente una mezcla de los extractos finales obtenidos en la obtención de los piensos blancos e inyectados en el sistema HPLC (Figura 31). A partir de la desviación estándar de los residuos obtenida y de la pendiente de la curva, se pudo establecer, como punto de partida, un LOD de 7,582 ng/mL para ZEA (15,163  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra). El criterio establecido para establecer el LOQ del método fue que este fuera como mínimo 3 veces el LOD determinado, y que resultó ser 22,74 ng/mL para ZEA (45,49  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra). Se comprobó que la relación señal/ruido (S/N) para el LOD y LOQ era superior a 3:1 y 10:1 respectivamente (ICH, 2005).



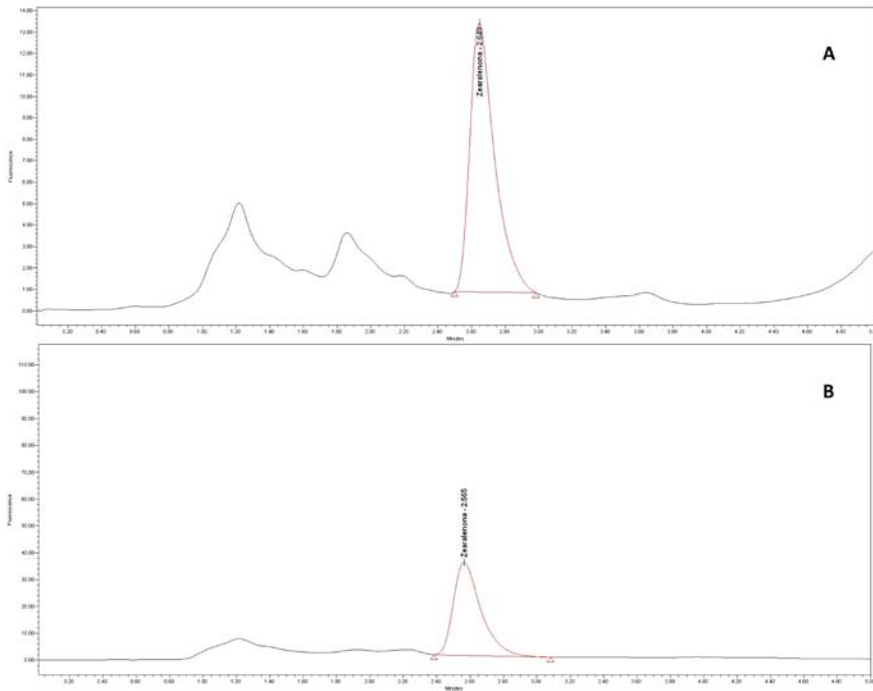
**Figura 31.** Cromatograma de un pienso blanco (ovino) utilizado para la determinación de LOD.

Debido a la necesidad de tener en cuenta posibles interferencias en los piensos comerciales a analizar y los límites legales establecidos en la legislación europea, finalmente se determinó un LOD de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (12,5 ng/mL en vial), y de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para el LOQ (25 ng/mL en vial), siendo la relación S/N para el LOD y LOQ, superior a 3:1 y 10:1, respectivamente. El rango de cuantificación del

método fue de 50 a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de ZEA. Se comprobó además que no existían efectos de supresión en la señal cromatográfica por efecto matriz (Figura 32).

Tanto el LOD, el LOQ, como el rango de cuantificación establecidos son adecuados a los límites estipulados en la Recomendación N° 576/2006 (European Commission, 2006d), cuyo límite legal más bajo está establecido en 0,1 mg/kg para piensos complementarios destinados a lechones y cerdas nulíparas.

La cuantificación de ZEA se realizó a través del área del pico cromatográfico obtenido en el tiempo de retención establecido para ZEA ( $t_R=2,6$  min) y mediante el uso de una curva de calibración preparada para tal fin. Las curvas de calibración fueron en todos los casos lineales, y cumplieron los criterios de linealidad establecidos previamente ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ), siendo la pendiente mínima obtenida de  $1,25 \times 10^4$  mL/ng.



**Figura 32.** Cromatograma de un pienso blanco (porcino) con adición de ZEA en A) LOD (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), y B) LOQ (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

El método fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en el Reglamento de la Comisión Europea N° 401/2006 (European Commission, 2006b), en relación a su exactitud y precisión. Para ello se seleccionaron tres

piensos blancos distintos (porcino, avícola y ovino) y se adicionaron cantidades conocidas de ZEA, a tres niveles distintos (50, 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), dentro del intervalo de cuantificación y utilizando 6 réplicas en cada uno de ellos. Los resultados de la media de las recuperaciones obtenidas en las adiciones, así como de su correspondiente  $\text{RSD}_T$  se indican en la Tabla 17. Así mismo se indica la media de las recuperaciones y la  $\text{RSD}_R$ , para cada nivel de adición y calculada a partir de las recuperaciones obtenidas en la validación del método, e incluyendo las recuperaciones obtenidas en las muestras fortificadas de control utilizadas para controlar la precisión y exactitud en las series analíticas de muestras comerciales de piensos. Para facilitar la revisión de los datos, también se indican los valores máximos del intervalo de recuperación y de  $\text{RSD}_T$  y  $\text{RSD}_R$  establecidos por el Reglamento N° 401/2006, según el nivel de concentración.

**Tabla 17.** Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para ZEA

ZEA Nivel de fortificación en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetibilidad						Reproducibilidad		Reglamento UE No 401/2006		
	Pienso blanco N°1 %Rec <sub>T</sub>	Pienso blanco N°1 $\text{RSD}_T$ (%)	Pienso blanco N°2 %Rec <sub>T</sub>	Pienso blanco N°2 $\text{RSD}_T$ (%)	Pienso blanco N°3 %Rec <sub>T</sub>	Pienso blanco N°3 $\text{RSD}_T$ (%)	%Rec <sub>R</sub>	$\text{RSD}_R$ (%)	$\text{RSD}_T$ %	$\text{RSD}_R$ %	Intervalo % recuperación
50	100,8	4,5	98,6	3,9	103,5	5,1	100,5	7,2	$\leq 40$	$\leq 50$	70 al 120%
100	96,8	4,1	94,6	5,1	89,5	5,6	94,5	6,9	$\leq 25$	$\leq 40$	70 al 120%
500	91,8	6,7	93,6	5,4	88,4	6,1	92,5	8,3	$\leq 25$	$\leq 40$	70 al 120%

De los datos obtenidos durante la validación, se puede establecer que el método desarrollado es sensible, robusto, reproducible y acorde a los límites legales de concentración establecidos para ZEA en piensos, dentro de la Unión Europea y también acorde a los criterios de calidad establecidos actualmente para métodos de ensayo de micotoxinas según el Reglamento N° 401/2006, aunque sean de aplicación ya que incluyen exclusivamente a los métodos de ensayo de determinación de micotoxinas en alimentos. Tanto los reactivos, materiales y equipos utilizados son accesibles desde un punto de vista económico, por lo que el método desarrollado puede ser transferido de forma sencilla para su implantación como método de rutina.

---

### **1.3. Optimización y validación del método de cuantificación de deoxinivalenol por HPLC-DAD**

---

---

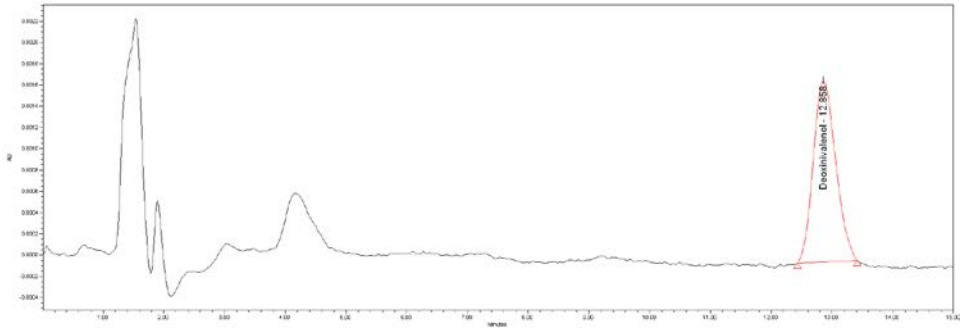
#### **Optimización del método cromatográfico**

---

Entre la distinta metodología propuesta para la determinación rutinaria de DON en alimentos y piensos (Krska et al., 2008a, 2007; Rahmani et al., 2009), está la cromatografía de gases con detección por captura de electrones (GC-ECD) (Kotal et al., 1999; Valle-Algarra et al., 2005), ELISA (Y. Li et al., 2012; Niessen, 2007) y la cromatografía líquida con detección por ultravioleta, siendo esta última la técnica cuantitativa más utilizada en análisis de rutina de DON en alimentos (Cigić y Prosen, 2009; Krska et al., 2008a; Rahmani et al., 2009).

Partiendo del trabajo realizado por Cahill et al. (1999), se procedió a la optimización de un método por HPLC-DAD para la cuantificación de DON, como se describe a continuación.

En primer lugar, se procedió a la elección de la columna cromatográfica y de la fase móvil a utilizar. La columna cromatográfica seleccionada (Waters Symmetry C<sub>18</sub> de fase inversa, 150 mm x 2,1 mm x 5 µm) fue la misma que la utilizada para los métodos de HPLC-FLD para AFB<sub>1</sub> y ZEA, al proporcionar una buena resolución cromatográfica en la bibliografía (Cahill et al., 1999; Krska et al., 2007; Rahmani et al., 2009) y tener un bajo coste de adquisición. Para la optimización de la fase móvil a utilizar, se procedió a inyectar un patrón de 250 ng/mL de DON, partiendo de la composición de fase móvil indicada por Cahill et al. (1999), H<sub>2</sub>O/MeOH/ACN 80/20/20 (v/v), y aumentando progresivamente la proporción acuosa de la misma con el objetivo de aumentar el tiempo de retención ( $t_R$ ) para DON en el análisis y favorecer su separación cromatográfica de posibles interferentes. Las composiciones de fase móvil utilizadas durante las pruebas realizadas fueron, para H<sub>2</sub>O/MeOH/ACN (v/v): 85/8/7, 90/5/5, 92/4/4, 95/3/2 y 93/4/3, siendo esta última, la combinación que proporcionó una mejor resolución cromatográfica, siendo el tiempo de retención establecido para DON en 12,8 minutos (Figura 33). Utilizando el patrón de 250 ng/mL de DON, se realizaron varias inyecciones del mismo, variando las longitudes de onda establecidas en el detector ultravioleta con red de fotodiodos: 215, 217, 219 y 225 nm. Se comprobó que la longitud de onda óptima para DON la proporcionaba 219 nm.



**Figura 33.** Cromatograma de un patrón de DON en el LOD (50 ng/mL).

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas a utilizar, se procedió a la optimización de las condiciones de extracción y purificación a utilizar en las muestras de piensos. Dado que DON es muy soluble en H<sub>2</sub>O, se procedió a utilizar H<sub>2</sub>O como disolvente de extracción (Cahill et al., 1999).

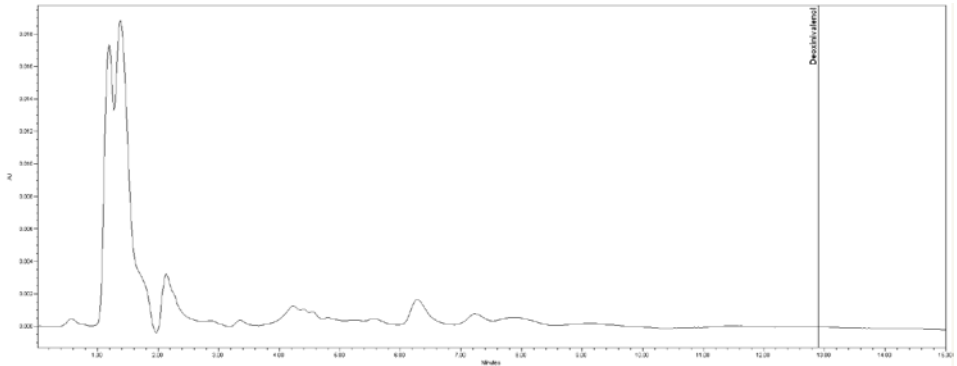
Para reducir los posibles interferentes presentes en los extractos que pudieran interferir en la fase de purificación posterior, se procedió a realizar varias pruebas de filtración mediante el uso de filtros de microfibras de vidrio GF/A y de papel n°1, n°4 y n°5 de Whatman (Whatman, Maidstone, UK). De los resultados obtenidos se pudo establecer que los filtros GF/A son los que proporcionaron la obtención de extractos filtrados exento de posibles interferentes con un menor coste temporal en la realización de la filtración. El resto de los filtros utilizados tampoco originaron problemas de saturación en las columnas de inmunoafinidad, pero los tiempos de filtración utilizados fueron sensiblemente más largos.

Aunque se ha propuesto la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida, las columnas IAC son el método preferido de purificación y preconcentración de DON en métodos de rutina (M Klötzel et al., 2005; MacDonald et al., 2005). Por ello, se seleccionó este como método de purificación, seleccionando las columnas DONPREP (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia) por su buena capacidad de retención y bajo límite de detección (LOD: DON= 7,5 ng/mL), siguiendo para su uso, las instrucciones del fabricante.

### **Validación del método cromatográfico**

Para la validación del método se seleccionaron muestras de piensos (porcino, avícola y ovino) exentos de DON (“piensos blancos”), en los que se comprobó ausencia de señal cromatográfica en el tiempo de retención de DON ( $t_R=12,8$  min), determinándose a continuación el LOD y LOQ del método.

El LOD se estableció siguiendo el criterio de que este fuera como mínimo 3,3 veces el cociente entre la desviación estándar de la respuesta, definida como la señal cromatográfica obtenida para un pienso blanco en la zona del tiempo de retención de DON ( $t_R=12,8$  min), y calculada a partir de la curva de calibrado obtenida para DON (Miller y Miller, 1993). Para ello, se procedió a preparar una curva de calibrado, utilizando como eluyente una mezcla de los extractos finales obtenidos en la obtención de los piensos blancos e inyectados en el sistema HPLC (Figura 34). A partir de la desviación estándar de los residuos obtenida y de la pendiente de la curva, se pudo establecer, como punto de partida, un LOD de 6,94 ng/mL para DON (27,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra). El criterio marcado para establecer el LOQ del método fue que tuviera como mínimo un valor de 3 veces el LOD determinado, y que se determinó en 20,81 ng/mL para DON (83,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra). Se comprobó que la relación señal/ruido (S/N) para el LOD y LOQ era superior a 3:1 y 10:1, respectivamente (ICH, 2005).



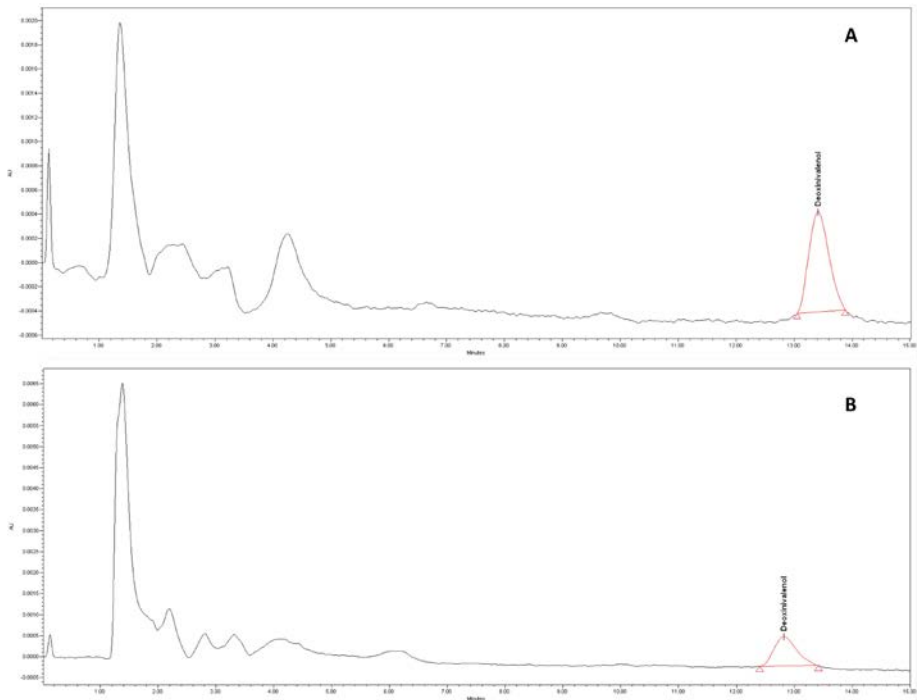
**Figura 34.** Cromatograma de un pienso blanco (porcino) utilizado para la determinación de LOD.

Debido a la necesidad de tener en cuenta posibles interferencias en los piensos comerciales a analizar y a los límites legales establecidos en la legislación europea, finalmente se estableció un LOD de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (50 ng/mL en vial HPLC), y de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para el LOQ (100 ng/mL en vial HPLC), siendo la relación S/N para el LOD y LOQ, superior a 3:1 y 10:1, respectivamente. El rango de cuantificación del método fue de 400 a 4000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de DON. Se comprobó además que no existían efectos supresores en la señal cromatográfica por efecto matriz (Figura 35).

Tanto el LOD, el LOQ, como el rango de cuantificación determinados son adecuados a los límites establecidos en la Recomendación N° 576/2006 (European Commission, 2006d), cuyo límite legal más bajo está establecido en 0,9 mg/kg para piensos complementarios y completos para cerdos.



La cuantificación de DON se realizó a través del área del pico cromatográfico obtenido en el tiempo de retención establecido para DON ( $t_R=12,8$  min) y mediante el uso de una curva de calibración preparada para tal fin. Las curvas de calibración fueron en todos los casos lineales, y cumplieron los criterios de linealidad establecidos previamente ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ), siendo la pendiente mínima obtenida de  $1,81 \times 10^2$  mL/ng. La linealidad del método se evaluó en base al  $R^2$  y a partir de los CVFR, cumpliendo en todos los casos, los criterios establecidos ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ).



**Figura 35.** Cromatograma de un pienso blanco (avícola) con adición de DON en A) LOD (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y B) LOQ (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

El método fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en el Reglamento de la Comisión Europea N° 401/2006 (European Commission, 2006b), en relación a su exactitud y precisión. Para ello se seleccionaron tres piensos blancos distintos (porcino, avícola y ovino) y se adicionaron cantidades conocidas de DON, a tres niveles distintos (400, 1500 y 4000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), dentro del intervalo de cuantificación y utilizando 6 réplicas en cada uno de ellos. Los resultados de la media de las recuperaciones obtenidas en las adiciones, así como de su correspondiente  $RSD_r$  se indican en la Tabla 18. Asimismo se indica la media de las recuperaciones y la desviación estándar relativa  $RSD_R$ , para cada

nivel de adición, y calculada a partir de las recuperaciones obtenidas en la validación del método, e incluyendo las recuperaciones obtenidas en las muestras fortificadas de control utilizadas para controlar la precisión y exactitud en las series analíticas de muestras comerciales de piensos. Por último, se indican a modo de referencia, los valores máximos del intervalo de recuperación y de  $RSD_r$  y  $RSD_R$  establecidos por el Reglamento N° 401/2006, según el nivel de concentración.

**Tabla 18.** Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-DAD para DON.

DON Nivel de adición en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetibilidad						Reproducibilidad		Reglamento UE No 401/2006		
	Pienso blanco N°1		Pienso blanco N°2		Pienso blanco N°3		%Rec <sub>R</sub>	RSD <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Intervalo % recuperación
400	101,3	15,3	98,6	16,1	103,2	13,3	98,6	17,9	≤ 20	≤ 40	60 al 110%
1500	92,1	14,5	90,2	15,3	95,7	12,7	94,5	16,6	≤ 20	≤ 40	70 al 120%
4000	87,5	13,9	93,5	11,5	95,7	12,7	93,6	17,8	≤ 20	≤ 40	70 al 120%

De los datos obtenidos durante la validación, se puede establecer que el método desarrollado es sensible, robusto, reproducible y acorde a los límites legales de concentración establecidos para DON en piensos, dentro de la Unión Europea. Aunque solamente aplicables a métodos de ensayo de determinación de micotoxinas en alimentos, el método desarrollado también es acorde a los criterios de calidad establecidos actualmente para métodos de ensayo de micotoxinas según el Reglamento N° 401/2006. El método desarrollado puede ser transferido de forma sencilla para su implantación como método de rutina ya que tanto los reactivos, materiales como los equipos utilizados son accesibles desde un punto de vista económico.

#### 1.4. Optimización y validación del método de cuantificación de fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> por HPLC-FLD

##### Optimización del método cromatográfico

Como metodología rutinaria de análisis de fumonisinas en alimentos se han propuesto diversas técnicas analíticas que incluyen cromatografía de capa fina (TLC) (Nelson et al., 1993; Plattner et al., 1990; Shephard y Sewram, 2004), GC (Arranz et al., 2004) y métodos basados en ELISA (Y. Li et al., 2012). Sin embargo, la metodología rutinaria de cuantificación de fumonisinas en laboratorios de control se basa en HPLC con detección por fluorescencia (Arranz et al., 2004; Kim et al., 2004; Sydenham et al., 1996).

Debido a la ausencia en las fumonisinas de grupos cromóforos, es necesario la utilización de agentes derivatizantes, siendo la técnica mayoritaria la realización de derivatizaciones pre-columna, es decir, antes de la separación cromatográfica y utilizando orto-ftalaldehído (OPA o naftaleno-2,3-dicarboxaldehído (NDA)) (Arranz et al., 2004; Cigić y Prosen, 2009; Lino et al., 2006; Mateo et al., 2002a; Silva et al., 2009) , que reaccionan con el grupo amino de las fumonisinas formando grupos fluorescentes.

Partiendo del trabajo realizado por varios autores (Duncan et al., 1998; Lino et al., 2006) se procedió a la optimización y validación de un método de cuantificación de las fumonisinas FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> en piensos por HPLC-FLD, como se describe a continuación.

Varios autores han descrito que la producción de FB<sub>1</sub> es superior a la de FB<sub>2</sub>, siguiendo la proporción 3:1 (Placinta et al., 2016; Rheeder et al., 2002), y dado que el coste económico de los patrones sólidos de fumonisinas es alto, especialmente para FB<sub>2</sub>, se procedió a considerar esta proporción 3:1 FB<sub>1</sub>/FB<sub>2</sub> en el desarrollo del método cuantitativo (preparación de patrones, curvas de calibrado, validación del método, etc.).

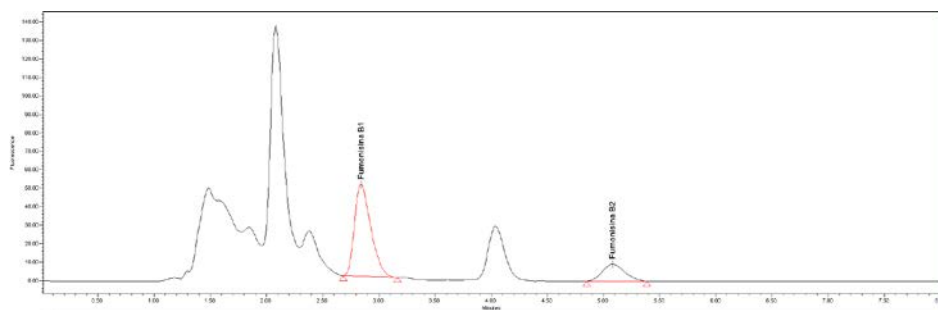
En primer lugar, se seleccionó la columna cromatográfica, el agente derivatizante y la optimización de la fase móvil. La columna cromatográfica seleccionada fue la misma que la utilizada para los métodos HPLC-FLD para AFB<sub>1</sub> y ZEA, y HPLC-DAD para DON, al proporcionar una buena resolución cromatográfica en la literatura (Arranz et al., 2004) y tener un bajo coste de adquisición.

Dado que para la optimización del agente derivatizante a utilizar en el método, eran necesarias unas condiciones cromatográficas iniciales, se escogieron las indicadas por Duncan (1998), que consistían, para la fase móvil, en una mezcla de MeOH y una disolución 0,1M de dihidrógeno fosfato sódico ajustada a un pH=3,35 con ácido orto-fosfórico, en proporción 77/23 (v/v), un flujo de fase móvil de 0,30 mL/min, un volumen de inyección de 60 µL, y unas condiciones de detección por fluorescencia de  $\lambda_{ex}$ = 335 nm y  $\lambda_{em}$ = 440 nm. El reactivo de derivatización seleccionado fue o-ftalaldehído (OPA) debido a su alta capacidad derivatizante de la señal cromatográfica para FB<sub>1</sub>, su accesibilidad económica, su facilidad en la preparación y a su estabilidad (Hinojo et al., 2006; Krska et al., 2007).

Para la optimización del proceso de derivatización con OPA, se realizaron pruebas utilizando un patrón conteniendo 75 ng/mL de FB<sub>1</sub> y 25 ng/mL de FB<sub>2</sub>, utilizando las condiciones indicadas por Hinojo et al. (2006) para su preparación,

y variando el volumen de agente derivatizante utilizado (250, 500 y 750  $\mu\text{L}$ ) como el tiempo de derivatización (3, 5 y 7 minutos) a la inyección en el sistema HPLC. De los resultados obtenidos en las pruebas, se pudo constatar que para 500  $\mu\text{L}$  del patrón de fumonisinas, era necesario la utilización de al menos, 500  $\mu\text{L}$  de la disolución de derivatización preparada y un tiempo mínimo de reacción de 4 minutos, para conseguir una derivatización completa. Se comprobó también que un aumento tanto en el volumen de la disolución de derivatización como en el tiempo de reacción, no aumentaba significativamente la señal cromatográfica obtenida.

La resolución de los picos cromatográficos obtenidos durante las pruebas realizadas fue buena, y se decidió mantener la composición de la fase móvil, pero aumentar ligeramente el flujo de esta utilizado a 0,35 mL/min, ya que se comprobó que mejoraba ligeramente la resolución de los picos cromatográficos obtenidos. En estas condiciones, los tiempos de retención obtenidos fueron para FB1, 2,8 min y para FB2, 5,1 min (Figura 36).



**Figura 36.** Cromatograma de un patrón de fumonisinas B1 y B2 en el LOD (30 ng/mL y 10 ng/mL respectivamente).

La selección de la disolución de extracción a utilizar en las muestras se realizó en función de la solubilidad de FB1 y FB2. Se seleccionó una muestra de 250 gramos a la que se le adicionó un volumen equivalente de las disoluciones individuales de FB1 (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y FB2 (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para obtener una concentración de 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de FB1 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de FB2. Una vez homogeneizada, y utilizando las instrucciones de uso proporcionada por el fabricante de las columnas IAC FUMONIPREP y Duncan (1998), se realizaron pruebas utilizando distintas combinaciones de MeOH y H<sub>2</sub>O (50/50 v/v y 60/40 v/v), ACN y H<sub>2</sub>O (50/50 v/v) y MeOH, H<sub>2</sub>O y ACN (50/25/25 y 70/15/15 v/v), utilizando en cada una de ellas 25 g del pienso. Se comprobó que, aunque el método de extracción y purificación no estaba optimizado, los mayores porcentajes de recuperación se obtenían utilizando la combinación H<sub>2</sub>O/MeOH/ACN 50/25/25 (v/v).

Con el objetivo de eliminar los posibles interferentes presentes en los extractos, se realizaron distintas pruebas de filtración mediante el uso de filtros de fibra de vidrio GF/A, y de papel nº1, nº4 y nº5 de Whatman (Whatman, Maidstone, UK). Se comprobó que la utilización de filtros nº4 de Whatman, proporcionaban la mejor relación entre la eficacia de la filtración y menor tiempo en la realización de la misma. Así mismo, y para prevenir la posible desnaturalización de los antígenos presentes en las columnas de inmunoafinidad seleccionadas por la presencia de MeOH en el disolvente de extracción seleccionado, se procedió a realizar una dilución previa del extracto filtrado (2,5 mL) con disolución tampón PBS, incluyendo una segunda filtración mediante el uso de filtros de microfibras de vidrio GF/A (dilución 1/40).

El método de purificación y preconcentración de fumonisinas seleccionado fue la utilización de columnas IAC, dado que es la metodología más habitual indicada en la bibliografía (Arranz et al., 2004; Krska et al., 2007). Se seleccionaron las columnas IAC Fumoniprep (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia) por su buena capacidad de retención y bajo límite de detección (LOD: FB1= 5 ng/mL, FB2= 10 ng/mL), siguiendo para su uso, las instrucciones del fabricante.

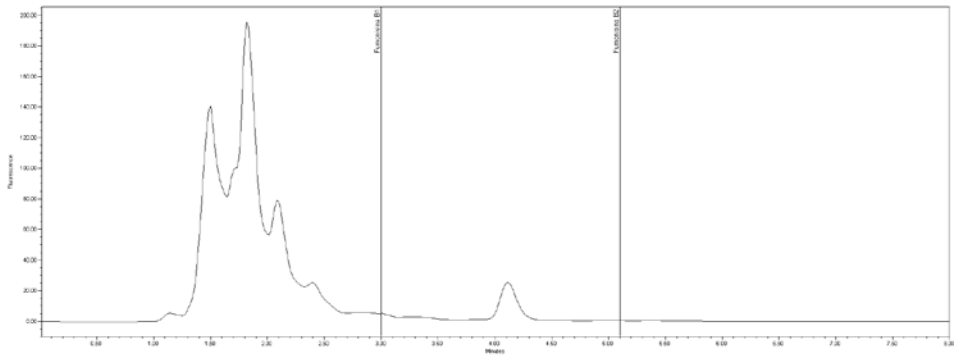
### **Validación del método cromatográfico**

Para la validación del método se seleccionaron muestras de piensos (porcino, avícola y ovino) exentos de fumonisinas (“piensos blancos”), en los que se comprobó ausencia de señal cromatográfica en el tiempo de retención de FB1 ( $t_R=2,8$  min) y FB2 ( $t_R=5,1$  min) determinándose a continuación los límites de detección y cuantificación del método. El LOD se estableció siguiendo el criterio de que fuera como mínimo 3,3 veces el cociente entre la desviación estándar de la respuesta (señal cromatográfica obtenida para un pienso blanco en la zona del tiempo de retención de FB1 y FB2, y calculada a partir de la curva de calibrado obtenida para cada fumonisina. Para ello, se procedió a preparar una curva de calibrado, utilizando como eluyente una mezcla de los extractos finales obtenidos en la obtención de los piensos blancos e inyectados en el sistema HPLC (Figura 37).

A partir de la desviación estándar de los residuos obtenida y de la pendiente de la curva, se pudo determinar, como punto de partida, un LOD de 5,13 ng/mL para FB1 (102,5 µg/kg en muestra) y de 0,72 ng/mL para FB2 (14,4 µg/kg en muestra). El criterio fijado para establecer el LOQ del método fue que tuviera un valor como mínimo de 3 veces el LOD determinado, y que se obtuvo en 15,38 ng/mL para FB1 (307,5 µg/kg en muestra) y en 2,16 ng/mL para FB2 (43,1 µg/kg

en muestra). Se comprobó que la relación señal/ruido (S/N) para el LOD y LOQ era superior a 3:1 y 10:1, respectivamente (ICH, 2005).

Debido a la necesidad de tener en cuenta posibles interferencias en los piensos comerciales a analizar y los límites legales establecidos en la legislación europea se determinó un LOD y un LOQ para ambas fumonisinas sensiblemente más alto.



**Figura 37.** Cromatograma de un pienso blanco (avícola) utilizado para la determinación de LOD.

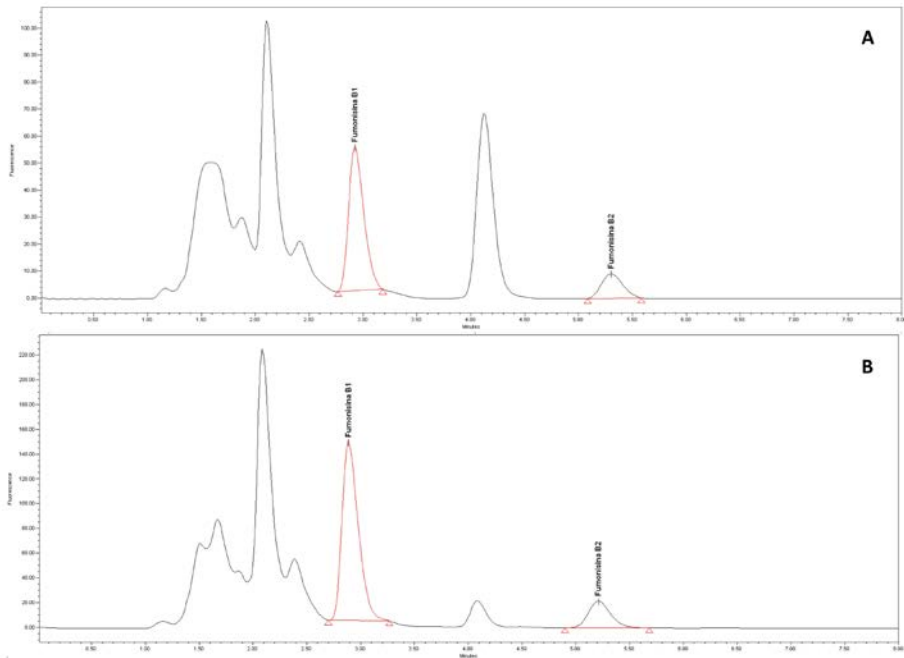
Para FB1, el LOD establecido finalmente fue de 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (30  $\text{ng}/\text{mL}$  en vial), mientras que el LOQ establecido fue de 1800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (90  $\text{ng}/\text{mL}$  en vial). La relación S/N para el LOD y LOQ fue superior a 3:1 y 10:1, respectivamente, y el rango de cuantificación establecido, entre 1800 y 15000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Para FB2, el LOD establecido finalmente fue de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (10  $\text{ng}/\text{mL}$  en vial), mientras que el LOQ determinado fue de 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (30  $\text{ng}/\text{mL}$  en vial). La relación S/N para el LOD y LOQ superior a 3:1 y 10:1, respectivamente, y el rango de cuantificación establecido, entre 600 y 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Tanto el LOD, el LOQ como el rango de cuantificación establecidos para FB1 y FB2 son adecuados a los límites establecidos en la Recomendación N° 576/2006 (European Commission, 2006d), cuyo límite legal más bajo está establecido en 5  $\text{mg}/\text{kg}$  para piensos complementarios y completos para cerdos, caballos (équidos), conejos y animales de compañía, expresado como suma de las concentraciones de FB1 y FB2.

La cuantificación de FB1 y FB2 se realizó a través del área del pico cromatográfico obtenido en los tiempos de retención establecidos para FB1 ( $t_R=2,8$  min) y FB2 ( $t_R=5,1$  min), mediante el uso de una curva de calibración preparada para tal fin. Las curvas de calibración, tanto para FB1 como para FB2

fueron en todos los casos lineales, y cumplieron los criterios de linealidad establecidos previamente ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ), siendo la pendiente mínima obtenida de  $3,8 \times 10^4$  mL/ng para FB1 y de  $5,2 \times 10^3$  mL/ng para FB2.



**Figura 38.** Cromatograma de un pienso blanco (porcino) con adición de FB1 y FB2 en A) LOD (600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para FB1, 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para FB2), y B) LOQ (1800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para FB1, 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para FB2)

El método fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en el Reglamento de la Comisión Europea N° 401/2006 (European Commission, 2006b), en relación a su exactitud y precisión. Para ello se seleccionaron tres piensos blancos distintos (porcino, avícola y ovino) y se adicionaron cantidades conocidas de FB1 y FB2, a tres niveles distintos dentro del intervalo de cuantificación, y utilizando 6 réplicas de muestras adicionadas en cada uno de ellos: Para FB1, 1800, 3750 y 15000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mientras que para FB2, 600, 1250 y 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Los resultados de la media de las recuperaciones obtenidas en las adiciones, así como de su correspondiente  $RSD_r$  se indican en la Tabla 19. Asimismo se indica la media de las recuperaciones y la  $RSD_R$ , para cada nivel de adición, obtenida en condiciones de reproducibilidad y calculada a partir de las recuperaciones obtenidas en la validación del método, e incluyendo las recuperaciones obtenidas en las muestras fortificadas de control utilizadas para controlar la precisión y exactitud en las series analíticas de muestras comerciales. Por último, se indican a modo de referencia, los valores máximos del intervalo de

recuperación, de  $RSD_r$  y  $RSD_R$  establecidos por el Reglamento N° 401/2006, según el nivel de concentración.

**Tabla 19.** Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para FB1 y FB2

FB1 Nivel de adición en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetitibilidad						Reproducibilidad		Reglamento UE No 401/2006		
	Pienso blanco N°1 $\%Rec_r$	Pienso blanco N°1 $RSD_r$	Pienso blanco N°2 $\%Rec_r$	Pienso blanco N°2 $RSD_r$	Pienso blanco N°3 $\%Rec_r$	Pienso blanco N°3 $RSD_r$	$\%Rec_R$	$RSD_R$ (%)	$RSD_r$ %	$RSD_R$ %	Intervalo % recuperación
1800	85,6	12,5	88,3	11,3	81,3	10,5	82,8	17,3	$\leq 20$	$\leq 30$	70 al 110%
3750	92,5	13,4	89,7	14,9	90,3	14,8	88,7	19,6	$\leq 20$	$\leq 30$	70 al 110%
15000	83,4	11,2	86,5	13,6	82,9	13,4	80,5	20,3	$\leq 20$	$\leq 30$	70 al 110%

FB2 Nivel de adición en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetitibilidad						Reproducibilidad		Reglamento UE No 401/2006		
	Pienso blanco N°1 $\%Rec_r$	Pienso blanco N°1 $RSD_r$	Pienso blanco N°2 $\%Rec_r$	Pienso blanco N°2 $RSD_r$	Pienso blanco N°3 $\%Rec_r$	Pienso blanco N°3 $RSD_r$	$\%Rec_R$	$RSD_R$ (%)	$RSD_r$ %	$RSD_R$ %	Intervalo % recuperación
600	94,6	14,1	102,3	11,9	98,6	10,8	96,8	18,3	$\leq 20$	$\leq 30$	70 al 110%
1250	88,4	15,2	92,3	16,4	93,5	12,1	95,2	19,6	$\leq 20$	$\leq 30$	70 al 110%
5000	101,3	14,7	95,3	9,8	92,8	11,6	96,3	17,7	$\leq 20$	$\leq 30$	70 al 110%

De los datos obtenidos durante la validación, se puede establecer que el método desarrollado es sensible, reproducible, robusto y acorde a los límites legales de concentración establecidos para FB1 y FB2 en piensos, dentro de la Unión Europea y también acorde a los criterios de calidad establecidos actualmente para métodos de ensayo de micotoxinas según el Reglamento N° 401/2006, aunque sean aplicables exclusivamente a los métodos de ensayo de determinación de micotoxinas en alimentos. Además, tanto los reactivos, materiales y equipos utilizados son accesibles desde un punto de vista económico, por lo que el método desarrollado puede ser transferido de forma sencilla para su implantación como método de rutina.

## 1.5. Optimización y validación del método de cuantificación de toxinas T-2 y HT-2 por HPLC-FLD

### Optimización del método cromatográfico

Se han propuesto diferentes estrategias para poder determinar la presencia de toxinas T-2 y HT-2 en alimentos, principalmente en cereales. Por una parte, y como métodos de cribado o screening, se han desarrollado métodos inmunoquímicos como ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) o sistemas basados en cromatografía de capa fina (TLC) (Krska y Josephs, 2001; Sibanda et al., 2000).



Por otra parte, los métodos cuantitativos se basan fundamentalmente en métodos basados en cromatografía de gases (GC) o por cromatografía líquida (HPLC). Con respecto a los métodos GC, la mayoría usan a nivel de detección, detectores de captura de electrones (ECD) (Majerus et al., 2008), y de ionización de llama (FID) (Schothorst y Jekel, 2001) o espectrometría de masas (MS) (Krska y Josephs, 2001; Lattanzio et al., 2009; Schothorst et al., 2005). En relación a los métodos basados en HPLC, la detección más utilizada es mediante fluorescencia con derivatización (Jiménez et al., 2000; Lippolis et al., 2008; Mateo et al., 2002a; Pascale et al., 2003; Trebstein et al., 2008; Visconti et al., 2005).

Partiendo del trabajo realizado por Pascale et al. (2003) y Visconti et al. (2005), se procedió a la optimización de un método por HPLC-FLD para la cuantificación de toxinas T-2 y HT-2 como se describe a continuación.

En primer lugar, se seleccionó la columna cromatográfica y el agente derivatizante. La columna cromatográfica elegida (Phenyl-Hexyl Luna®) fue seleccionada por su buena resolución cromatográfica para la toxina HT-2 derivatizada (Visconti et al., 2005). Se seleccionó como agente derivatizante 1-antróilnitrilo (1-AN), y 4-dimetilaminopiridina (DMPA) como catalizador de la reacción de derivatización por ser uno de los procedimientos más habituales en la bibliografía (Krska y Josephs, 2001; Pascale et al., 2003; Visconti et al., 2005) para la derivatización de las toxinas T-2 y HT-2. En presencia del agente derivatizante 1-antróilnitrilo (1-AN), y utilizando 4-dimetilaminopiridina (DMPA) como catalizador, las toxinas T-2 y HT-2 forman los ésteres fluorescentes correspondientes [T-2-(1-AN)] y [HT-2-(1-AN)].

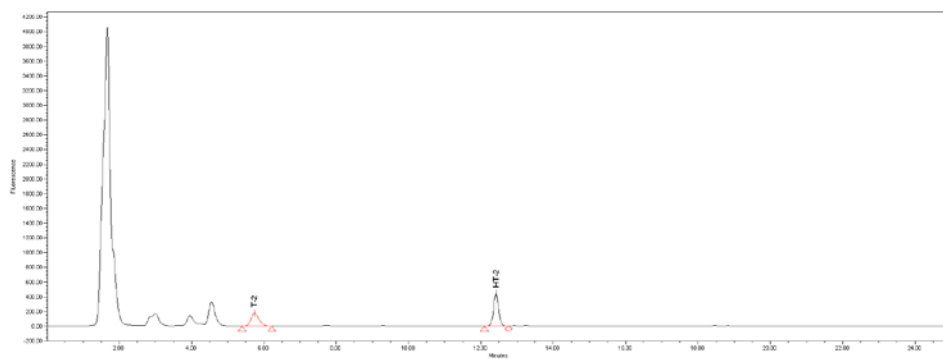
Las condiciones del procedimiento de derivatización aplicadas fueron las descritas por Pascale (Pascale et al., 2003), siendo estas la utilización de, para el proceso de derivatización, una temperatura de 50 °C durante 15 minutos y la utilización de tolueno de alta pureza como disolvente de los agentes derivatizantes para mejorar la señal cromatográfica de [T-2-(1-AN)].

En cuanto a las condiciones establecidas para el FLD, se mantuvieron las determinadas por Visconti (Visconti et al., 2005), siendo estas una longitud de onda de excitación de 381 nm y de emisión de 470 nm.

Con el objetivo de conseguir una buena resolución cromatográfica para los picos de T2 y HT2, se optimizó un gradiente de fase móvil, utilizando un patrón de 100 ng/mL de toxinas T-2 y HT-2 c/u, previamente derivatizado, y partiendo de la composición inicial establecida por Visconti y Pascale, fue una mezcla ACN /H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v). El gradiente optimizado permitió la separación, con buena resolución cromatográfica de los picos correspondientes a T-2 y HT-2 durante los

primeros 27 minutos del tiempo de análisis. Se incluyeron 5 minutos adicionales al final del mismo, con una fase móvil conteniendo un 100% de ACN, para asegurar la completa elución de posibles interferentes retenidos antes de la siguiente inyección y otros 3 minutos adicionales al citado gradiente, para proceder a un reequilibrado de la columna HPLC en las condiciones iniciales de composición de fase móvil, con el objeto del mantenimiento de los tiempos de retención de los analitos en sucesivas inyecciones. El tiempo total de análisis fue de 37 minutos.

Se comprobó que, en las condiciones establecidas, y con las muestras de piensos fortificadas utilizadas durante la validación del método cromatográfico, la variación de los tiempos de retención era inferior al 5% y sin la presencia de picos cromatográficos interferentes en los tiempos de retención de las toxinas T-2 ( $t_R = 5,8$  min) y HT-2 ( $t_R = 12,4$  min) (Figura 39).



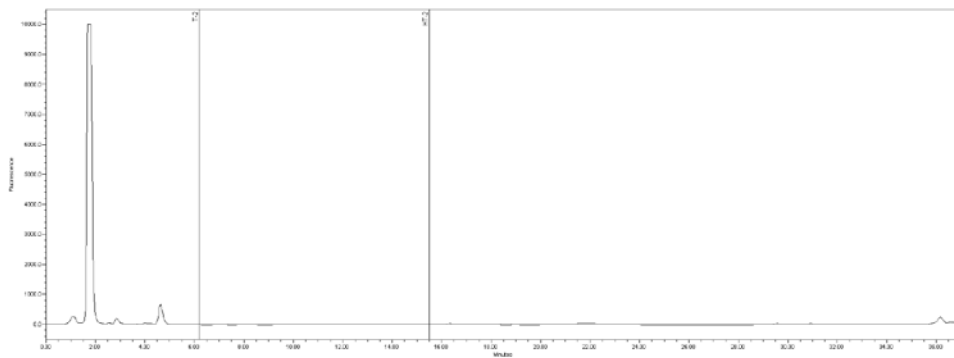
**Figura 39.** Cromatograma de un patrón de T-2 y HT-2 en el LOQ (60 ng/mL) para cada toxina (T-2 y HT-2).

Las toxinas T-2 y HT-2 son muy solubles en MeOH. Por ello, y de acuerdo con lo indicado por Visconti y Pascale (Pascale et al., 2003; Visconti et al., 2005) se utilizó una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O 90/10 (v/v). Para evitar la desnaturalización de los anticuerpos presentes en las columnas IAC utilizadas y para reducir el número de posibles interferentes, se procedió a diluir los extractos obtenidos con H<sub>2</sub>O (dilución 1/5), así como a una filtración utilizando filtros de microfibras de vidrio GF/A Whatman (Whatman, Maidstone, UK).

Se seleccionaron las columnas IAC EASI-EXTRACT® T-2 & HT-2 (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, Escocia) por su buena capacidad de retención y bajo límite de detección (LOD: T-2= 0,05 ng/mL, HT-2= 0,05 ng/mL), siguiendo para su uso, las instrucciones del fabricante.

## Validación del método cromatográfico

Para la validación del método se seleccionaron muestras de piensos (porcino, avícola y ovino) exentos de toxinas T-2 y HT-2 (“piensos blancos”), en los que se comprobó ausencia de señal cromatográfica en el tiempo de retención de T-2 ( $t_R=5,8$  min) y HT-2 ( $t_R=12,4$  min), determinándose a continuación los límites de detección y cuantificación del método. El LOD se estableció siguiendo el criterio de que fuera como mínimo 3,3 veces el cociente entre la desviación estándar de la respuesta, definida como la señal cromatográfica obtenida para un pienso blanco en la zona de los tiempos de retención de T-2 y HT-2, y calculada a partir de las curvas de calibrado obtenidas para cada toxina (Miller y Miller, 1993). Para ello, se procedió a preparar una curva de calibrado para cada toxina, utilizando como eluyente una mezcla de los extractos finales obtenidos a partir del análisis de los piensos blancos e inyectados en el sistema HPLC (Figura 40).



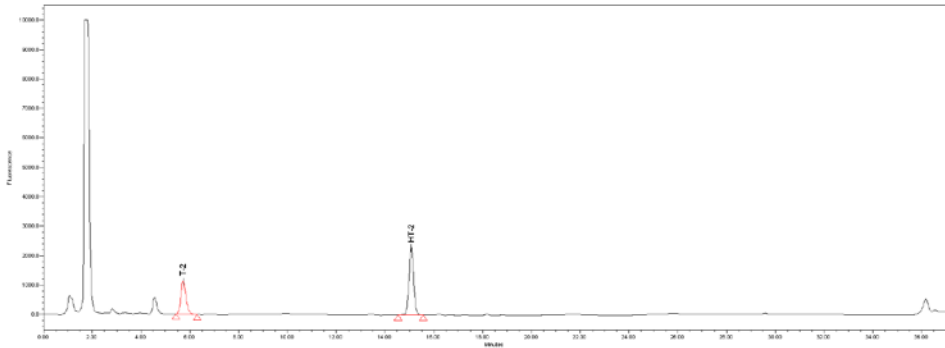
**Figura 40.** Cromatograma de un pienso blanco (porcino) utilizado para la determinación de LOD.

A partir de la desviación estándar de los residuos obtenida y de la pendiente de la curva, se pudo establecer, como punto de partida, un LOD de 6,63 ng/mL para T-2 (13,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra) y de 9,77 ng/mL para HT-2 (19,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra). El criterio establecido para establecer el LOQ del método fue que fuera como mínimo 3 veces el LOD determinado, y que se obtuvo en 19,90 ng/mL para T-2 (39,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra) y en 29,32 ng/mL para HT-2 (58,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestra). Se comprobó que la relación señal/ruido (S/N) para el LOD y LOQ era superior a 3:1 y 10:1, respectivamente (ICH, 2005).

Debido a la necesidad de tener en cuenta posibles interferencias en los piensos comerciales a analizar y a los límites legales establecidos en la legislación europea se estableció un LOD y un LOQ para ambas toxinas sensiblemente más alto: 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (60 ng/mL en vial), siendo la relación S/N superior a 10:1 para

ambas. El rango de cuantificación fue establecido entre 120 y 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 41), y se comprobó además que no existían efectos de supresión en la señal cromatográfica por efecto matriz (Figura 41).

El LOD y el LOQ en muestra fue establecido en 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para ambas toxinas (60 ng/mL en vial), mientras que el rango de cuantificación lineal fue establecido, para cada toxina, entre 120 y 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Las concentraciones obtenidas en muestra se expresaron como la suma de ambas toxinas, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



**Figura 41.** Cromatograma de un pienso blanco (avícola) con adición de T-2 y HT-2 en el LOQ (120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  c/u).

Tanto el LOQ como el rango de cuantificación determinados para T-2 y HT-2 son adecuados a los límites fijados en la Recomendación N° 163/2013 (European Commission, 2013), cuyo límite legal más bajo está establecido en 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para productos a base de cereales en piensos compuestos, expresado como suma de las concentraciones de T-2 y HT2. La cuantificación de T2 y HT2 se realizó a través del área del pico cromatográfico obtenido en el tiempo de retención establecido para ambas toxinas y mediante el uso de curvas de calibración preparadas para tal fin. Las curvas de calibrado fueron en todos los casos lineales, y cumplieron los criterios de linealidad establecidos previamente ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ), siendo las pendientes mínimas obtenidas,  $8,41 \times 10^4$  para T2 mL/ng y  $3,26 \times 10^4$  para HT2.

El método fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en el Reglamento de la Comisión Europea N° 401/2006 (European Commission, 2006b), en relación a su exactitud y precisión. Para ello se seleccionaron tres piensos blancos distintos (porcino, avícola y ovino) y se adicionaron cantidades conocidas de T2 y HT2, a tres niveles distintos, dentro del intervalo de cuantificación, y utilizando 6 réplicas de muestras adicionadas tanto para T2 como para HT2: 120, 500 y 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para cada una. Los resultados de la media de

las recuperaciones obtenidas en las adiciones, así como de su correspondiente  $RSD_r$  se indican en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Resumen de los datos de precisión y exactitud del método HPLC-FLD para T-2 y HT-2

T2 Nivel de fortificación en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetitibilidad						Reproducibilidad		Reglamento UE No 401/2006		
	Pienso blanco N°1		Pienso blanco N°2		Pienso blanco N°3		%Rec <sub>R</sub>	RSD <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Intervalo % recuperación
	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> (%)	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> (%)	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> (%)					
120	97,7	7,5	101,6	8,1	93,5	8,6	95,8	11,7	$\leq 40$	$\leq 60$	60 al 130%
500	99,2	3,5	96,1	6,2	92,4	5,7	94,1	10,4	$\leq 30$	$\leq 50$	60 al 130%
1500	96,3	4,5	91,2	4,9	92,3	3,8	92,2	11,1	$\leq 30$	$\leq 50$	60 al 130%

HT2 Nivel de fortificación en muestra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetitibilidad						Reproducibilidad		Reglamento UE No 401/2006		
	Pienso blanco N°1		Pienso blanco N°2		Pienso blanco N°3		%Rec <sub>R</sub>	RSD <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Intervalo % recuperación
	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub>	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub>	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub>					
120	96,3	6,8	93,2	8,7	90,7	8,2	91,4	11,4	$\leq 40$	$\leq 60$	60 al 130%
500	89,3	4,6	96,5	5,3	93,2	6,3	90,5	9,6	$\leq 30$	$\leq 50$	60 al 130%
1500	92,2	5,6	90,4	7,1	94,2	6,8	93,1	12,3	$\leq 30$	$\leq 50$	60 al 130%

Así mismo se indica la media de las recuperaciones y la  $RSD_R$ , para cada nivel de adición y calculada a partir de las recuperaciones obtenidas en la validación del método, e incluyendo las recuperaciones obtenidas en las muestras fortificadas de control utilizadas para controlar la precisión y exactitud en las series analíticas de muestras comerciales. Por último, se indican a modo de referencia, los criterios de precisión e intervalo de recuperación para métodos de ensayo de toxinas T-2 y HT-2, según el Reglamento UE N° 401/2006.

El método desarrollado es acorde a los límites legales de concentración establecidos para las toxinas T-2 y HT-2 en piensos dentro de la Unión Europea (Recomendación CE N° 165/2013) y acorde a los criterios de calidad establecidos actualmente para métodos de ensayo, y específicamente para métodos de ensayo de determinación de micotoxinas en alimentos, establecido por el Reglamento UE N° 401/2006. Además, es un método sensible, sólido y económicamente viable, pudiendo ser implantado como método de rutina en laboratorios de control.

---

## 2. Optimización y validación de un método cromatográfico multimicotoxinas para el análisis de piensos mediante UHPLC-MS/MS

---

El uso de la cromatografía líquida utilizando como sistema de detección la espectrometría de masas acoplada en tándem (MS/MS), tiene numerosas utilidades, destacando la posibilidad de la determinación en un único análisis de micotoxinas con naturaleza química muy distinta, la posibilidad de tener LOD y LOQ apropiados a los requisitos legales establecidos actualmente, y la posibilidad de utilizar fases de extracción y purificación de las muestras mucho más sencillas y rápidas que con la metodología convencional (Berthiller et al., 2007; Krska et al., 2008a).

Como se ha comentado en la introducción de esta Tesis Doctoral, la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), es una técnica cromatográfica novedosa, que ha permitido superar algunas limitaciones propias de la cromatografía líquida HPLC, mejorando su capacidad de separación, la resolución de los picos cromatográficos obtenidos y reducir los tiempos de análisis. Por ello, el uso combinado de UHPLC con la espectrometría de masas acoplada en tándem tiene importantes ventajas potenciales gracias a la combinación de la sensibilidad y selectividad de los detectores QqQ, con la mejora resolutive aportada por los sistemas UHPLC, permitiendo alcanzar los LOD y LOQ establecidos en la legislación actual, en un tiempo de análisis razonable (Rodríguez-Aller et al., 2012).

En la literatura se han descrito varios posibles métodos multimicotoxinas por HPLC para cereales (Berthiller et al., 2005; Marianna Klötzl et al., 2005; Kokkonen y Jestoi, 2009; Lattanzio et al., 2007; Soleimany et al., 2012a; Sulyok et al., 2007b, 2006), y alimentos (Krska et al., 2008b; Spanjer et al., 2008; Sulyok et al., 2007a; Valle-Algarra et al., 2011), o basados en UHPLC para cereales (Oueslati et al., 2012; Soleimany et al., 2012b; Ventura et al., 2006) y alimentos (Arroyo-Manzanares et al., 2013; Rahmani et al., 2009; Di Stefano et al., 2012; Varga et al., 2013). Sin embargo, y debido a la complejidad analítica que conlleva el análisis de piensos comerciales, el desarrollo de metodología analítica multimicotoxinas para los mismos ha sido menor.

En esta parte del trabajo de investigación llevado a cabo, se realizó el desarrollo y validación de un método UHPLC-MS/MS adaptado para la realización de la determinación rápida y fiable de las principales micotoxinas recogidas actualmente en la legislación europea en piensos (en adelante, reguladas): AFB1,

OTA, ZEA, FB1 y FB2, DON, T2 y HT2, y de otras micotoxinas de importante interés toxicológico como las aflatoxinas B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) y G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) y los tricotecenos 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON), fusarenona X (FUSX) y diacetoxiscirpenol (DAS).

### **Optimización de la preparación de la muestra**

El proceso de extracción de varias micotoxinas simultáneamente en matrices complejas como son los piensos, es una tarea difícil no solamente por las diferencias en la naturaleza química de las micotoxinas (diferentes solubilidades, etc.), sino porque la propia matriz tiene en su composición diferentes componentes susceptibles de ser también extraídos, como pigmentos, péptidos, polisacáridos, productos de fermentación, etc., y que pueden producir interferencias cromatográficas. Por ello, y dado que el objetivo principal de cualquier proceso de extracción utilizado durante la fase de preparación de muestras, es la de obtener de la misma la máxima cantidad posible de analitos, en el caso de la extracción en métodos multimicotoxinas, es necesario la utilización de mezclas de disolventes de diferente naturaleza.

En la optimización del proceso de extracción del método multimicotoxinas en piensos realizado, se procedió como punto de partida, a la utilización del procedimiento descrito por Sulyok et al. (Sulyok et al., 2007a, 2007b), utilizando como disolvente de extracción una mezcla de ACN/H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 80/19/1 (v/v), y realizando varias modificaciones. La primera de ellas, fue la utilización de pequeñas cantidades de ácido fórmico en la mezcla de disolventes utilizada, que tuvo como objetivo, incrementar la extracción a bajas concentraciones de algunas micotoxinas, especialmente, las fumonisinas (Dzuman et al., 2014).

Como se ha comentado en la introducción, la contaminación con micotoxinas en un lote o partida de piensos o alimentos puede ser extraordinariamente heterogénea. Por ello, otra de las modificaciones introducidas fue utilizar para cada muestra de piensos a analizar, una alícuota de 2 gramos, a diferencia de 0,5 g sugerido en el método de Sulyok et al. Dado que el peso de la alícuota era pequeño, la homogeneización previa de cada muestra tenía que ser completa, para lo cual se realizó un trabajo de trituración y homogeneización por etapas, tal y como se describe en el apartado 4.1 de la discusión de resultados.

A continuación, se realizaron distintas pruebas, utilizando varios tipos de piensos, para determinar el volumen mínimo de disolvente de extracción a utilizar (5, 6, 8, 10 y 12 mL) que permitiera un completo mezclado con la alícuota de

pienso tomada, comprobándose que 8 mL era la mínima cantidad necesaria. Así mismo, se estableció un procedimiento de homogeneización de ambos en dos fases, con un mezclado vigoroso inicial manual, seguido del uso de un agitador orbital durante 60 minutos a temperatura ambiente, de cara a asegurar la máxima solubilidad de las micotoxinas en el disolvente de extracción. Finalmente, y para eliminar posibles componentes interferentes de la matriz y facilitar el filtrado, se procedió a realizar pruebas de centrifugación de los extractos obtenidos, utilizando una velocidad de 4000, 4500 y 5000 rpm, durante 5 y 10 minutos. A partir de una velocidad de 4500 rpm y un tiempo de 5 minutos, no se observaron diferencias significativas en la separación de las fases obtenidas, por lo que fueron seleccionadas estas como las condiciones a utilizar.

Como último paso, se procedió a la filtración a viales HPLC utilizando filtros de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  para la eliminación de posibles interferencias, comprobándose la no existencia de posibles problemas de saturación en los filtros. Para evitar posibles problemas de sensibilidad a la luz ultravioleta que pudieran presentar algunas micotoxinas, y especialmente, las aflatoxinas, se utilizó en todo momento material de laboratorio previamente protegido frente a la luz solar, así como viales HPLC color ámbar, al igual que durante la realización de los métodos HPLC-FLD y HPLC-DAD descritos en esta discusión de resultados. El tiempo estimado para la preparación de una serie analítica de muestras de piensos se estimó en una duración aproximada de 3 horas.

### **Optimización del método UHPLC-MS/MS**

La selección de las condiciones cromatográficas y de detección escogidas se realizó siguiendo el criterio de obtener picos cromatográficos con la mejor resolución posible, especialmente entre picos adyacentes, en el menor tiempo de análisis cromatográfico necesario.

En primer lugar, se procedió a la optimización de los parámetros a utilizar en la detección por espectrometría de masas, siguiendo el criterio de conseguir los picos cromatográficos con la mejor relación señal/ruido. Para ello, se prepararon disoluciones de 10 ng/mL de cada una de las micotoxinas a determinar, en mezcla H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 (v/v) y se inyectaron, individualmente y directamente mediante jeringa, en la interfaz de ionización por electrospray (ESI), usando tanto el modo positivo (ESI+) como el modo negativo (ESI-) de la misma.

En cada inyección, se procedió a la obtención de espectros en modo “full scan”, es decir, realizando un barrido de posibles iones existentes, en función de su relación m/z, tanto en modo MS (iones precursores) como modo MS/MS (iones



producto), dentro de un intervalo preestablecido. Como punto de partida para el establecimiento de los intervalos de búsqueda, se utilizaron los datos aportados en el método descrito por Sulyok (Sulyok et al., 2007a). Con los datos obtenidos en los espectros para cada micotoxina, se procedió a la optimización de los parámetros MS (relación  $m/z$  de los iones precursores), así como de los parámetros de fragmentación MS/MS (relación  $m/z$  de los iones producto, energías de colisión y voltajes de cono). Se comprobó que para todas las micotoxinas se obtenían picos cromatográficos con mejor resolución en modo ESI+.

Para cada ion precursor, se eligieron los dos iones productos con mayor relación señal/ruido (más abundantes), y con mayor relación  $m/z$ . De ellos, el ion más abundante se utilizó para la cuantificación realizada en el método (ion cuantificador), mientras que el segundo se utilizó para confirmar la detección de cada micotoxina (ion cualificador), estableciéndose la especificidad del método para cada micotoxina mediante la confirmación de la presencia de ambos iones. A modo de ejemplo, en la aflatoxina B<sub>1</sub>, a partir del ion precursor 313, se obtuvieron como transiciones más abundantes en modo MRM, 313>285, que fue seleccionada como ion cuantificador, y 313>241, que fue elegida para confirmar su detección. Los datos optimizados obtenidos para todas las micotoxinas se indican en la Tabla 13 de la parte experimental de esta Tesis.

Seguidamente, se procedió a la selección de la columna cromatográfica siendo la elegida la columna Waters UPLC BEH C<sub>18</sub>, debido a su versatilidad y capacidad resolutoria utilizando distintos disolventes en la fase móvil, y especialmente, con alto contenido acuoso en la misma. Debido a la diferente naturaleza química de las micotoxinas a determinar, se decidió la utilización para la misma de un gradiente. En su optimización se utilizaron diferentes proporciones de H<sub>2</sub>O y MeOH, así como de H<sub>2</sub>O y ACN (5/95 (v/v) a 95/5 (v/v)), utilizando varios flujos de fase móvil (de 0,2 a 0,35 mL/min) e inyectando un patrón multimicotoxinas de 2 ng/mL de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> (c/u), 25 ng/mL de OTA, T<sub>2</sub> y HT<sub>2</sub> (c/u), 50 ng/mL de ZEA, 3-ADON, 15-ADON, FUSX y DAS, 250 ng/mL de DON, 375 ng/mL de FB<sub>1</sub> y 125 ng/mL de FB<sub>2</sub>. Además, se realizaron las pruebas mencionadas incluyendo en la parte acuosa del gradiente, diferentes aditivos (formiato amónico y ácido fórmico, acetato amónico y ácido acético), para comprobar la optimización en la ionización sugerida por varios autores (Kokkonen y Jestoi, 2009; Spanjer et al., 2008).

De los resultados obtenidos, se comprobó que la mejor resolución cromatográfica para DON, sin comprometer la del resto de las micotoxinas legisladas, se obtenía utilizando durante los dos primeros minutos del gradiente,

una proporción altamente acuosa decreciente en la fase móvil (95% al 80% (v)). Después del minuto 2 del gradiente, y hasta el minuto 15 del mismo, se comprobó que la mejor opción cromatográfica era el aumento paulatino y hasta el 100%, de la proporción de MeOH en la fase móvil, asegurando una buena resolución cromatográfica para el resto de las micotoxinas, y sin comprometer el tiempo de análisis utilizado para la inyección. Se incluyeron en el gradiente dos minutos adicionales al final del mismo y en las condiciones iniciales del gradiente, para asegurar el mantenimiento de los tiempos de retención en inyecciones sucesivas. También se comprobó que, a través de la adición como aditivo de ácido fórmico y formiato amónico al componente acuoso del gradiente, se obtenían picos cromatográficos mejor resueltos, fruto de una ionización más eficiente.

En conjunto, se obtuvo una buena resolución cromatográfica, en un tiempo de análisis de sólo 17 minutos, para todas las micotoxinas incluidas en la legislación (AFB1, OTA, DON, ZEA, FB1, FB2, T2, HT2), como las consideradas de interés toxicológico (AFB2, AFG1, AFG2, DAS, FUSX), excepto para 3-ADON y 15-ADON, dos metabolitos de DON, con estructura química muy similar (solamente varía la posición del grupo acetil en su estructura). Para el caso de 3-ADON y 15-ADON, se observó que presentaron el mismo tiempo de retención cromatográfico en las diversas pruebas realizadas. Idéntico resultado se obtuvo en las pruebas realizadas durante la optimización de los parámetros de detección, comprobándose que los iones producto mayoritarios de ambos, variando su proporción, eran idénticos, y sin posibilidad de una identificación unívoca para cada uno de ellos. Por ello, se consideró la posible presencia de ambos como suma, tanto en la validación del método como en el análisis de muestras comerciales realizado.

### **Validación del método UHPLC-MS/MS**

El método UHPLC-MS/MS fue validado en función de los límites establecidos en la legislación (European Parliament, 2002b; European Commission, 2006d, 2013). En relación a los criterios técnicos del método de ensayo, se validó teniendo en cuenta, por una parte, los criterios de funcionamiento para métodos de ensayo de micotoxinas establecidos en la Unión Europea por el Reglamento N° 401/2006 (European Commission, 2006b), y la Decisión de la Comisión Europea N° 657/2002 (European Commission, 2002), y en relación a los criterios de validación en espectrometría de masas, a los documentos SANCO/12571/2013 (SANCO, 2013) y SANTE/11945/2015 (SANTE, 2015), y la terminología específica de espectrometría de masas establecida en el proyecto apoyado por la IUPAC denominado "Standard Terms and Definitions for

Mass Spectrometry (Murray et al., 2013). El documento SANTE/11945/2015, que sustituyó en enero de 2016 al documento SANCO/12571/2013, fue publicado una vez finalizada la optimización del método UHPLC-MS/MS. Sin embargo, todos los resultados obtenidos durante la optimización del método UHPLC-MS/MS fueron reevaluados teniendo en cuenta las posibles modificaciones introducidas por él, comprobándose que también eran acordes al mismo.

Para la validación del método se seleccionaron muestras de piensos (porcino, avícola y ovino), utilizados como blancos en los métodos HPLC-FLD y HPLD-DAD desarrollados y comentados en los apartados anteriores, y que se analizaron siguiendo el protocolo de extracción establecido para el método UHPLC-MS/MS, comprobándose la ausencia de señal cromatográfica en los tiempos de retención de cada micotoxina, para los dos iones producto seleccionados (en adelante “piensos blancos”). Siguiendo los criterios establecidos por los documentos SANCO/12571/2013 y SANTE/11945/2015, se determinaron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método, estableciéndose como criterio que la relación S/N de ambos fuera, como mínimo, de 3:1, y de 10:1, respectivamente. Posteriormente se procedió a la comparación de las respuestas obtenidas en un pienso blanco fortificado en el LOQ para cada micotoxina. Tal y como se puede apreciar en la Figura 42, para las micotoxinas reguladas, y la Figura 43 para el resto de las micotoxinas de interés toxicológico incluidas, la relación S/N para el LOQ de todas las micotoxinas fue muy superior y siendo en todos los casos superiores a 10:1. Asimismo, la relación S/N para el LOD establecido de todas las micotoxinas fue muy superior a 3:1 (SANTE, 2015; ICH, 2005). Se estableció un valor de LOD equivalente a la mitad del valor del LOQ para cada micotoxina, en vez de 1/3 del valor del LQ, con el fin de establecer un criterio más estricto en la selección de las muestras de piensos con posibles trazas de micotoxinas para su análisis posterior por UHPLC-Q-TOF-MS.

Tanto el LOQ como el rango de cuantificación establecidos para todas las micotoxinas en el método UHPLC-MS/MS son adecuados a los límites establecidos en la Directiva N° 32/2002 (European Parliament, 2002b), y las recomendaciones de la Comisión Europea N° 576/2006 y N° 165/2013 (European Commission, 2006d, 2013).

Es bien conocido que, en espectrometría de masas, se puede producir la coelución de componentes de la matriz que pueden participar en los procesos de ionización que se producen en la interfaz ESI, produciendo habitualmente efectos de supresión de la señal. Para controlar dichos efectos, se utilizaron calibraciones mediante patrones con efecto matriz (“matrix-matched calibrations”), tanto en la validación del método como en la aplicación del método UHPLC-MS/MS en el

análisis de muestras comerciales. La aplicación de la metodología de preparación de estas calibraciones se realizó mediante la preparación de las curvas de calibrado inmediatamente antes de su utilización, empleando como disolventes, extractos de piensos blancos obtenidos previamente (SANCO, 2013; SANTE, 2015). La cuantificación de cada micotoxina se realizó a través del área del pico cromatográfico obtenido en el tiempo de retención establecido y mediante el uso de una curva de calibración preparada para tal fin. Las curvas de calibración fueron en todos los casos lineales, y cumplieron los criterios de linealidad establecidos previamente ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ), siendo la pendiente mínima obtenida de  $1,52 \times 10^1$  mL/ng para FB2.

El método fue validado, en relación a su exactitud y precisión, de acuerdo a los criterios establecidos en el Reglamento N° 401/2006 (European Commission, 2006b). Para ello se seleccionaron varios piensos blancos distintos (porcino, avícola y ovino) y se adicionaron cantidades conocidas (fortificación de muestras) de cada micotoxina. Para cada una de las micotoxinas reguladas (AFB1, OTA, DON, ZEA, FB1, FB2, T2, HT2) se fortificaron tres niveles distintos, utilizando cuatro muestras de piensos blancos en el caso del LOQ, y tres muestras de piensos blancos en el resto de los niveles de adición. Para las micotoxinas de interés toxicológico (AFB2, AFG1, AFG2, DAS, 3-ADON y 15-ADON (suma) y FUSX), se realizó la validación, de forma similar y comprobando los tres niveles incluido el LOQ. En todos los casos, en cada nivel ensayado se utilizaron 5 réplicas de muestras adicionadas. En resumen, para cada micotoxina, y por cada nivel de fortificación, se obtuvieron como mínimo 15 datos de recuperaciones, 5 por pienso blanco utilizado, y en el caso del LOQ para las micotoxinas reguladas, un total de 20 datos.

En la Tabla 21 se indica, para cada nivel de fortificación, la media de las recuperaciones y la desviación estándar relativa obtenidas tanto en condiciones de repetibilidad ( $\%Rec_r$ ,  $RSD_r$ ), como de reproducibilidad ( $\%Rec_R$ ,  $RSD_R$ ). En reproducibilidad, se incluyó en los cálculos, para cada nivel de adición, las recuperaciones obtenidas en la validación del método y también las recuperaciones obtenidas en las muestras fortificadas de control utilizadas para controlar la precisión y exactitud en las series analíticas de muestras comerciales.

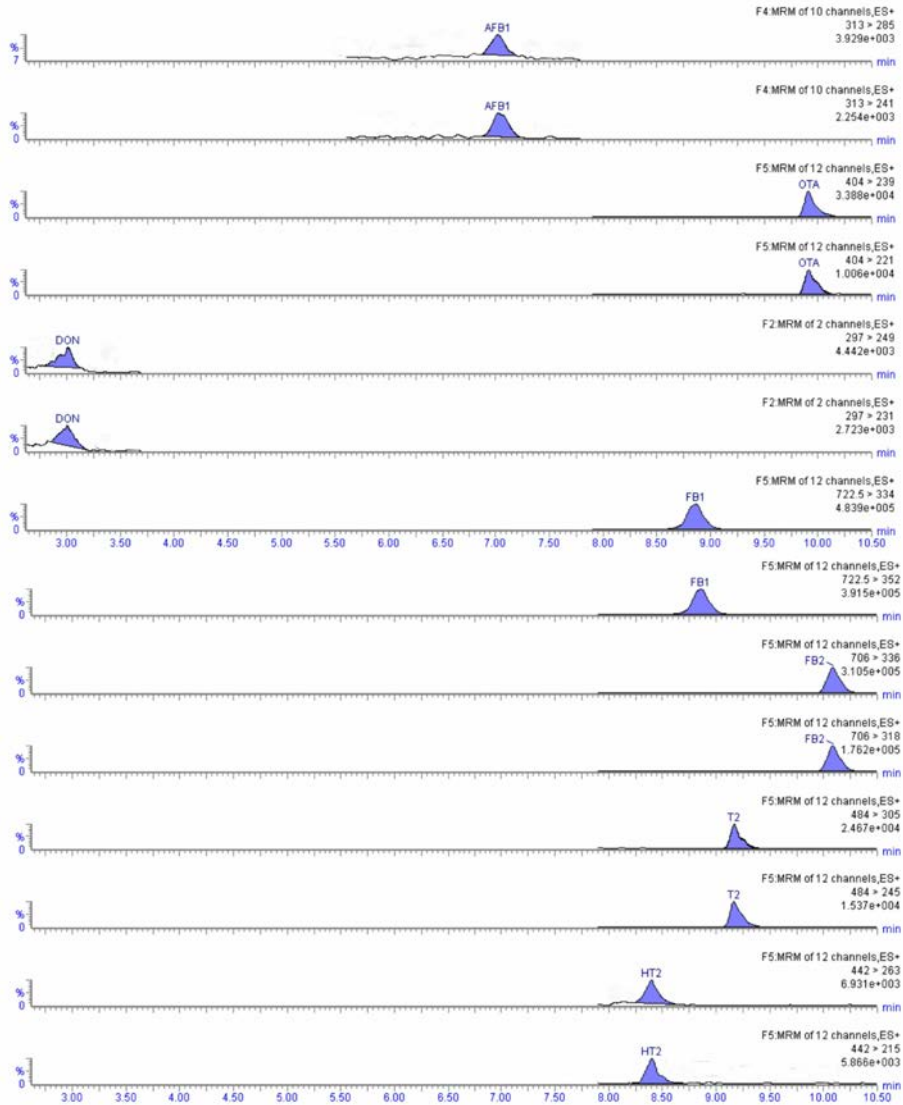
**Tabla 21.** Resumen de los datos de precisión y exactitud del método UHPLC-MS/MS.

Micotoxina	Nivel de adición (µg/kg)	Repetibilidad								Reproducibilidad	
		Pienso blanco 1		Pienso blanco 2		Pienso blanco 3		Pienso blanco 4		%Rec <sub>R</sub>	RSD <sub>R</sub> (%)
		%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> (%)	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> (%)	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> (%)	%Rec <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> (%)		
AFB <sub>1</sub>	2	101,6	8,4	97,2	9,5	105,6	8,8	98,4	8,7	100,4	8,8
	4	93,4	7,5	106,4	2,4	100,6	7,7			98,4	6,7
	20	107,2	0,8	101,1	3,6	94,7	4,0			99,4	5,6
DON	250	98,8	6,8	92,0	5,9	95,3	8,2	97,5	8,2	97,1	7,2
	500	106,0	8,6	95,5	10,8	98,3	2,1			99,6	8,3
	2500	103,0	3,5	103,2	2,2	101,4	1,6			102,0	5,0
ZON	50	105,1	6,5	100,9	4,0	102,6	9,4	91,3	14,8	100,0	9,2
	100	106,3	3,2	102,2	3,1	103,3	1,9			101,8	3,4
	500	106,8	2,1	107,4	2,0	102,5	2,6			102,6	4,1
T2	25	106,8	4,6	104,0	3,9	98,0	8,4	96,9	9,1	100,2	7,8
	50	105,3	5,8	102,8	2,3	108,1	1,7			104,0	5,1
	250	108,7	3,4	108,4	1,5	107,2	2,2			104,6	3,6
OTA	25	95,9	5,2	96,0	2,3	96,4	7,9	95,9	11,9	95,7	7,3
	50	105,2	5,3	99,8	4,7	105,5	3,4			102,9	6,7
	250	98,5	2,4	99,4	4,5	110,1	9,8			100,9	7,3
HT2	25	89,4	7,6	86,0	9,3	76,6	6,8	106,0	11,0	92,0	9,7
	50	99,4	2,9	97,9	9,0	96,9	2,3			98,7	7,0
	250	109,6	2,2	104,9	3,6	107,8	2,5			104,9	4,7
FB <sub>1</sub>	375	95,2	2,6	101,5	1,7	99,8	4,7	81,9	7,9	95,9	4,9
	750	84,1	7,9	81,9	6,5	85,8	5,2			87,7	6,2
	3750	110,5	1,2	108,2	2,1	108,9	4,7			106,8	4,2
FB <sub>2</sub>	125	102,3	1,6	106,5	1,9	106,5	5,0	82,9	12,6	99,9	5,9
	250	93,9	5,0	87,9	4,2	93,7	5,5			93,7	5,3
	1250	106,5	1,2	107,3	2,3	107,0	2,3			103,8	3,7
AFB <sub>2</sub>	2	95,2	6,4	103,4	8,0	95,4	9,6			98,1	7,6
	4	104,4	7,3	105,6	4,2	105,6	5,4			103,3	7,2
	20	103,2	1,5	102,2	3,3	98,4	4,3			100,2	5,6
AFG <sub>1</sub>	2	99,9	5,5	103,2	7,5	102,1	10,6			100,1	8,1
	4	107,4	1,6	106,0	2,9	102,2	4,2			103,8	5,0
	20	104,3	1,2	100,9	3,1	96,0	2,0			98,6	3,0
AFG <sub>2</sub>	2	99,8	13,5	94,5	9,4	95,0	9,4			96,0	9,8
	4	90,8	6,2	82,0	3,6	92,0	7,0			89,7	6,7
	20	105,6	1,9	106,0	5,4	100,6	7,4			101,8	6,8
FUSX	50	95,6	13,8	98,0	8,9	101,2	12,2			98,2	10,9
	100	91,9	7,2	99,8	7,3	96,2	8,8			95,6	8,3
	500	95,0	6,6	102,3	7,6	96,2	7,9			97,1	8,5
3-ADON+15-ADON	100	108,2	3,9	105,4	8,8	108,9	8,4			105,0	7,9
	200	105,8	4,3	100,6	4,5	100,8	7,2			101,4	6,5
	1000	111,3	2,1	101,3	1,0	109,9	1,4			104,7	3,6
DAS	50	84,1	1,3	84,2	4,5	83,3	5,0			86,7	4,3
	100	98,4	5,5	92,5	3,3	97,2	3,0			97,3	5,0
	500	108,5	7,8	104,1	6,2	106,8	9,2			103,5	8,9

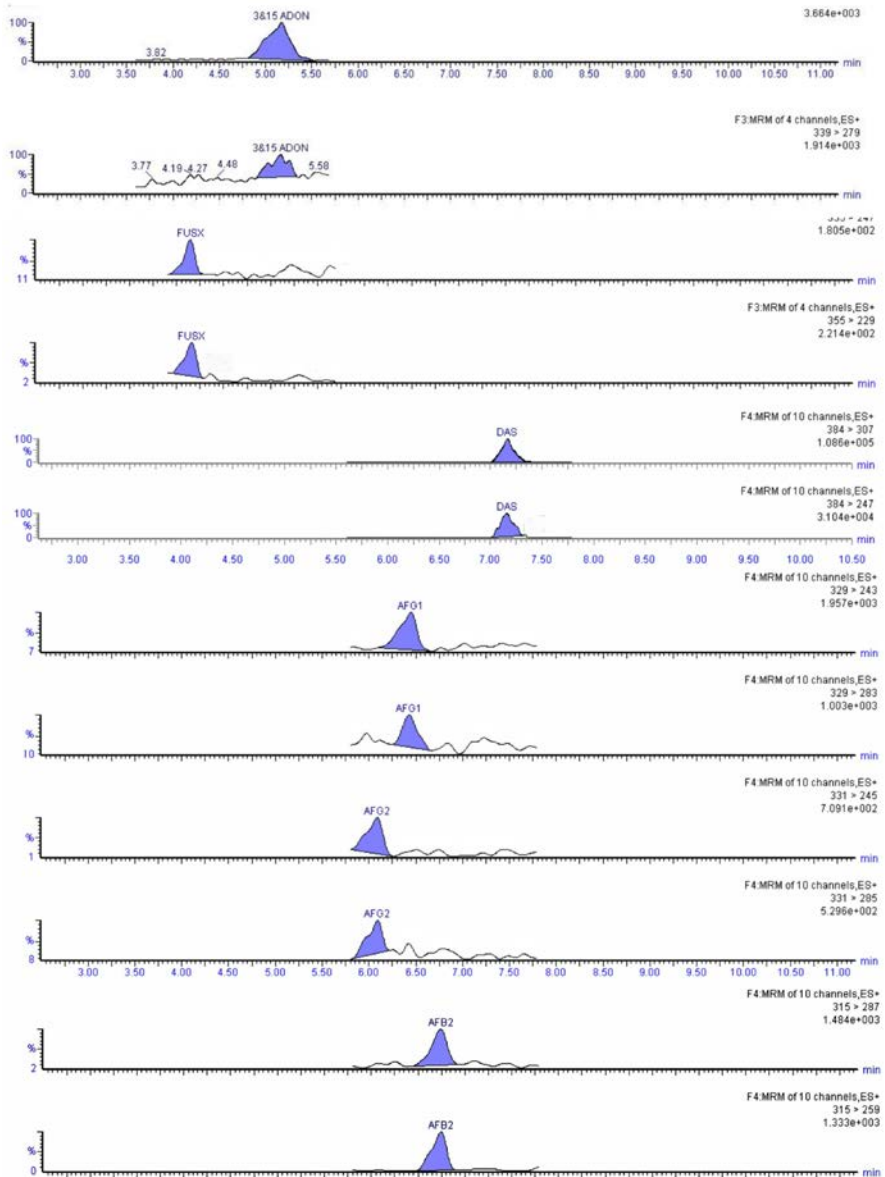
%Rec<sub>r</sub>: Recuperación intradía, %Rec<sub>R</sub>: %Recuperación en condiciones de reproducibilidad, RSD<sub>r</sub>: desviación estándar relativa intradía, RSD<sub>R</sub>: desviación estándar relativa en condiciones de reproducibilidad.

De los datos obtenidos en la validación se comprobó que el método UHPLC-MS-MS desarrollado era acorde a los criterios de funcionamiento para métodos de ensayo en micotoxinas, establecido por el Reglamento N° 401/2006 (European Commission, 2006b), y a los criterios de calidad establecidos por la Decisión de la Comisión Europea N° 657/2002 (European Commission, 2002), y los documentos SANCO/12571/2013 (SANCO, 2013) y SANTE/11945/2015 (SANTE, 2015). Los documentos SANCO/12571/2013 y SANTE/11945/2015 fueron elegidos como referencia para el desarrollo del método multimicotoxinas descrito debido a la ausencia en la actualidad de bibliografía similar y publicada por la Comisión Europea, relativa a la aplicación de métodos de ensayo basados en espectrometría de masas al análisis de micotoxinas.

Por todo ello, se pudo establecer que el método era sensible, robusto, reproducible y rápido, ya que la duración de la inyección en el equipo era de solo 17 minutos. Además, y siempre sujeto a la disponibilidad de uso de equipos UHPLC-MS/MS, el método era económicamente viable, al prescindir del uso de columnas de inmunoafinidad, pudiendo ser transferido a laboratorios de control como método de rutina.



**Figura 42.** Cromatograma en una muestra de pienso fortificada en el LOQ para las micotoxinas reguladas en la UE: AFB1, OTA, DON, FB1, FB2, T2 y HT2, incluyendo las dos transiciones seleccionadas.



**Figura 43.** Cromatograma en una muestra de pienso fortificada en el LOQ con las aflatoxinas (AFB2, AFG1 y AFG2) y los tricotecenos DAS, FUSX, 3-ADON y 15-ADON (suma) incluidas en el método UHPLC-MS/MS, incluyendo las dos transiciones seleccionadas.



### **3. Optimización y validación de un método cromatográfico multimicotoxinas para el análisis de piensos mediante UHPLC-Q-TOF-MS**

Una de las limitaciones más importantes de los métodos multimicotoxinas actuales, mediante el uso de espectrometría de masas acoplada en tándem, es que en el modo de trabajo habitual (MRM), solamente se identifican/cuantifican las micotoxinas establecidas previamente, y no permiten un análisis retrospectivo de las muestras para la identificación de otras posibles micotoxinas presentes en las mismas. Para resolver esta limitación, durante los últimos años, una de las metodologías que está teniendo más interés, es la utilización de la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF), acoplada habitualmente a sistemas de cromatografía líquida (HPLC o UHPLC), ya que ha demostrado ser una metodología potente en el cribado e identificación de posibles analitos presentes en muestras, debido a su alta capacidad para determinar la masa exacta de moléculas (Zachariasova et al., 2010).

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo acoplada a cuadrupolo (Q-TOF-MS), una evolución de la espectrometría TOF, permite realizar de forma automática la medición exacta de la masa ( $m/z$ ) tanto de los iones precursores (MS), como de los iones producto (MS/MS), a través de la medición de masas exactas (TOF-MS) y la adquisición de espectros MS/MS en la misma inyección cromatográfica. Esto permite poder trabajar en modo IDA ("information dependent acquisition"), en el cual, dentro de cada inyección, y para cada momento establecido dentro del tiempo de inyección, se realiza un cribado (o "screening"), que genera una lista de iones presentes en el espectro de masas obtenido (denominado XIC "extracted ion chromatograms"), en función de los criterios establecidos a priori, como, entre otros, el umbral de intensidad, el estado de carga y el patrón isotópico. A partir de los iones seleccionados en la lista, se realizan análisis MS/MS, complementando la información obtenida en la medición de la masa exacta de los iones producto (Vallverdú-Queralt et al., 2011; Zachariasova et al., 2010).

La espectrometría Q-TOF-MS ha demostrado ser una potente herramienta para la realización de cribados en muestras, como por ejemplo, para la identificación de metabolitos (Broecker et al., 2012; Ni et al., 2010; Sachin et al., 2010; Spaulding et al., 2006; Tonoli et al., 2012; Vallverdú-Queralt et al., 2011; Wong et al., 2008), de productos de degradación en procesos metabólicos (González-Mariño et al., 2011; Gosetti et al., 2012), para la evaluación de la calidad de productos comerciales (Zhang et al., 2012) y el estudio de residuos de

medicamentos y plaguicidas (Jin et al., 2010; S. L. Li et al., 2012). En el caso de micotoxinas se ha descrito su utilización en el cribado de su presencia en tomates y productos derivados (Van de Perre et al., 2014), en el estudio de la presencia de deoxinivalenol y sus metabolitos en el proceso de fabricación de cerveza (Kostelanska et al., 2011), y en el estudio de la presencia de aflatoxinas y otras micotoxinas en alimentos (Sirhan et al., 2013; Tanaka et al., 2006).

Para la realización de ensayos cuantitativos, y pesar de que tienen la misma repetibilidad y el mismo rango dinámico de cuantificación, los métodos multimicotoxinas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem ofrecen menores límites de detección y cuantificación que los desarrollados utilizando espectrometría de masas por tiempo de vuelo (Holčapek et al., 2012; Wang et al., 2013; Zachariasova et al., 2010).

Una nueva aproximación es el uso combinado de varias técnicas cromatográficas de detección para aprovechar, de forma combinada, las ventajas aportadas por cada una de ellas. En el trabajo realizado por Broecker et al., (Broecker et al., 2011) se describe el uso combinado de un equipo HPLC-QTOF-MS para la realización de un cribado de la presencia de posibles agentes toxicológicos en sangre y de otro equipo, HPLC-DAD, para la realización de la cuantificación de las sustancias detectadas. Lim et al. (Lim et al., 2015), realizaron el estudio cuantitativo de la presencia de moniliformina en cereales, mediante el uso combinado de un equipo de cromatografía acoplado con un detector de espectrometría de masas con trampa lineal de iones (HPLC-LIT-MS) y otro HPLC-QTOF-MS.

En esta parte de esta tesis doctoral, se realizó la optimización de un método UHPLC-Q-TOF-MS para su uso combinado con el método UHPLC-MS/MS descrito en el apartado anterior, y destinado a la realización de cribados para la identificación de otras posibles micotoxinas presentes en las muestras de piensos analizadas, utilizando una base de datos que contenía los datos de 245 posibles micotoxinas o metabolitos.

### **Optimización del método UHPLC-Q-TOF-MS**

---

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron similares a las desarrolladas en el método multimicotoxinas por UHPLC-MS/MS. Dado que uno de los objetivos del método de cribado desarrollado era trabajar de forma combinada con el método multimicotoxinas, se utilizó una columna cromatográfica idéntica (Waters BEH C18 Acquity™ UPLC™), y un gradiente, para la fase móvil con idénticos componentes: disolución acuosa con aditivos (0,15 mmol/L de

formiato amónico y 0,1 % (v/v) de ácido fórmico), y MeOH. No obstante, se alargó hasta 25 minutos el tiempo total de análisis, con el objetivo de conseguir una elución de las posibles micotoxinas presentes de forma gradual. Se comprobó la validez de dicho gradiente, inyectando un patrón multimicotoxinas de concentraciones 2 ng/mL de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 (c/u), 25 ng/mL de OTA, T2 y HT2 (c/u), 50 ng/mL de ZEA, 3-ADON, 15-ADON, FUSX y DAS, 250 ng/mL de DON, 375 ng/mL de FB1 y 125 ng/mL de FB2, comprobándose la identificación de todas ellas en modo ESI+ y ESI-, seleccionando las especies ionizadas correspondientes para ESI+  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  y la especie  $[M-H]^-$  en modo negativo.

El software utilizado en la determinación por UHPLC-Q-TOF-MS, disponía de una librería (Mycotoxin Spectral Library v1.1, AB Sciex) que contenía los datos correspondientes a 245 micotoxinas o metabolitos, y también los datos de otros metabolitos fúngicos y bacterianos. A través de los datos aportados en la misma, y con el apoyo de bibliografía (Bräse et al., 2013; Nielsen y Smedsgaard, 2003; Weidenböner, 2001), se procedió a establecer las condiciones de adquisición de espectros.

En modo MS, se seleccionó el intervalo de iones entre 100 y 2000 m/z ya que las 245 micotoxinas objeto del cribado tenían una relación m/z incluida dentro de ese intervalo. Para la adquisición de datos realizada durante el cribado, se establecieron como criterios de trabajo, un margen de error máximo en la medición de la masa exacta de 10 mDa, un umbral de intensidad de 100 cps, y la adquisición de datos en modo centroid. Los criterios establecidos tanto en relación al error máximo como al umbral de intensidad, son criterios restrictivos, cuya finalidad es evitar la selección errónea de posibles masas (falsos positivos).

En la adquisición de masas en modo MS, se utilizan habitualmente dos modos de adquisición: modo "profile" y modo "centroid". En el modo "profile", para cada masa (m/z), se representa un pico, que representa el conjunto de datos obtenidos en los sucesivos barridos (o "scans"). Su principal ventaja, es que permite visualmente diferenciar una verdadera señal cromatográfica de las correspondientes al ruido de fondo. En el modo "centroid", el conjunto de señales obtenidas se representa como una línea recta vertical, siendo su principal ventaja, que, para un mismo pico, el tamaño de la información generada es mucho menor.

En modo MS/MS, se seleccionó una energía de colisión de 35 eV. Aunque la librería de datos Mycotoxin Spectral Library, contenía los espectros MS/MS para 236 micotoxinas y metabolitos, adquiridos utilizando 20, 35 y 50 eV, se seleccionó 35 eV por ser la energía más común en fragmentaciones MS/MS en micotoxinas,

así como para aumentar la sensibilidad del sistema, centrando la monitorización en un conjunto de posibles espectros MS/MS, los adquiridos a esa energía de colisión, y no en las tres. En estas condiciones, se seleccionó un rango de trabajo de selección de iones producto de entre 50 y 500 m/z, ajustado siguiendo un doble criterio: permitir la selección de todos los iones producto generados, pero siendo este limitado para permitir al detector un mayor tiempo de lectura para cada una de las masas ("dwell time"). En estas condiciones, y seleccionando un máximo de tres iones producto por cada ion precursor, el tiempo de acumulación establecido fue de 75 ms, suficiente para el objetivo establecido. En conjunto, el tiempo total para cada ciclo de lectura (modo MS y MS/MS), fue de 1,1 segundos, siendo 250 ms el del modo MS.

Las muestras y patrones fueron inyectados dos veces, una en modo de ionización positivo (ESI+) y otra en modo negativo (ESI-). La finalidad, fue la identificación de las especies iónicas más probables generadas para cada micotoxina:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  y  $[M+NH_4]^+$  en modo positivo, y  $[M-H]^-$  en modo negativo. Aunque habitualmente, en espectrometría de masas aplicada al análisis de micotoxinas es el modo ESI+ el más empleado, se incluyó también el modo ESI-, con el fin de aumentar al máximo la capacidad de detección e identificación del método UHPLC-Q-TOF-MS.

### **Identificación de posibles micotoxinas acompañantes**

Como se ha comentado en la introducción de este apartado, del resultado de las inyecciones, a través del modo de trabajo IDA, se obtuvieron unas listas de iones denominadas XIC, a través de varios criterios. Habitualmente, los criterios establecidos, salvando la nomenclatura utilizada por cada marca comercial, son principalmente: el error másico ("mass error"), la diferencia de los tiempos de retención, la coincidencia del espectro MS/MS con la librería seleccionada ("purity score") y el error en la coincidencia del patrón isotópico ("isotope pattern") (Gosetti et al., 2012; Holčapek et al., 2012; Martínez Bueno et al., 2012; Vallverdú-Queralt et al., 2011; Wang et al., 2013).

El error másico es la diferencia entre la masa teórica o nominal de un determinado analito y la masa real, expresadas ambas en forma de relación carga/masa (m/z), siendo su unidad habitual ppm. Es el parámetro más importante y determinante para establecer la detección de un determinado analito. Se considera como aceptable un valor entre 5 y 10 ppm, y en el método desarrollado se estableció un valor de 5, es decir, el más restrictivo. En cuanto a la diferencia de tiempos de retención, criterio menos determinante, su valor se encuentra entre el 1% y el 5%, en función de las características del método

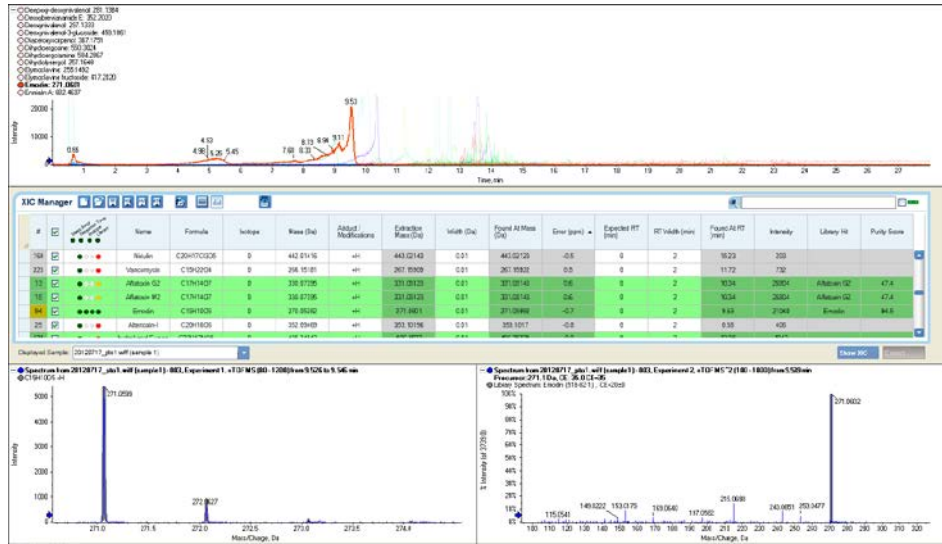
cromatográfico utilizado, siendo el valor escogido en el método aquí descrito el de 0,3 min (1,2%).

El error en la coincidencia del patrón isotópico (“isotope pattern”), mide las diferencias entre los distintos isótopos obtenidos para un mismo ion y los esperados. Esto es debido a que el espectrómetro es capaz de medir las diferentes masas de los distintos isótopos existentes para un mismo ion detectado. Su valor aceptable oscila entre un 10 y un 30%, siendo el escogido en el método, un 20%.

Por último, la coincidencia del espectro MS/MS con la librería seleccionada, denominado “purity score”, establece la concordancia entre los espectros MS/MS obtenidos para un determinado ion precursor, y los nominales o teóricos registrados en la librería o base de datos. Habitualmente se considera como aceptable valores entre el 50 y el 70%, en función de, al igual que el patrón isotópico, si se va a realizar posteriormente una revisión individualizada de los datos obtenidos, o si, por el contrario, es automatizado su análisis por el software.

Cuanto mayor es el valor asignado al “purity score” y menor al “isotope pattern”, menor es la tasa de falsos positivos, pero también mayor de falsos negativos. Por ello, se asignaron valores menos restrictivos para ambos parámetros, para poder realizar una valoración individualizada de los resultados positivos provisionales obtenidos. Posteriormente, se consideraron como presentes, todas aquellas micotoxinas cuyos iones obtenidos en las XIC obtenidas, cumplieran los criterios establecidos. Al conjunto de criterios aplicados, y de cara a la discusión de los resultados obtenidos en la aplicación del método UHPLC-Q-TOF-MS realizada en el apartado siguiente, se le denominará en adelante, *criterios QTOF*.

A modo de ejemplo, la Figura 44 muestra el proceso de identificación de una micotoxina acompañante, emodina, presente en una muestra comercial de pienso y determinada a partir del método UHPLC-Q-TOF-MS. En la parte superior de la imagen aparece el espectro XIC obtenido, mientras en la parte inferior aparece una fracción del listado de iones identificados según los criterios establecidos (*criterios QTOF*). La masa medida a través del detector para la emodina fue de 271.05992 (m/z), a través de la especie iónica  $[M+H]^+$ , y muy próxima a su masa nominal de 271.0601 m/z, con lo que el error de masas asignado fue de -0.7 ppm. La diferencia de los tiempos de retención y el error en el patrón isotópico, se incluían dentro de los criterios establecidos, y el “purity score” asignado fue de 84.5, por lo que se consideró positiva la identificación de emodina en la muestra de pienso.



**Figura 44.** Ejemplo de identificación de una micotoxina acompañante (emodina) en una muestra comercial, basado tanto en la medición precisa de la masa tanto en modo MS como en modo MS/MS

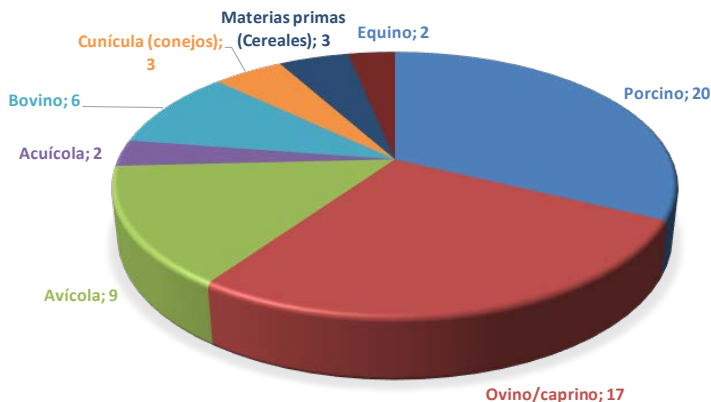
La espectrometría TOF, es decir, sin la obtención simultánea de espectros MS/MS, es también utilizada como técnica espectrométrica de cribado en muestras (Holčapek et al., 2012; Wang et al., 2013; Zachariasova et al., 2010). Por ello, posteriormente al análisis de los espectros XIC obtenidos aplicando los *criterios QTOF*, se procedió a un segundo análisis de los mismos, aplicando la metodología habitual de trabajo en TOF, es decir, sin tener en cuenta los espectros MS/MS obtenidos, con la intención de obtener datos adicionales de la posible presencia de otras micotoxinas acompañantes en las muestras analizadas. Los valores establecidos para el error másico, el error en los tiempos de retención y el patrón isotópico se mantuvieron, mientras que no se tuvo en cuenta el valor de “purity score”. Se estableció, no obstante, un criterio adicional relacionado con la resolución de los picos obtenidos, y su identificación unívoca frente al ruido de fondo, estableciendo un umbral mínimo de aceptación de intensidad de pico de 1500. A estos criterios aplicados, se le denominará, en adelante, *criterios TOF*.

## 4. Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de piensos comerciales

### 4.1. Selección y homogeneización de la muestra

Durante los años 2012, 2013 y 2014 se recogieron un total de 62 muestras comerciales de piensos destinados a alimentación y de materias primas para su fabricación, a través de tiendas y distribuidores locales y nacionales.

La recogida de muestras se realizó de forma que fuera lo más representativa posible de las características de la producción de piensos en España, teniendo en cuenta la disponibilidad en el acceso, y las características dentro del sector en la Comunidad Valenciana, donde el sector bovino es minoritario respecto a otras CCAA. Todos los piensos seleccionados, salvo 2 correspondientes a materias primas (cereales) para su elaboración, fueron piensos completos. La distribución de piensos en función de la especie se describe en la Figura 45.



**Figura 45.** Distribución de los piensos comerciales analizados según la especie ganadera a la que van destinados.

Para cada muestra, se tomó al menos 1 kg. A su entrada al laboratorio, siguiendo las recomendaciones indicadas en el Reglamento N° 401/2006 (European Commission, 2006b), fue triturada y homogeneizada cuidadosamente por completo, y almacenada en oscuridad a -18 °C.

---

## **4.2. Aplicación de la metodología desarrollada por HPLC-FLD y HPLC-DAD en la determinación de micotoxinas en piensos comerciales**

---

Los distintos métodos de rutina desarrollados por HPLC-FLD (AFB1, ZEA, FB1, FB2, T2 y HT2), y HPLC-DAD (DON), se aplicaron a las muestras comerciales seleccionadas, siguiendo la metodología que se indica a continuación.

---

### **4.2.1. Criterios y método de las secuencias de análisis**

---

Los piensos comerciales a analizar, se inyectaron en varias secuencias de trabajo para cada uno de los métodos de rutina desarrollados. En todas las secuencias de inyección realizadas y para todos los métodos, se establecieron los criterios que se indican a continuación.

Una vez estabilizado el sistema con la fase móvil correspondiente, se obtuvieron las curvas de calibrado según lo establecido para cada método. Se dieron por válidas, si cumplían los criterios establecidos:

- $R^2 \geq 0,99$
- CVFR  $\leq 20\%$ .

Así mismo, se comprobaron los tiempos de retención obtenidos para las micotoxinas de interés, inyectando un patrón de trabajo dentro del rango de cuantificación, al principio y al final de cada serie analítica y comprobando que la variación de los tiempos de retención era inferior al 5% del tiempo establecido en la validación. En los casos en los que se produjo alguna desviación, tanto en sus criterios de aceptación como en la variabilidad de los tiempos de retención, superior a los criterios establecidos, se procedió a la preparación nuevamente de la fase móvil, así como de una nueva curva de calibración.

Durante el proceso de extracción y purificación en cada serie analítica de las muestras comerciales de piensos, y para controlar la precisión y exactitud de cada método, se añadieron, en cada serie analítica, dos muestras de piensos exentos del analito de interés ("piensos blancos"), a las que se les adicionó concentraciones conocidas de la micotoxina a analizar ("muestras fortificadas"). De las dos muestras fortificadas, una de ellas siempre fue adicionada en el LOQ. En la otra se añadió la micotoxina a los otros dos niveles utilizados durante la



validación del método HPLC. El criterio de aceptación, fue el establecido en el Reglamento N° 401/2006. La Tabla 22 recoge los niveles de adición utilizados en las muestras fortificadas y el intervalo de recuperación porcentual establecido en el Reglamento N° 401/2006.

**Tabla 22.** Resumen de los niveles de concentración de las muestras fortificadas utilizadas en las series analíticas, así como los niveles de recuperación aceptables establecidos en el Reglamento N° 401/2006.

AFBI Nivel de fortificación en muestra (µg/kg)	Reglamento UE N° 401/2006 Intervalo % recuperación	Fumonisina B1. Nivel de adición en muestra (µg/kg)	Reglamento UE N° 401/2006 Intervalo % recuperación
2	70 al 110%	1800	70 al 110%
5	70 al 110%	3750	70 al 110%
20	80 al 110%	15000	70 al 110%
ZEA Nivel de fortificación en muestra (µg/kg)	Reglamento UE N° 401/2006 Intervalo % recuperación	Fumonisina B2. Nivel de adición en muestra (µg/kg)	Reglamento UE N° 401/2006 Intervalo % recuperación
50	70 al 120%	600	70 al 110%
100	70 al 120%	1250	70 al 110%
500	70 al 120%	5000	70 al 110%
Toxina T-2. Nivel de fortificación en muestra (µg/kg)	Reglamento UE N° 401/2006 Intervalo % recuperación	DON. Nivel de adición en muestra (µg/kg)	Reglamento UE N° 401/2006 Intervalo % recuperación
120	60 al 130%	400	60 al 110%
500	60 al 130%	1500	70 al 120%
1500	60 al 130%	5000	70 al 120%
Toxina HT-2. Nivel de fortificación en muestra (µg/kg)	Reglamento UE N° 401/2006 Intervalo % recuperación		
120	60 al 130%		
500	60 al 130%		
1500	60 al 130%		

Para controlar la reproducibilidad de los resultados obtenidos, se procedió a repetir, cada 15 muestras analizadas, una de ellas (“muestras duplicadas”), admitiéndose variaciones  $\leq 15\%$  entre los resultados obtenidos e invalidando los resultados para variaciones superiores.

El control de la posible variabilidad en la respuesta del equipo (sensibilidad del detector), dentro de cada serie analítica, se realizó, incluyendo en la serie analítica, el segundo de los puntos con menor concentración de la curva de calibrado inyectada al principio de la serie, cada 10 muestras inyectadas y al final de cada serie. Se estableció como criterio que la variación entre la concentración obtenida y su concentración nominal fuera  $\leq 15\%$ , e invalidando los resultados para variaciones superiores.

---

#### 4.2.2. Aplicación al análisis de muestras de piensos comerciales

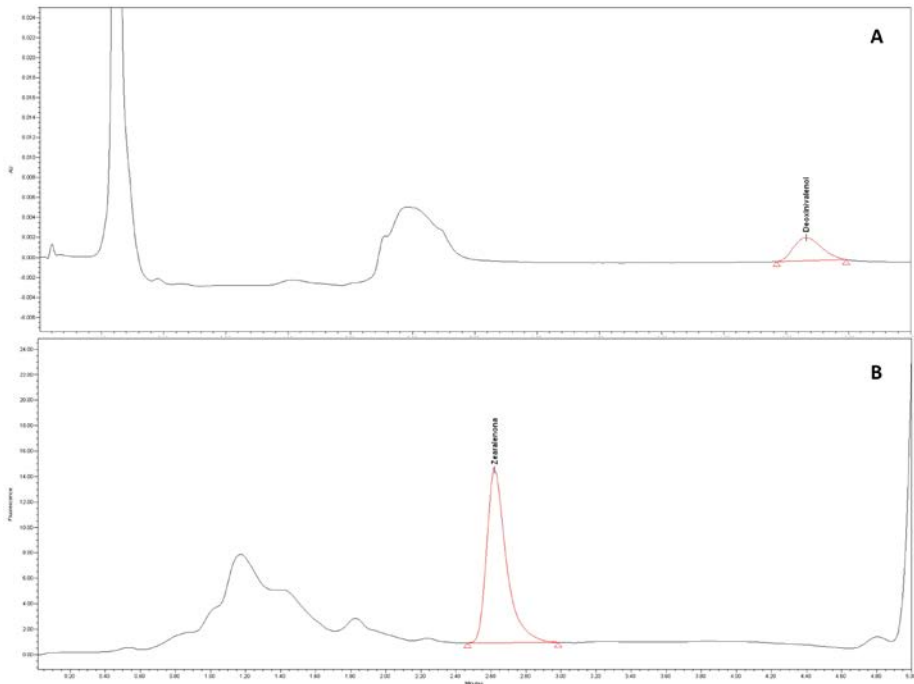
---

Los resultados obtenidos en el análisis de las 62 muestras comerciales de piensos fueron los siguientes (Tabla 23):

- El contenido en aflatoxina B1 para todas las muestras fue inferior al LOQ establecido (<2 µg/kg).
- El contenido en toxinas T-2 y HT-2 para todas las muestras fue inferior al LOQ establecido (<120 µg/kg).
- El contenido de fumonisinas FB1 y FB2 para todas las muestras fue inferior al LOQ establecido para ambas (<1800 µg/kg para FB1 y <600 µg/kg para FB2).
- En relación al contenido en zearalenona, 4 muestras de piensos presentaron niveles superiores al LOQ: 2 de piensos destinados a alimentación del sector ovino/caprino, uno para bovino y otro para conejos (cunícula). El mayor de los valores fue 96,4 µg/kg obtenido en un pienso para ovino/caprino. Todos los valores de concentración obtenidos en las muestras fueron inferiores a los valores de concentración establecidos en la Recomendación N° 576/2006 (European Commission, 2006d), que establece un valor orientativo en piensos complementarios y completos para terneros, ganado lechero, ovejas (incluidos los corderos) y cabras (incluidos los cabritos) de 500 µg/kg, para piensos con un contenido de humedad del 12%.
- En relación al contenido en deoxinivalenol, una muestra de pienso, destinado a alimentación de conejos, que también presentó valores superiores al LOQ para zearalenona (59,5 µg/kg), presentó niveles superiores al LOQ para deoxinivalenol: 837,7 µg/kg (Figura 46). El valor de concentración obtenido fue inferior al valor de concentración establecido en la Recomendación UE N° 576/2006 (European Commission, 2006d), para piensos complementarios y completos con un contenido de humedad del 12%, de 5000 µg/kg.

**Tabla 23.** Contenido en micotoxinas cuantificado en muestras comerciales mediante HPLC-FLD y HPLC-DAD

Tipo de pienso por especie animal	Contenido en $\mu\text{g/Kg}$	
	ZEA	DON
CUNICOLA N° 01	59,5	837,7
BOVINO N° 02	77,9	-
OVINO/CAPRINO N° 10	96,4	-
OVINO/CAPRINO N° 12	53,4	-



**Figura 46.** Cromatograma de un pienso para conejos contaminado con a) DON (837,7  $\mu\text{g/kg}$ ) y b) ZEA (59,5  $\mu\text{g/kg}$ ).

---

### **4.3. Aplicación de la metodología desarrollada por UHPLC-MS/MS y UHPLC-Q-TOF-MS en la determinación de micotoxinas en piensos comerciales**

---

Los métodos UHPLC-MS/MS y UHPLC-Q-TOF-MS se aplicaron, de forma combinada en el análisis de muestras de piensos comerciales. En primer lugar, se prepararon las secuencias de inyección para su análisis mediante el sistema UHPLC-MS/MS de 30 de las 62 muestras comerciales tomadas inicialmente. Estas fueron seleccionadas siguiendo como criterio, que presentaran niveles de cuantificación de micotoxinas a través de la aplicación de los métodos HPLC-FLD y HPLC-DAD desarrollados (4 muestras en total) y, además, se incluyeron aquellas que hubieran presentado trazas de posible presencia de micotoxinas a nivel cromatográfico, incluso por debajo del LOD establecido para cada una de las micotoxinas, o que hubieran resultado positivas en la identificación de hongos productores de micotoxinas, durante la identificación de la microbiota acompañante realizada mediante cultivo en placa y PCR.

#### **4.3.1. Realización de las secuencias de análisis mediante UHPLC-MS/MS**

---

Al comienzo de cada serie de inyecciones se preparó una curva de calibrado con efecto matriz ("matrix-matched calibration"). Se comprobó que todas las disoluciones inyectadas cumplían los criterios previamente establecidos ( $R^2 \geq 0,99$ , CVFR  $\leq 20\%$ ). Así mismo, se corroboró, mediante el análisis de los picos cromatográficos obtenidos, que la variación entre los tiempos de retención obtenidos a través de las curvas de calibrado, y los tiempos de retención determinados en la validación del método eran  $< 5\%$ .

En cada serie analítica, para controlar la precisión y exactitud del método, se incluyeron dos muestras de piensos exentos de micotoxinas ("piensos blancos"), a las que se les adicionó concentraciones conocidas de cada micotoxina a analizar ("muestras fortificadas"). Una de ellas fue siempre una muestra fortificada con niveles de concentración, para todas las micotoxinas, en el LOQ. Los niveles de concentración utilizados en la otra muestra fortificada, fueron variando entre los otros dos niveles analizados durante la validación del método UHPLC-MS/MS, para cada micotoxina. En la Tabla 24 se indican los niveles utilizados en las muestras fortificadas, tanto en la micotoxinas reguladas (izquierda) como aquellas de interés toxicológico importante (derecha).

**Tabla 24.** Resumen de los niveles de concentración de las muestras fortificadas utilizadas en las series analíticas mediante UHPLC-MS/MS, así como los niveles de recuperación establecidos en el Reglamento N° 401/2006.

Micotoxina	Nivel de adición (µg/kg)	Reglamento N° 401/2006 Intervalo % recuperación	Micotoxina	Nivel de adición (µg/kg)	Reglamento N° 401/2006 Intervalo % recuperación
<b>AFB<sub>1</sub></b>	2	70 al 110%	<b>AFB<sub>2</sub></b>	4	70 al 110%
	4	70 al 110%		20	80 al 110%
	20	80 al 110%	<b>AFG<sub>1</sub></b>	4	70 al 110%
<b>DON</b>	250	60 al 110%		20	80 al 110%
	500	60 al 110%	<b>AFG<sub>2</sub></b>	4	70 al 110%
	2500	70 al 120%		20	80 al 110%
<b>ZEA</b>	50	60 al 120%	<b>FUSX</b>	100	70 al 120%
	100	70 al 120%		500	70 al 120%
	500	70 al 120%	<b>3-ADON + 15-ADON</b>	100	70 al 120%
<b>OTA</b>	25	70 al 110%		200	70 al 120%
	50	70 al 110%		1000	70 al 120%
	250	70 al 110%	<b>DAS</b>	50	70 al 120%
	<b>FB<sub>1</sub></b>	375		60 al 120%	100
750		70 al 110%		500	70 al 120%
3750		70 al 110%			
<b>FB<sub>2</sub></b>	125	60 al 120%			
	250	60 al 120%			
	1250	70 al 110%			
<b>T2</b>	25	60 al 130%			
	50	60 al 130%			
	250	60 al 130%			
<b>HT2</b>	25	60 al 130%			
	50	60 al 130%			
	250	60 al 130%			

Las recuperaciones obtenidas para cada micotoxina fueron evaluadas, en función de la concentración teórica utilizada, según lo establecido en el Reglamento N° 401/2006, y para aquellas micotoxinas no incluidas (DAS, FUSX, 3-ADON, 15-ADON), se aplicó el criterio establecido para DON en el mismo. En todos los casos las recuperaciones obtenidas se consideraron aceptables si estaban dentro de los intervalos admitidos por el Reglamento N° 401/2006, y en caso contrario, se repitió la serie analítica. Los resultados de recuperaciones obtenidos a través de las muestras fortificadas se incluyeron en los cálculos incluidos en la validación del método UHPLC-MS/MS, en condiciones de reproducibilidad.

Para controlar la reproducibilidad de los resultados obtenidos, se procedió a repetir la inyección en una de cada 15 muestras analizadas (“muestras duplicadas”), admitiéndose variaciones  $\leq 15\%$  entre los resultados obtenidos y estableciendo, como criterio, la no validez de los resultados obtenidos para variaciones superiores. En todos los casos, los resultados de muestras duplicadas fueron inferiores al criterio establecido.

#### **4.3.2. Resultados obtenidos mediante UHPLC-MS/MS**

Los resultados del análisis del conjunto de las 30 muestras comerciales analizadas indicaron que, en conjunto, se cuantificaron micotoxinas ( $>LOQ$ ) en 9 de los piensos analizados, aunque en ningún caso se superó los límites legales establecidos por la Directiva 32/2002 (European Parliament, 2012b), y las Recomendaciones de la Comisión Europea N° 576/2006 (European Commission, 2006d) y N° 165/2013 (European Commission, 2013). La distribución por tipo de pienso de estas muestras, con concentraciones de micotoxinas superiores al LOQ fue: Bovino (3), ovino/caprino (2), porcino (2), avícola (1) y cunícola (1).

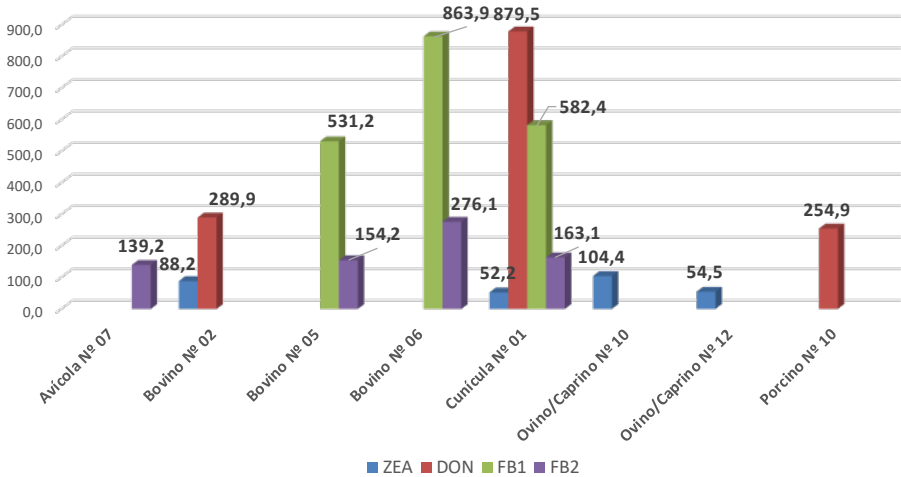
La distribución de los resultados para estas muestras se indica en la Figura 47, mientras que la Tabla 25 muestra el conjunto de los datos obtenidos de concentraciones, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de las muestras analizadas por UHPLC-MS/MS (en azul), así como aquellas identificadas a través de su espectro MS/MS.

ZEA, DON, FB1 y FB2 fueron las micotoxinas cuantificadas, en 4 piensos para ZEA y FB2, y en 3 piensos para FB1 y DON. Los niveles cuantificados más altos correspondieron a DON (879,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en una muestra de pienso para alimentación de conejos, y a FB1 (863,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) para una muestra de pienso destinado a alimentación de ganado bovino, siendo además ambas muestras, las que presentaron niveles cuantificables para tres micotoxinas; FB1, FB2 y ZEA en la muestra para ganado bovino, y DON, FB1 y FB2 para la muestra para conejos (cunícula).

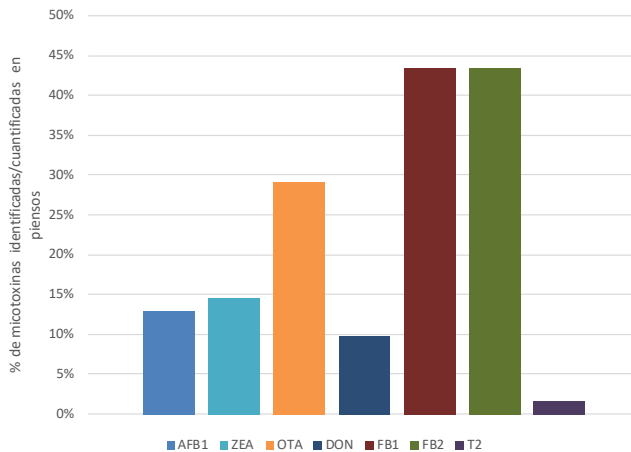
No se detectaron niveles cuantificables de las micotoxinas aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), toxinas T-2 y HT-2 (T2, HT2), diacetoxiscirpenol (DAS), fusarenona X (FUSX), ni 3 y 15-acetildeoxinivalenol, expresado como suma.

El método UHPLC-MS/MS se optimizó y validó, en relación a su rango de cuantificación, teniendo en cuenta los actuales límites establecidos para micotoxinas en piensos dentro de la Unión Europea, que son sensiblemente más altos que los establecidos en alimentación humana. Por ello, y con el fin de

obtener más información toxicológica de los resultados obtenidos, se procedió a la identificación de la presencia de trazas no cuantificables de todas las micotoxinas, mediante el estudio de los espectros MS/MS tanto del ion precursor como cualificador para cada una de ellas. Se consideró identificable, aquella micotoxina en las que ambos espectros MS/MS (ion cuantificador e ion cualificador) estuvieran presentes, con al menos una relación de 3:1 en su relación señal/ruido (s/n, "signal/noise"). Los datos obtenidos se indican en la Figura 48 y la Tabla 25.



**Figura 47.** Distribución y niveles de concentración de las micotoxinas cuantificadas mediante UHPLC-MS/MS (en µg/kg)



**Figura 48.** Distribución de las micotoxinas detectadas y/o cuantificadas en piensos

**Tabla 25.** Resumen de los datos de concentraciones obtenidos en el análisis por UHPLC-MS/MS (en µg/kg).

TIPO DE PIENSO	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	ZEA	OTA	DON	FBI	FB2	T2+HT2	DAS	FUSX	3 y 15 ADON
AVICOLA Nº 01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 03	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 07	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	139,2	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVICOLA Nº 09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACUICOLA Nº 01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACUICOLA Nº 02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BOVINO Nº 01	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
BOVINO Nº 02	ND	ND	ND	ND	88,2	D	289,9	D	D	ND	ND	ND	ND
BOVINO Nº 03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BOVINO Nº 04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BOVINO Nº 05	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	531,2	154,2	ND	ND	ND	ND
BOVINO Nº 06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	863,9	276,1	ND	ND	ND	ND
CUNICOLA Nº 01	D	ND	ND	ND	52,2	ND	879,5	582,4	163,1	ND	ND	ND	ND
CUNICOLA Nº 02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	ND	ND	ND
CUNICOLA Nº 03	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EQUINO Nº 01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EQUINO Nº 02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 01	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 05	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 06	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 10	ND	ND	ND	ND	104,4	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 12	D	ND	ND	ND	54,5	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 13	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 15	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
OVINO/CAPRINO Nº 17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 01	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 06	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 07	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 10	D	ND	ND	ND	ND	D	254,9	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 11	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 14	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 15	D	ND	ND	ND	D	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 17	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PORCINO Nº 20	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND

Azul: Muestras analizadas por UHPLC-MS/MS y HPLC-FLD/DAD. Gris: Muestras analizadas por HPLC-FLD/DAD, ND: No detectada, D: Detectada. Rojo: valores cuantificados.



Se detectaron trazas en el 50% de las muestras analizadas tanto por HPLC-FLD/DAD como por UHPLC-MS/MS, siendo las micotoxinas más frecuentes AFB1, OTA, ZEA, DON, FB1, FB2 y T2. Las micotoxinas con una incidencia más alta fueron FB1 (44%), FB2 (44%) y OTA (29%).

La metodología desarrollada por UHPLC-MS/MS tenía, salvo para las aflatoxinas y ZEA, límites de detección y cuantificación sensiblemente más bajos que la desarrollada para HPLC-FLD y HPLC-DAD, siendo ambos acordes a los requisitos de concentración de micotoxinas en piensos establecidos en la legislación de la Unión Europea.

Al comparar los resultados obtenidos de valores por encima del límite de cuantificación mediante la metodología HPLC-FLD y HPLC-DAD, para ZEA y DON e indicados en la Tabla 23, se comprobó que eran similares a los valores obtenidos mediante UHPLC-MS/MS, siendo la máxima desviación encontrada para ambos resultados de un 13,2% (ZEA HPLC-FLD: 77,9 µg/kg / ZEA UHPLC-MS/MS: 88,2 µg/kg).

Todos los valores cuantificados por UHPLC-MS/MS para FB1, FB2 y dos de los indicados para DON (289,9 y 254,9 µg/kg), que no fueron cuantificados a través de los métodos HPLC-FLD y HPLC-DAD respectivamente, fue resultado del menor LOQ asignado para estas micotoxinas en el método UHPLC-MS/MS. Además, se confirmó el criterio elegido al seleccionar el conjunto de piensos a analizar mediante el sistema UHPLC-MS/MS, ya que las trazas (valores < LOQ) detectadas mediante HPLC-FLD y HPLC-DAD fueron confirmadas mediante la identificación de los espectros MS/MS comentada anteriormente. En aquellas muestras comerciales, seleccionadas en función de su microbiota detectada, en las que no se identificó ninguna traza para las micotoxinas por HPLC-FLD y HPLC-DAD, también fue confirmada la ausencia de dichas trazas mediante UHPLC-MS/MS.

Por tanto, y para la determinación del control de micotoxinas en piensos comerciales, en función de los niveles de concentración establecidos actualmente en la legislación europea, las metodologías HPLC-FLD/HPLC-DAD y UHPLC-MS/MS son comparables en cuanto a los límites de detección y cuantificación alcanzables para ambas. Por ello, los motivos para la selección de una u otra metodología deben regirse por otras razones, como económicas, volumen de muestras, tiempo de análisis, etc.

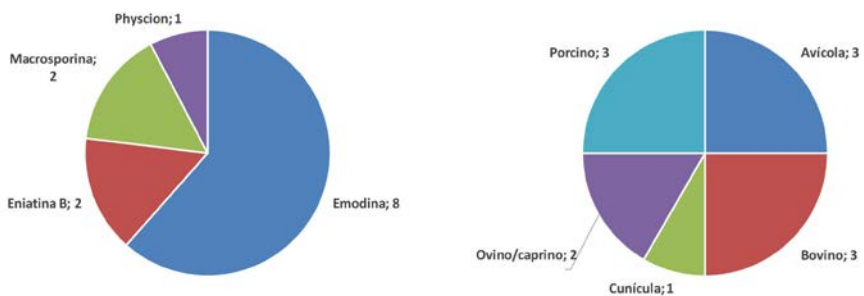
### 4.3.3. Identificación de otras posibles micotoxinas presentes mediante UHPLC-Q-TOF-MS

Se aplicó la metodología desarrollada por UHPLC-Q-TOF-MS para la identificación de otras posibles micotoxinas presentes, en aquellos piensos con niveles de concentración determinados mediante análisis por UHPLC-MS/MS, que hubieran presentado niveles significativos en sus trazas o que hubieran resultado de interés en función del estudio de la microbiota acompañante realizado mediante cultivo en placa y PCR. En conjunto cumplieron dichos requisitos 14 muestras de piensos comerciales: porcino (5), bovino (4), ovino/caprino (3), avícola (1) y cunícula (1).

En la preparación de las secuencias de análisis se utilizaron aquellos viales correspondientes a las muestras seleccionadas, utilizados previamente en su análisis por UHPLC-MS/MS. Se incluyeron, además, varios viales de las muestras fortificadas utilizadas para el control de la precisión y exactitud, con el fin de que sirvieran de control en la realización del cribado.

#### Identificación de micotoxinas a través de medición de masa y espectros MS/MS

Las micotoxinas identificadas, según los criterios denominados previamente como *criterios QTOF* ("mass error" <5 ppm, "purity score">70, diferencias de tiempos de retención <0,3 min y error en el patrón isotópico<20), se indican en la Tabla 26. Los resultados, agrupados en función del tipo de micotoxina identificada o en función del tipo de pienso, se indican en la Figura 49.



**Figura 49.** Distribución de los resultados de otras micotoxinas presentes (purity score  $\geq 70$ ), en función del tipo de micotoxina (izquierda) o tipo de pienso (derecha).

**Tabla 26.** Distribución de otras micotoxinas presentes mediante UHPLC-Q-TOF-MS (purity score  $\geq 70$ ).

Tipo de pienso	Micotoxina o metabolito	Formula molecular	Masa nominal	Masa nominal ion precursor	Masa determinada ion precursor	Error masa	Tipo de ionización	Tiempo retención	Purity score	Intensidad	Area
Ovino/caprino N° 10	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,060024	-0,280633	+H	10,14	96%	29376,8	4657,2
Bovino N° 02	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,059546	-2,044951	+H	9,53	93%	9661,8	1275,6
Ovino/caprino N° 12	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,060087	-0,047787	+H	10,12	96%	46296,7	6617,7
Bovino N° 05	Macrosporina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284,068474	285,075750	285,075551	-0,698485	+H	8,95	72%	16827,7	4334,4
Porcino N° 10	Eniatina B	C <sub>33</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	639,409481	657,443307	657,441507	-2,737981	+NH <sub>4</sub>	13,08	81%	40014,4	2121,1
Ovino/caprino N° 04	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,059834	-0,980663	+H	9,50	85%	28173,8	4552,6
Porcino N° 15	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,060047	-0,197542	+H	9,50	83%	103558,7	21227,1
	Phycion	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284,068474	285,075750	285,075704	-0,161992	+H	8,93	72%	42276,0	13589,9
Avicola N° 07	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,059893	-0,764900	+H	10,01	74%	206838,5	32262,1
Bovino N° 01	Eniatina B	C <sub>33</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	639,409481	657,443307	657,440200	-4,725815	+NH <sub>4</sub>	13,08	81%	52631,7	3435,4
Cunicula N° 01	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,059755	-1,274017	+H	9,50	91%	9881,9	1715,7
Avicola N° 03	Emodina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,052824	271,060100	271,059825	-1,013772	+H	10,03	79%	219772,8	34876,4
	Macrosporina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284,068474	285,075750	285,075505	-0,860016	+H	9,64	70%	87023,2	10204,0

Todas las micotoxinas identificadas y/o cuantificadas previamente por UHPLC-MS/MS (FB1, FB2, DON, ZEA, etc.) fueron a su vez confirmadas mediante su identificación a través de UHPLC-Q-TOF-MS. Su presencia en las tablas de resultados de este apartado se ha omitido para facilitar su análisis.

Emodina fue la micotoxina más frecuentemente identificada (57% de los piensos analizados). Eniatina B, macrosporina y phycion fueron las otras micotoxinas acompañantes identificadas. Todas fueron identificadas en modo ESI+, siendo la especie ionizada mayoritariamente utilizada, [M+H]<sup>+</sup>.

La emodina es una micotoxina producida principalmente por *Aspergillus wentii* y *Aspergillus ochraceus* (Pitt y Hocking, 2009a) y actualmente está siendo objeto de estudio por sus propiedades anticancerígenas y como tratamiento para la diabetes tipo II (Feng et al., 2010). La macrosporina es una micotoxina producida por varios hongos del género *Alternaria* (*A. porri*, *A. solani* Sorauer, *A. bataticola* Ikata, *A. cucumerina* (Ellis & Everh.) J.A. Elliott) (EFSA, 2011b). La eniatina B, como ya se comentó en la introducción, se encuentra dentro del grupo de las micotoxinas emergentes y es, dentro del grupo de las eniatinas, las más activa toxicológicamente. Por último, phycion o parietina, es un metabolito secundario de *Xanthoria parietina* (Basile et al., 2015).

Posteriormente, se realizó la identificación de aquellas micotoxinas con "purity score" dentro del intervalo 50-70%, siendo identificada macrosporina en

dos muestras de pienso avícola (Nº 03 y Nº 07), con purity score de 59% y 69%, y brefeldina A (Cunícula, Nº 01), micotoxina producida por *Alternaria carthami* Chowdhury (EFSA, 2011b) y encontrada en un pienso cunícula, con un “purity score” de 55%.

Finalmente, se aplicó el criterio de identificación de otras micotoxinas presentes en las muestras de piensos, prescindiendo de los espectros MS/MS obtenidos y denominado *criterios TOF*, realizando la identificación a través de la medición de la masa exacta de las formas ionizadas de las posibles micotoxinas presentes y su comparación con las existentes en la correspondiente base de datos (Mycotoxin Spectral Library v1.1, AB Sciex). En los apartados siguientes se comentan los resultados obtenidos para cada una de las formas ionizadas estudiadas  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  y  $[M-H]^-$ .

### **Identificación de micotoxinas a través de la forma ionizada $[M-H]^-$**

A través de la utilización de la interfaz de ionización ESI, en modo negativo, se obtiene, como forma molecular ionizada y mayoritaria, la originada por deshidrogenación y cargada electrónicamente en modo negativo,  $[M-H]^-$ . La Tabla 27 refleja, para todos los piensos analizados, el conjunto de micotoxinas presentes en la base de datos que fueron identificadas a través de la forma ionizada  $[M-H]^-$ . En gris se indica, además, aquellas micotoxinas identificadas utilizando también otras formas de ionización. La Figura 50 muestra la distribución de las micotoxinas identificadas en función de su incidencia.

El alternariol metil éter, 2-amino-14,16-dimetiloctadecan-3-ol, estaurosporina y eniatina A1, fueron las principales micotoxinas identificadas en función de su incidencia. Alteraniol metil éter, junto con alternariol, son las principales micotoxinas benzopironas producidas por *Alternaria* spp., y se ha comprobado su mutagenicidad *in vitro*, aunque las evidencias sobre su capacidad carcinogénica son limitadas (Scott et al., 2012).

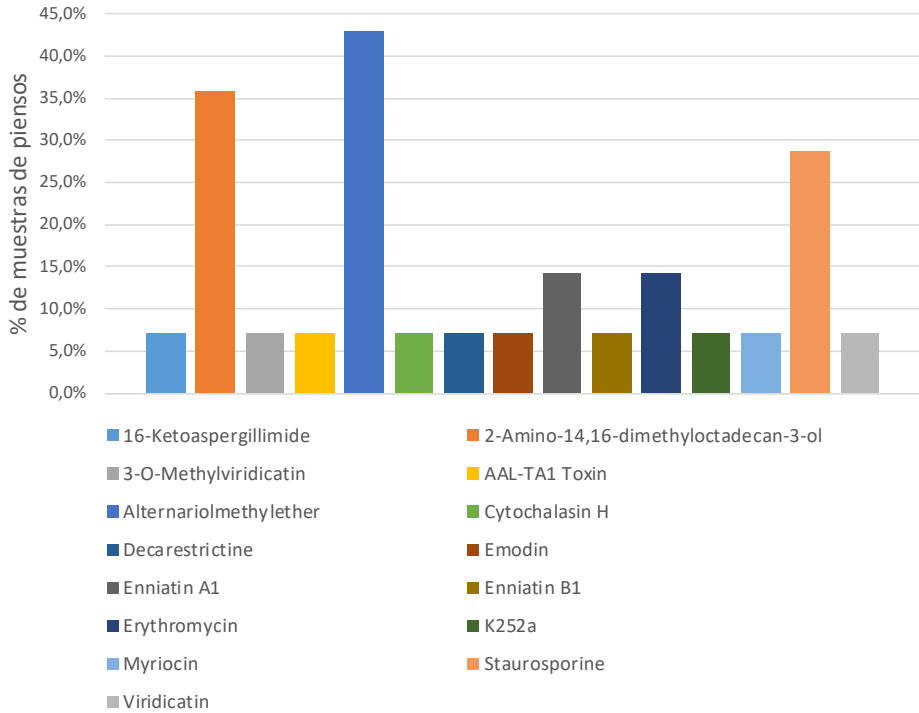
El 2-amino-14,16-dimetiloctadecan-3-ol (2-AOD-3-ol), es considerado, junto con las toxinas AAL y las fumonisinas, un grupo de micotoxinas denominadas análogas de la esfingosina, debido a su similitud estructural con esta, siendo un producto intermedio en la biosíntesis de los esfingolípidos (Uhlig et al., 2005). La estaurosporina es un potente inhibidor de las enzimas quinasas proteicas (Meggio et al., 1995), y existen evidencias de su capacidad para producir apoptosis en células endoteliales de la córnea (Thuret et al., 2003).

**Tabla 27.** Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada [M-H]<sup>-</sup>.

Tipo de pienso	Micotoxina o metabolito	Formula molecular	Masa nominal	Masa nominal [M-H] <sup>-</sup>	Masa determinada [M-H] <sup>-</sup>	Error masa	Tiempo retención	Intensidad	Area
Porcino N° 17	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	312,327189	312,326304	-2,832424	15,04	91525,3	4551,4
	Alternariolmethylether	C15H12O5	272,068474	271,061197	271,060599	-2,205361	10,03	201426,1	40795,3
	16-Ketoaspergillimide	C20H27N3O4	373,200157	372,192880	372,191065	-4,875980	0,62	8940,3	2741,4
Porcino N° 10	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	312,327189	312,326564	-2,002384	15,09	212081,9	11828,2
	Alternariolmethylether	C15H12O5	272,068474	271,061197	271,060311	-3,270218	10,03	14008,9	1979,3
Porcino N° 15	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	312,327189	312,325854	-4,273923	15,08	117822,4	6357,6
	Alternariolmethylether	C15H12O5	272,068474	271,061197	271,060291	-3,344171	10,04	250267,1	43453,1
	Enniatin A1	C35H61N3O9	667,440781	666,433505	666,432903	-0,903402	14,45	50379,7	3867,9
	Stauroporine	C17H16O7	332,089603	331,082327	331,081928	-1,204645	10,67	29518,5	2902,1
Bovino N° 02	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	312,327189	312,326233	-3,061369	16,38	4337,1	374,5
	3-O-Methylviridicatin	C16H13NO2	251,094629	250,087352	250,086466	-3,543821	13,64	3922,9	172,2
Ovino/capriño N° 12	Alternariolmethylether	C15H12O5	272,068474	271,061197	271,060514	-2,520346	10,56	89922,6	10503,3
	Emodin	C15H10O5	270,052824	269,045547	269,044628	-3,416768	10,61	10293,6	1662,6
	Stauroporine	C17H16O7	332,089603	331,082327	331,081952	-1,133131	10,65	221763,1	52396,6
Bovino N° 01	AAI-TAI Toxin	C25H47NO10	521,319997	520,312721	520,310861	-3,575256	13,79	18580,9	1825,8
	Viridicatin	C18H22O5	318,146724	317,139448	317,138127	-4,164240	11,17	45901,0	4825,4
Cunicula N° 01	Erythromycin	C37H67NO13	733,461242	732,453966	732,453513	-0,618153	12,88	2454,1	1013,0
Bovino N° 05	Alternariolmethylether	C15H12O5	272,068474	271,061197	271,060474	-2,668227	10,02	143430,5	23679,6
	Myricetin	C21H39NO6	401,277738	400,270462	400,269852	-1,522812	11,60	1847,7	1171,2
	Stauroporine	C17H16O7	332,089603	331,082327	331,081052	-3,849407	10,66	18622,0	1501,9
	Cytochalasin H	C30H39NO5	493,282824	492,275547	492,277598	4,164958	13,73	12905,5	631,6
	Decarestrictine	C10H16O5	216,099774	215,092497	215,093081	2,713137	24,29	4639,5	221,3
Porcino N° 01	Enniatin A1	C35H61N3O9	667,440781	666,433505	666,434774	1,904868	14,47	41040,9	2793,0
	Enniatin B1	C34H59N3O9	653,425131	652,417855	652,416197	-2,540556	14,31	7638,3	482,0
	K252a	C27H21N3O5	467,148121	466,140845	466,141490	1,383554	16,51	9974,0	714,2
	Stauroporine	C17H16O7	332,089603	331,082327	331,080808	-4,586601	10,66	49137,7	6974,7
	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	312,327189	312,326531	-2,105330	14,94	114398,2	6183,7
Avicola N° 03	Alternariolmethylether	C15H12O5	272,068474	271,061197	271,060204	-3,663250	10,33	199412,9	25150,0
	Erythromycin	C37H67NO13	733,461242	732,453966	732,451091	-3,924428	12,89	3096,2	1116,0

Al estar incluidos en la base de datos utilizada, otros metabolitos fúngicos y bacterianos, además de las micotoxinas, se identificó eritromicina (“erythromycin”) en 4 de las muestras. La eritromicina es un compuesto macrólido utilizado habitualmente como antibiótico para el tratamiento de infecciones bacterianas producidas por varias especies del género *Streptococcus*, *Staphylococcus*, y *Haemophilus*, debido a su capacidad para inhibir la síntesis proteica. Es producida principalmente por *Streptomyces erythreus*.

A través de la utilización de la interfaz de ionización ESI, en modo positivo, se obtienen, de forma mayoritaria, tres formas ionizadas electrostáticamente positivas, si se produce la adición de un grupo amonio [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, sodio [M+Na]<sup>+</sup> o protonación [M+H]<sup>+</sup>, siendo esta última la forma molecular predominante. El estudio de la identificación de las posibles micotoxinas presentes se realizó por separado en función de cada forma ionizada.



**Figura 50.** Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada [M-H]<sup>-</sup>.

#### Identificación de micotoxinas a través de la forma ionizada [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

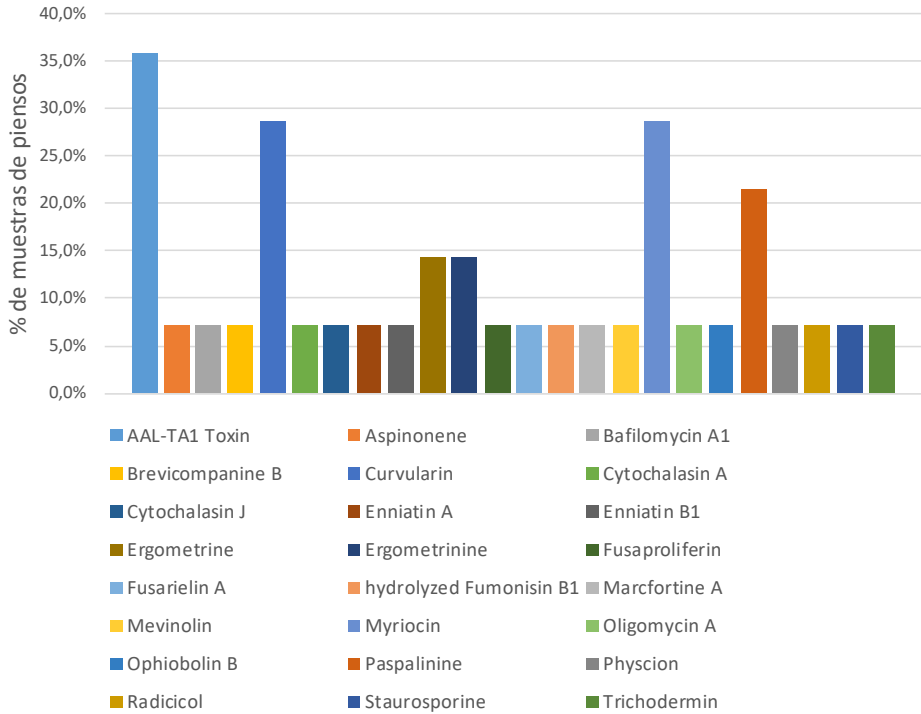
La Tabla 28 refleja, para todos los piensos analizados, el conjunto de micotoxinas presentes en la base de datos identificadas a través de la forma ionizada [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, mientras que la Figura 51 muestra la distribución de las micotoxinas identificadas en función de su incidencia. La Tabla 28, en gris, muestra aquella micotoxina identificada utilizando otras formas de ionización.

La toxina AAL-TA1, la curvularina, la miriocina y la paspalinina fueron las principales micotoxinas identificadas con mayor incidencia. La toxina AAL-TA1, forma parte del grupo de micotoxinas producida por *Alternaria* spp., y se ha comprobado su capacidad para producir apoptosis (muerte celular) en células de mamíferos y plantas (Oikawa et al., 1999). Curvularina es otra micotoxina producida por varias especies del género *Alternaria* (*A. cucumerina*, *A. cinerariae* Hori y Enjoji, *A. cucumerina* (Ellis & Everh.) J.A. Elliott, *A. tomato* (Cooke) L.R.

Jones) (EFSA, 2011b), y con similitud estructural con la zearalenona. La miriocina es un potente inmunosupresor producido por *Mycelia sterilia* (Caretti et al., 2014). La paspalina, producida por *Claviceps paspali*, es, junto con otros compuestos como paspalitrem A, B y C, paspalina y paspalicina, agentes indol-diterpenoides tremógenos, capaces de producir el síndrome denominado “temblor por paspali” en ganado (Uhlir et al., 2009).

**Tabla 28.** Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada  $[M+NH_4]^+$

Tipo de pienso	Micotoxina o metabolito	Formula molecular	Masa nominal	Masa	Masa	Error masa	Tiempo retención	Intensidad	Area
				nominal	determinada				
				$[M+NH_4]^+$	$[M+NH_4]^+$				
Porcino N° 10	Enniatin A	C36H63N3O9	681,456431	699,490257	699,493742	4,981712	14,89	13501,2	1070,4
	Radicicol	C22H23N5O2	389,185175	407,219001	407,220480	3,631506	0,91	464523,0	109666,6
Ovino/caprino N° 04	AAL-TAI Toxin	C25H47NO10	521,319997	539,353823	539,352174	-3,057891	12,50	5075,0	1817,4
	Ergometrine	C19H23N3O2	325,179027	343,212853	343,211234	-4,715850	12,04	17732,6	1194,3
	Ergometrinine	C19H23N3O2	325,179027	343,212853	343,211234	-4,715850	12,04	17732,6	1194,3
Porcino N° 15	Trichodermin	C22H27N3O3	381,205242	399,239068	399,237809	-3,151826	11,86	2096,0	1648,2
	AAL-TAI Toxin	C25H47NO10	521,319997	539,353823	539,352621	-2,228493	12,75	4563,5	1034,3
Avicola N° 07	Cytochalasin A	C29H35O5N	477,251524	495,285349	495,286482	2,287242	6,00	13584,4	3641,4
Bovino N° 02	Curvularin	C16H20O5	292,131074	310,164900	310,164476	-1,365680	0,76	969170,3	171065,4
	Myriocin	C21H39NO6	401,277738	419,311564	419,313467	4,537372	15,48	19879,9	5417,2
Ovino/caprino N° 12	Paspalinine	C32H39NO5	517,282824	535,316649	535,318753	3,930064	12,44	8400,6	1091,5
	AAL-TAI Toxin	C25H47NO10	521,319997	539,353823	539,355637	3,363519	12,74	5595,4	1727,9
	Staurosporine	C17H16O7	332,089603	350,123429	350,121809	-4,626224	9,80	4506,3	1080,5
Bovino N° 01	AAL-TAI Toxin	C25H47NO10	521,319997	539,353823	539,355302	2,742408	12,43	10256,9	5451,4
	Curvularin	C16H20O5	292,131074	310,164900	310,164664	-0,759620	0,76	4925,4	1082,5
	Enniatin B1	C34H59N3O9	653,425131	671,458957	671,457660	-1,931771	13,24	13923,3	900,4
	Ergometrine	C19H23N3O2	325,179027	343,212853	343,211554	-3,784711	11,80	29847,5	6175,0
	Ergometrinine	C19H23N3O2	325,179027	343,212853	343,211554	-3,784711	11,80	29847,5	6175,0
	Fusaproliferin	C27H40O5	444,287575	462,321400	462,320476	-2,000510	12,80	6021,6	1120,9
	Mevinolin	C24H36O5	404,256275	422,290100	422,288590	-3,577336	11,89	8829,8	1550,3
Cunicula N° 01	Physcion	C22H29N7O5	471,223017	489,256843	489,258151	2,673953	13,14	9858,9	480,5
	AAL-TAI Toxin	C25H47NO10	521,319997	539,353823	539,353895	0,134100	12,55	12853,9	7637,7
	Aspinonene	C9H16O4	188,104859	206,138685	206,138280	-1,962304	7,54	4753,3	1237,5
	Bafilomycin A1	C35H58O9	622,408084	640,441910	640,444058	3,354668	14,00	4184,0	1248,7
	Brevicompanine B	C22H29N3O2	367,225977	385,259803	385,258673	-2,933074	11,91	2409,3	1010,3
	Fusarielin A	C25H38O4	402,277010	420,310836	420,309118	-4,086943	12,02	31838,2	4445,7
	hydrolyzed Fumonisin B1	C22H47NO5	405,345424	423,379250	423,379546	0,701062	16,21	3572,7	1182,5
	Marcfortine A	C28H35N3O4	477,262757	495,296583	495,294184	-4,842310	12,33	3187,4	1109,8
	Myriocin	C21H39NO6	401,277738	419,311564	419,313149	3,778863	15,46	7481,3	1824,2
	Ophiobolin B	C25H38O4	402,277010	420,310836	420,309118	-4,086943	12,02	31838,2	4445,7
Porcino N° 01	Curvularin	C16H20O5	292,131074	310,164900	310,164603	-0,956912	0,76	7708,0	1738,7
	Myriocin	C21H39NO6	401,277738	419,311564	419,313112	3,691172	15,40	15476,1	1812,1
	Paspalinine	C32H39NO5	517,282824	535,316649	535,319011	4,411033	12,44	17892,6	1763,0
Avicola N° 03	Curvularin	C16H20O5	292,131074	310,164900	310,165095	0,630848	3,60	1166242,3	380901,3
	Cytochalasin J	C28H37NO4	451,272259	469,306085	469,308348	4,822638	13,25	43003,7	2420,3
	Myriocin	C21H39NO6	401,277738	419,311564	419,312770	2,876818	15,33	22445,1	2830,7
	Oligomycin A	C45H74O11	790,523114	808,556940	808,560910	4,910596	14,34	11200,1	1268,1
	Paspalinine	C32H39NO5	517,282824	535,316649	535,318941	4,281551	12,45	28310,0	2679,0

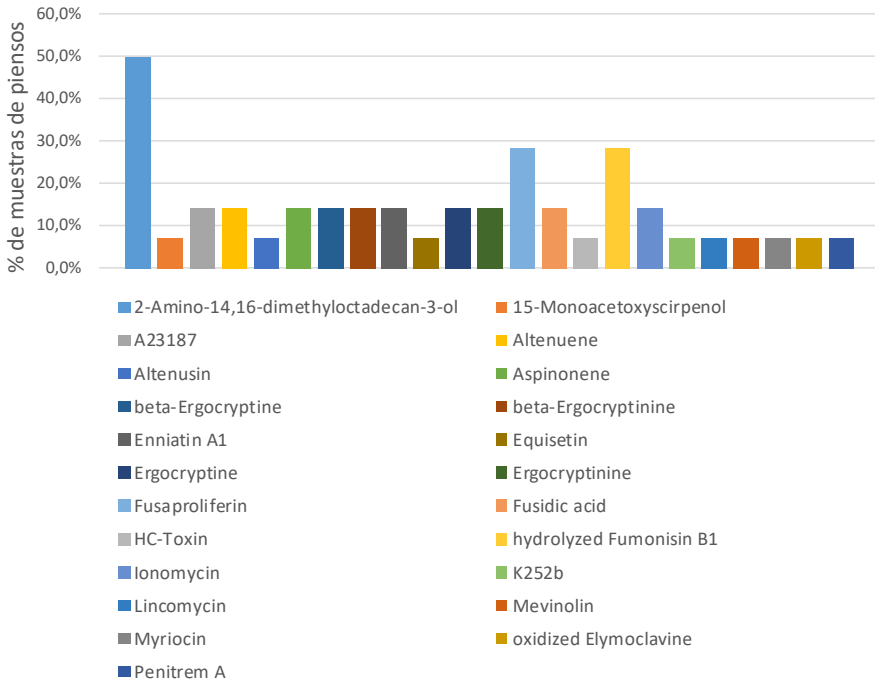


**Figura 51.** Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada  $[M-NH_4]^+$ .



### Identificación de micotoxinas a través de la forma ionizada [M+Na]<sup>+</sup>

La Tabla 29 refleja para todos los piensos analizados, el conjunto de micotoxinas presentes en la base de datos identificadas a través de la forma ionizada [M+Na]<sup>+</sup>, mientras que la Figura 52 muestra la distribución de las micotoxinas identificadas en función de su incidencia. La Tabla 29, en gris, muestra aquellas micotoxinas identificadas utilizando otras formas de ionización.



**Figura 52.** Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada [M+Na]<sup>+</sup>.

Al igual como ocurría en la identificación de micotoxinas realizada a través de la forma ionizada [M-H]<sup>-</sup>, el 2-AOD-3-ol es la principal micotoxina identificada en el estudio de las formas ionizadas [M+Na]<sup>+</sup>, junto con la fusaproliferina y la forma hidrolizada de fumonisina B<sub>1</sub>. La fusaproliferina es una de las denominadas toxinas emergentes, tal y como se comentó en la introducción, producida por varias especies del género *Fusarium*.

**Tabla 29.** Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada [M+Na]<sup>+</sup>

Tipo de pienso	Micotoxina o metabolito	Formula molecular	Masa nominal	Masa nominal [M+Na] <sup>+</sup>	Masa determinada [M+Na] <sup>+</sup>	Error masa	Tiempo retención	Intensidad	Area	
Porcino N° 17	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	336,323686	336,324834	3,411286	14,91	458264,3	29364,6	
Porcino N° 10	Fusaproliferin	C27H40O5	444,287575	467,276796	467,274646	-4,601606	13,58	16015,8	1247,0	
	Lincomycin	C18H34N2O6S	406,213759	429,202980	429,202173	-1,880318	0,61	6459,0	1312,4	
Ovino/caprino N° 10	Altenusin	C15H14O6	290,079038	313,068260	313,069465	3,848959	10,46	222765,4	44085,3	
Ovino/caprino N° 04	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	336,323686	336,325113	4,241734	14,89	34257,4	2023,1	
	Aspinonene	C9H16O4	188,104859	211,094080	211,093589	-2,327816	7,59	4400,9	1174,9	
	Fusaproliferin	C27H40O5	444,287575	467,276796	467,274737	-4,406673	13,57	7845,1	774,4	
	Fusidic acid	C31H48O6	516,345090	539,334311	539,332260	-3,803504	14,58	2225,0	235,8	
Avicola N° 07	A23187	C29H37N3O6	523,268236	546,257457	546,258349	1,632346	10,29	2628,1	199,9	
Bovino N° 02	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	336,323686	336,324511	2,452338	14,91	8670,7	586,1	
	A23187	C29H37N3O6	523,268236	546,257457	546,257462	0,008787	10,09	18568,4	1437,0	
	Enniatin A1	C35H61N3O9	667,440781	690,430002	690,431403	2,028193	13,87	1537,3	114,5	
	Fusaproliferin	C27H40O5	444,287575	467,276796	467,274928	-3,998310	13,59	13544,8	884,6	
	Fusidic acid	C31H48O6	516,345090	539,334311	539,331660	-0,914221	14,61	2850,4	222,4	
	hydrolyzed Fumonisin B1	C22H47NO5	405,345424	428,334645	428,334675	0,069805	12,47	25216,5	2273,7	
	K252b	C26H19N3O5	453,132471	476,121692	476,123748	4,317594	9,13	1934,6	159,9	
	oxidized Elymoclavine	C28H35N3O5	493,257672	516,246893	516,246585	-0,595649	10,66	3703,7	367,4	
	Penitrem A	C11H18O4	214,120509	237,109730	237,109421	-1,303625	14,63	1724,7	174,7	
	Ovino/caprino N° 12	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	336,323686	336,325026	3,982687	14,89	62246,5	3770,6
Bovino N° 01	Altenuene	C15H16O6	292,094688	315,083910	315,085397	4,720387	11,25	15884,7	1588,7	
	15-Monoacetoxyscirpenol	C17H24O6	324,157289	347,146510	347,148062	4,471217	11,28	24200,6	2241,7	
Cunicula N° 01	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	336,323686	336,325342	4,923518	14,90	324968,7	19228,2	
	Altenuene	C15H16O6	292,094688	315,083910	315,085175	4,017615	9,51	5512,2	2232,1	
	Aspinonene	C9H16O4	188,104859	211,094080	211,093637	-2,100091	7,55	7832,0	2164,9	
	beta-Ergocryptine	C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302809	4,710244	13,34	18084,5	897,9	
	beta-Ergocryptinine	C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302809	4,710244	13,34	18084,5	897,9	
	Enniatin A1	C35H61N3O9	667,440781	690,430002	690,429735	-0,387286	13,84	8765,3	647,5	
	Ergocryptine	C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302809	4,710244	13,34	18084,5	897,9	
	Ergocryptinine	C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302809	4,710244	13,34	18084,5	897,9	
	hydrolyzed Fumonisin B1	C22H47NO5	405,345424	428,334645	428,335632	2,304015	13,76	5117,2	1309,6	
	Ionomyacin	C41H72O9	708,517635	731,506856	731,507348	0,672304	14,83	6326,9	472,7	
	Myriocin	C21H39NO6	401,277738	424,266960	424,267587	1,478029	10,42	1506,1	385,3	
	Bovino N° 05	hydrolyzed Fumonisin B1	C22H47NO5	405,345424	428,334645	428,335040	0,922800	12,47	11680,5	2411,3
	Porcino N° 01	Fusaproliferin	C27H40O5	444,287575	467,276796	467,274797	-4,277190	13,58	12538,7	1165,4
	Avicola N° 03	2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol	C20H43ON	313,334465	336,323686	336,324561	2,600011	14,85	569324,1	40201,4
beta-Ergocryptine		C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302218	3,722941	13,34	31099,5	1631,7	
beta-Ergocryptinine		C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302218	3,722941	13,34	31099,5	1631,7	
Equisetin		C22H31NO4	373,225309	396,214530	396,215571	2,626817	9,60	164822,0	18053,8	
Ergocryptine		C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302218	3,722941	13,34	31099,5	1631,7	
Ergocryptinine		C32H41N5O5	575,310770	598,299991	598,302218	3,722941	13,34	31099,5	1631,7	
HC-Toxin		C21H32N4O6	436,232185	459,221406	459,220448	-2,085721	7,60	31659,6	2968,1	
Mevinolin		C24H36O5	404,256275	427,245496	427,243598	-4,442059	0,58	18860,3	1898,9	
Bovino N° 06	hydrolyzed Fumonisin B1	C22H47NO5	405,345424	428,334645	428,334743	0,227824	12,64	3874,4	414,2	
	Ionomyacin	C41H72O9	708,517635	731,506856	731,508387	2,092673	14,79	8588,6	552,9	

---

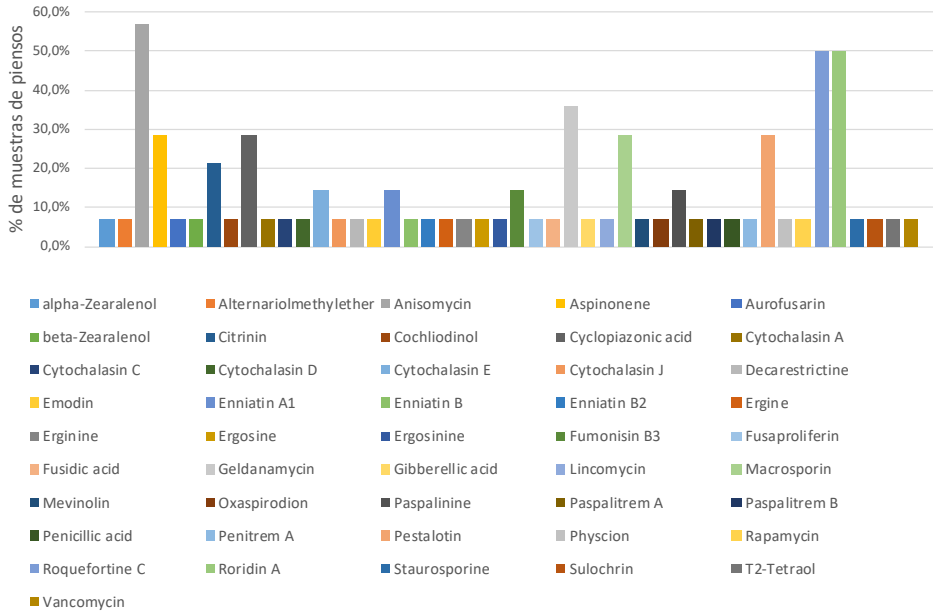
**Identificación de micotoxinas a través de la forma ionizada [M+H]<sup>+</sup>**

---

La Tabla 30 refleja, para todos los piensos analizados, el conjunto de micotoxinas presentes en la base de datos identificadas a través de la forma ionizada [M+H]<sup>+</sup>, mientras que la Figura 53 muestra la distribución de las micotoxinas identificadas en función de su incidencia. La Tabla 30, en gris, muestra aquella micotoxina identificada utilizando otras formas de ionización.

De todas las formas ionizadas estudiadas en la identificación de micotoxinas, la forma [M+H]<sup>+</sup> fue la que, con diferencia, permitió la identificación del mayor número de micotoxinas. Se identificaron un total de 46 micotoxinas distintas, siendo la roquefortina C, la roridina A, la geldanamicina, la pestalotina y el ácido ciclopiazónico las predominantes en función de su incidencia. La roquefortina A es producida por varias especies de hongos, especialmente del género *Penicillium*, siendo aislada por primera vez a partir de *Penicillium roqueforti*. Forma parte del grupo de micotoxinas 2,5-dicetopiperacinas y existen evidencias de efectos neurotóxicos por su ingestión en grandes dosis (Bünger et al., 2004). La roridina A es una micotoxina del grupo de los tricotecenos macrocíclicos, como otras roridinas (B, C, D, E), las verrucarinas y las mirotoxinas, y de las que existen evidencias de sus propiedades antileucémicas (Hughes et al., 1990, 1988).

Además, en un total de 7 muestras se detectó anisomicina, al encontrarse también incluida dentro de los datos de la base de datos utilizada y que además de micotoxinas, incluía otros metabolitos fúngicos o bacterianos. La anisomicina es utilizada habitualmente como antibiótico debido a su capacidad para inhibir la síntesis proteica, al actuar sobre la peptidil transferasa, en células eucariotas. Es producida principalmente por *Streptomyces griseolus* y *Streptomyces roseochromogenes* (J. Li et al., 2012).



**Figura 53.** Distribución, en función de su incidencia, de las micotoxinas y otros metabolitos fúngicos/bacterianos, identificados a través de la forma ionizada  $[M+H]^+$

**Tabla 30.** Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada  $[M+H]^+$ 

Tipo de pienso	Micotoxina o metabolito	Formula molecular	Masa nominal	Masa nominal $[M+H]^+$	Masa determinada $[M+H]^+$	Error masa	Tiempo retención	Intensidad	Area
Porcino N° 17	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,138706	0,079238	0,69	196020,3	40703,1
	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,138722	0,139889	0,60	295316,9	25253,1
	Aspinonene	C9H16O4	188,104859	189,112136	189,111923	-1,122193	7,58	3536,0	1068,6
Porcino N° 10	Emodin	C15H10O5	270,052824	271,060100	271,060101	0,003840	9,51	5107,9	1217,5
	Lincomycin	C18H34N2O6S	406,213759	407,221035	407,220995	-0,099191	0,88	480408,9	69802,6
	Roquefortine C	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130403	3,368330	0,54	12352,4	1350,3
	Roridin A	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130403	3,368330	0,54	12352,4	1350,3
	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,138271	-1,554738	0,68	9386,0	1864,2
Ovino/caprino N° 04	Aspinonene	C9H16O4	188,104859	189,112136	189,111686	-2,380239	7,58	9172,3	2910,3
	Aurofufuran	C30H18O12	570,079826	571,087103	571,084851	-3,943316	11,78	4030,9	312,7
	Cytochalasin C	C30H37O6N	507,262088	508,269365	508,270725	2,676825	13,14	2710,9	133,3
	Cytochalasin D	C30H37O6N	507,262088	508,269365	508,270725	2,676825	13,14	2710,9	133,3
	Cytochalasin E	C28H33O7N	495,225703	496,232979	496,232862	-0,236591	13,77	1836,5	114,9
	Enniatin A1	C35H61N3O9	667,440781	668,448058	668,446096	-2,935147	14,05	3821,2	240,9
	Fusaproliferin	C27H40O5	444,287575	445,294851	445,296534	3,777938	12,81	1891,4	274,5
	Geldanamycin	C29H40N2O9	560,273381	561,280658	561,281143	0,864417	13,34	5548,0	257,3
	Macrosporin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075433	-1,110752	8,94	8079,2	1104,6
	Paspalinine	C32H39NO5	517,282824	518,290100	518,289581	-1,001475	13,29	4224,3	414,1
	Pestalotin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075433	-1,110752	8,94	8079,2	1104,6
	Citrinin	C13H14O5	250,084124	251,091400	251,091250	-0,599804	0,75	37905,7	7671,0
	Porcino N° 15	Geldanamycin	C29H40N2O9	560,273381	561,280658	561,280640	-0,031393	13,35	5312,2
Paspalitre B		C8H10O4	170,057909	171,065185	171,064871	-1,839798	0,93	8966,3	2624,8
Roquefortine C		C30H22O10	542,121297	543,128574	543,131169	4,777906	0,52	10837,5	1127,7
Roridin A		C30H22O10	542,121297	543,128574	543,131169	4,777906	0,52	10837,5	1127,7
Avicola N° 07	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,138886	0,755907	1,28	233973,6	46069,7
	Cyclopiazonic acid	C20H20N2O3	336,147393	337,154669	337,154315	-1,051092	10,44	15641,0	1499,3
	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,137375	-4,921421	0,60	84507,3	9353,8
	Citrinin	C13H14O5	250,084124	251,091400	251,090761	-2,545371	0,76	107769,1	20343,1
	Cyclopiazonic acid	C20H20N2O3	336,147393	337,154669	337,153786	-2,620601	10,18	39006,8	4526,9
Bovino N° 02	Geldanamycin	C29H40N2O9	560,273381	561,280658	561,279908	-1,336800	13,36	5508,4	246,4
	Macrosporin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075031	-2,523094	8,97	3882,0	1111,7
	Paspalitre A	C27H33NO4	435,240959	436,248235	436,250324	4,788832	13,49	5817,0	514,3
	Penicillic acid	C8H10O4	170,057909	171,065185	171,064524	-3,863892	0,96	7997,8	2576,6
	Pestalotin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075031	-2,523094	8,97	3882,0	1111,7
	Roquefortine C	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,128039	-0,983977	0,52	9426,6	916,2
	Roridin A	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,128039	-0,983977	0,52	9426,6	916,2
	Aspinonene	C9H16O4	188,104859	189,112136	189,111595	-2,860168	14,01	40258,8	2837,3
	Cochlidiolol	C32H30N2O4	506,220558	507,227834	507,225578	-4,447718	12,40	2563,5	141,1
	Cyclopiazonic acid	C20H20N2O3	336,147393	337,154669	337,154659	-0,031466	10,17	17850,2	2456,0
Cunicula N° 01	Cytochalasin E	C28H33O7N	495,225703	496,232979	496,232519	-0,928122	13,77	2661,9	75,3
	Fumonisin B3	C34H59NO14	705,393556	706,400833	706,397640	-4,519333	12,01	5562,7	573,2
	Fusidic acid	C31H48O6	516,345090	517,352366	517,353331	1,865299	12,80	16644,1	1728,2
	Geldanamycin	C29H40N2O9	560,273381	561,280658	561,279686	-1,730888	13,34	5452,0	297,4
	Macrosporin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075349	-1,406907	8,94	2636,5	401,5
	Penitrem A	C11H18O4	214,120509	215,127786	215,127001	-3,647028	10,46	3312,1	581,2
	Pestalotin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075349	-1,406907	8,94	2636,5	401,5
	Roquefortine C	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130085	2,781657	0,54	20349,4	2191,6
	Roridin A	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130085	2,781657	0,54	20349,4	2191,6
	T2-Tetraol	C20H30O7	382,199154	383,206430	383,205355	-2,806390	11,07	4418,5	952,0
	Vancomycin	C15H22O4	266,151809	267,159086	267,158566	-1,944744	10,54	2809,5	1248,4
Bovino N° 05	Roquefortine C	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130886	4,258137	0,53	7548,1	799,5
	Roridin A	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130886	4,258137	0,53	7548,1	799,5
Porcino N° 01	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,138239	-1,676604	0,70	10055,9	1808,1

**Tabla 30.** Distribución de micotoxinas detectadas en base a su masa exacta (criterios TOF), para la forma ionizada  $[M+H]^+$  (continuación)

Tipo de pienso	Micotoxina o metabolito	Formula molecular	Masa nominal	Masa nominal $[M+H]^+$	Masa determinada $[M+H]^+$	Error masa	Tiempo retención	Intensidad	Area
Ovino/caprino N° 12	alpha-Zearalenol	C18H24O5	320,162374	321,169651	321,170407	2,356601	11,22	3099,6	387,3
	Alternariolmethylether	C15H12O5	272,068474	273,075750	273,075076	-2,470080	9,08	3367,1	697,0
	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,139069	1,443601	0,60	505742,1	55391,6
	Aspinonene	C9H16O4	188,104859	189,112136	189,111774	-1,914745	12,42	3677,2	332,3
	beta-Zearalenol	C18H24O5	320,162374	321,169651	321,170407	2,356601	11,22	3099,6	387,3
	Cyclopiazonic acid	C20H20N2O3	336,147393	337,154669	337,154027	-1,904112	10,16	1703,0	238,9
	Cytochalasin A	C29H35O5N	477,251524	478,258800	478,258670	-0,272149	13,59	2277,9	71,2
	Cytochalasin J	C28H37NO4	451,272259	452,279536	452,279247	-0,638480	13,45	10633,9	936,8
	Decastrictine	C10H16O5	216,099774	217,107050	217,107311	1,201251	21,14	2031,0	67,9
	Enniatin A1	C35H61N3O9	667,440781	668,448058	668,447658	-0,598426	16,29	5069,3	321,5
	Enniatin B	C33H57N3O9	639,409481	640,416758	640,417837	1,685552	13,09	1546,9	67,0
	Enniatin B2	C32H55N3O9	625,393831	626,401107	626,400806	-0,481891	13,82	4352,8	272,1
	Ergine	C16H17N3O	267,137162	268,144439	268,145074	2,367286	0,64	5643,2	1179,4
	Erginine	C16H17N3O	267,137162	268,144439	268,145074	2,367286	0,64	5643,2	1179,4
	Ergosine	C30H37N5O5	547,279470	548,286746	548,284200	-4,643910	11,50	1629,9	71,8
	Ergosinine	C30H37N5O5	547,279470	548,286746	548,284200	-4,643910	11,50	1629,9	71,8
	Fumonisin B3	C34H59NO14	705,393556	706,400833	706,403224	3,384954	14,15	1824,0	100,0
	Geldanamycin	C29H40N2O9	560,273381	561,280658	561,281045	0,690353	13,33	6721,0	277,4
	Gibberellic acid	C19H22O6	346,141639	347,148915	347,148295	-1,787197	11,27	4843,9	412,1
	Macrosporin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075818	0,236966	8,93	27304,5	5852,2
	Mevinolin	C24H36O5	404,256275	405,263551	405,264308	1,866536	12,61	2215,2	236,8
	Paspalinine	C32H39NO5	517,282824	518,290100	518,289773	-0,631001	13,31	1902,9	104,8
	Pestalotin	C16H12O5	284,068474	285,075750	285,075818	0,236966	8,93	27304,5	5852,2
	Phycion	C22H29N7O5	471,223017	472,230294	472,231356	2,249649	11,08	2653,5	249,8
	Rapamycin	C29H40O9	532,267233	533,274510	533,272524	-3,722981	11,84	1940,1	195,9
	Roquefortine C	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130935	4,346615	0,51	13814,3	1156,8
	Roridin A	C30H22O10	542,121297	543,128574	543,130935	4,346615	0,51	13814,3	1156,8
	Staurosporine	C17H16O7	332,089603	333,096880	333,095294	-4,758835	0,62	1693,0	229,0
	Sulochrin	C24H34O9	466,220283	467,227560	467,227721	0,345386	0,63	1539,7	161,0
	Avicola N° 03	Anisomycin	C14H19NO4	265,131408	266,138685	266,138458	-0,851319	1,30	7823,3
Citrinin		C13H14O5	250,084124	251,091400	251,091292	-0,429304	3,60	148885,4	41454,1
Oxaspirodion		C13H14O5	250,084124	251,091400	251,091292	-0,429304	3,60	148885,4	41454,1
Roquefortine C		C30H22O10	542,121297	543,128574	543,131203	4,841444	0,52	18617,9	1758,6
Roridin A		C30H22O10	542,121297	543,128574	543,131203	4,841444	0,52	18617,9	1758,6

---

#### 4.4. Micobiota potencialmente productora de micotoxinas en las muestras de piensos

---

Los resultados obtenidos en cuanto a presencia de hongos potencialmente productores de micotoxinas en las 62 muestras de piensos estudiadas son los que se describen a continuación. En primer lugar, en la Tabla 31 se recogen los resultados relativos al número de UFC/g en cada muestra a nivel de sección. Estos resultados representan la media de tres réplicas en cada uno de los dos medios de cultivo ensayados Patata glucosa agar y Patata diclorán agar.

Hay que destacar que, aunque la presencia de *Penicillium* spp. fue frecuente en las muestras de los diferentes tipos de piensos analizados, la identificación a nivel morfológico tanto mediante observación directa y microscópica de las colonias como mediante observación microscópica del micelio, conidios, estructuras reproductoras, etc. del hongo, descartó que se tratara de *P. verrucosum*, especie descrita como productora de OTA. Esta especie ha sido encontrada en cereales cultivados en regiones con climas fríos y es muy poco frecuente en España y países con climatología templada y cálida. En esta tabla, sin embargo, se puede observar que las especies diana, potencialmente productoras de micotoxinas, que deben ser identificadas son miembros de las secciones *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Liseola*, *Discolor* y *Sporotrichiella*. Por ello, la tarea de identificación de especies mediante técnicas de PCR específicas de especie se centró en *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. de estas secciones.

En la Figura 54 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a distribución de hongos de las diferentes secciones de ambos géneros en las muestras de piensos analizadas. Como se puede observar, las especies más abundante fueron las de la sección *Flavi* con un 68 % de muestras contaminadas, seguidas de las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, sección *Circumdati*, sección *Liseola*, sección *Discolor* y sección *Sporotrichiella* con un 42%, 34%, 23%, 24% y 3% de muestras contaminadas, respectivamente. La contaminación por especies de *Penicillium* spp. también fue muy significativa con un 44% de muestras contaminadas, aunque como se ha indicado anteriormente no fue detectada la especie *P. verrucosum*. Las especies menos abundantes fueron las del género *Alternaria* que solo se detectaron en un 10% de las muestras examinadas y otros *Aspergillus* en un 5% de las mismas.

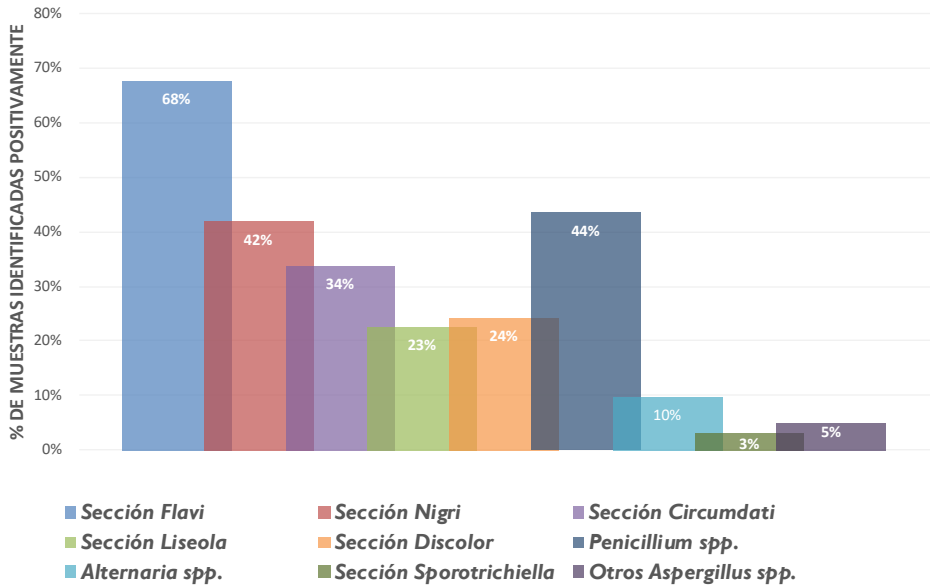
**Tabla 31.** Incidencia de esporas viables de hongos potencialmente productores de micotoxinas en diferentes tipos de piensos destinados al sector ganadero en España.

TIPO DE PIENSO	Sección Flavi	Sección Nigri	Sección Circumdati	Sección Liseola	Sección Discolor	Penicillium spp.	Alternaria spp.	Sección Sporotrichiella	Otros Aspergillus spp.
AVICOLA Nº 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 02	-	2,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	5,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
AVICOLA Nº 03	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	2,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
AVICOLA Nº 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 05	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-
AVICOLA Nº 06	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 07	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 08	-	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACUCOLA Nº 01	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	4,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
ACUCOLA Nº 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BOVINO Nº 01	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,0 × 10 <sup>3</sup>	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,6 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-
BOVINO Nº 02	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	1,0 × 10 <sup>2</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
BOVINO Nº 03	-	2,5 × 10 <sup>2</sup>	-	1,4 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
BOVINO Nº 04	-	-	-	-	1,0 × 10 <sup>2</sup>	2,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
BOVINO Nº 05	1,5 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	2,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
BOVINO Nº 06	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	2,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
CUNICOLA Nº 01	1,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-
CUNICOLA Nº 02	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-
CUNICOLA Nº 03	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
EQUINO Nº 01	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	3,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
EQUINO Nº 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 01	2,0 × 10 <sup>2</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 02	1,0 × 10 <sup>2</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 03	1,3 × 10 <sup>3</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	1,8 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 01	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	3,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 02	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	2,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 03	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 04	1,5 × 10 <sup>2</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-
OVINO/CAPRINO Nº 05	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 06	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 07	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 08	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 09	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 10	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	1,5 × 10 <sup>2</sup>	3,0 × 10 <sup>2</sup>	-	3,5 × 10 <sup>2</sup>	2,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 11	-	-	-	3,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 12	5,5 × 10 <sup>2</sup>	9,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	1,8 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 13	2,5 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 14	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	3,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 15	3,0 × 10 <sup>2</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	2,0 × 10 <sup>2</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	2,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 16	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	6,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 17	-	-	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 01	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 02	-	-	-	-	1,1 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
PORCINO Nº 03	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>
PORCINO Nº 04	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 05	-	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 06	1,0 × 10 <sup>2</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	2,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-
PORCINO Nº 07	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	2,5 × 10 <sup>2</sup>
PORCINO Nº 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 09	-	-	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-
PORCINO Nº 10	7,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
PORCINO Nº 11	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	2,1 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-
PORCINO Nº 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 13	-	-	-	-	-	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-
PORCINO Nº 14	1,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-
PORCINO Nº 15	1,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	1,5 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-
PORCINO Nº 16	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-
PORCINO Nº 17	5,0 × 10 <sup>1</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	2,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-
PORCINO Nº 18	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	1,0 × 10 <sup>2</sup>	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	5,0 × 10 <sup>1</sup>
PORCINO Nº 19	5,0 × 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 20	5,0 × 10 <sup>1</sup>	4,0 × 10 <sup>2</sup>	1,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	9,5 × 10 <sup>2</sup>	-	-	-



**Tabla 32.** Especies productoras de micotoxinas, detectadas e identificadas por protocolos de PCR específicos de especie en muestras de piensos destinadas al sector ganadero comercializadas en España.

TIPO DE PIENSO	<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus spp.</i> <i>a gregado niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. graminearum</i>
AVICOLA Nº 01	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 02	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 03	-	+	+	-	-	-
AVICOLA Nº 04	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 05	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 06	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 07	+	-	-	+	-	+
AVICOLA Nº 08	-	-	-	-	-	-
AVICOLA Nº 09	-	-	-	-	-	-
ACUICOLA Nº 01	-	-	+	-	-	-
ACUICOLA Nº 02	-	-	-	-	-	-
BOVINO Nº 01	+	+	+	+	-	+
BOVINO Nº 02	-	-	+	-	+	+
BOVINO Nº 03	-	-	-	-	-	-
BOVINO Nº 04	-	-	-	-	-	-
BOVINO Nº 05	+	-	-	-	+	-
BOVINO Nº 06	+	+	-	+	-	-
CUNICOLA Nº 01	+	+	-	-	+	+
CUNICOLA Nº 02	-	-	+	-	-	+
CUNICOLA Nº 03	+	+	+	-	-	-
EQUINO Nº 01	-	-	-	-	-	-
EQUINO Nº 02	-	-	-	-	-	-
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 01	+	+	+	+	-	-
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 02	-	-	-	-	-	-
MATERIA PRIMA (CEREALES) Nº 03	+	+	+	-	+	-
OVINO/CAPRINO Nº 01	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 02	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 03	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 04	-	-	-	-	+	+
OVINO/CAPRINO Nº 05	+	+	+	-	+	-
OVINO/CAPRINO Nº 06	+	+	+	-	+	-
OVINO/CAPRINO Nº 07	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 08	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 09	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 10	+	-	+	-	+	+
OVINO/CAPRINO Nº 11	-	-	-	-	-	-
OVINO/CAPRINO Nº 12	+	+	-	-	+	+
OVINO/CAPRINO Nº 13	+	+	+	-	+	-
OVINO/CAPRINO Nº 14	+	-	-	-	+	-
OVINO/CAPRINO Nº 15	+	+	+	-	+	+
OVINO/CAPRINO Nº 16	+	-	-	+	-	+
OVINO/CAPRINO Nº 17	-	-	+	-	-	-
PORCINO Nº 01	-	-	+	+	-	-
PORCINO Nº 02	-	-	-	-	-	+
PORCINO Nº 03	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 04	-	-	+	-	-	-
PORCINO Nº 05	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 06	+	+	+	-	+	-
PORCINO Nº 07	+	-	+	-	+	+
PORCINO Nº 08	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 09	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 10	+	+	+	+	-	+
PORCINO Nº 11	+	+	-	-	+	-
PORCINO Nº 12	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 13	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 14	+	+	+	-	+	+
PORCINO Nº 15	+	+	+	-	+	+
PORCINO Nº 16	+	-	-	-	+	+
PORCINO Nº 17	-	+	+	+	-	+
PORCINO Nº 18	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 19	-	-	-	-	-	-
PORCINO Nº 20	+	+	+	-	+	-



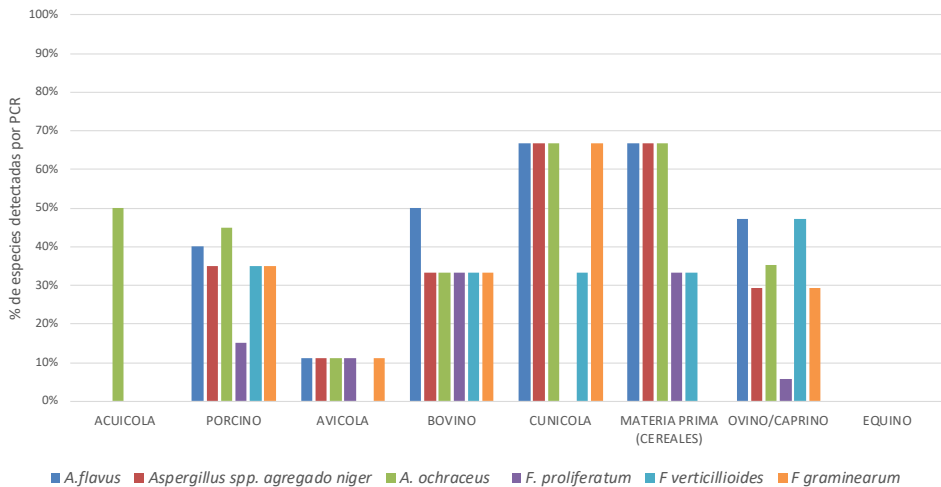
**Figura 54.** Micobiota contaminante de las muestras de piensos destinados al sector ganadero comercializados en España

Basándonos en estos resultados sobre micobiota potencialmente productora de micotoxinas en las muestras de piensos, obtenidos por técnicas de identificación convencionales, y en base a los resultados obtenidos en el estudio por HPLC-FL o HPLC-DAD sobre las micotoxinas presentes en las muestras, se procedió a la selección de especies fúngicas concretas a identificar, en las muestras de piensos estudiadas, mediante protocolos de PCR específicos de especie. Los resultados obtenidos en este análisis, usando la metodología descrita en la sección de material y métodos, para cada una de las especies estudiadas, son los que se muestran en la Tabla 32. En ella se puede observar que las especies presentes en las muestras de piensos fueron *A. flavus*, *Aspergillus* spp. del agregado *niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*), *A. ochraceus*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* y *F. graminearum*. El análisis de la varianza (ANOVA) aplicado a los datos mostró una fuerte correlación entre la presencia de aflatoxinas y la especie *A. flavus*, OTA y las especies de *Aspergillus* del agregado *niger*, OTA y *A. ochraceus*, FB1 y FB2 y las especies *F. proliferatum* y *F. verticillioides* y finalmente DON, ZEA y la especie *F. graminearum*.

De forma global, el 89% de las muestras analizadas presentaron contaminación fúngica. Por géneros, la mayor incidencia la presentó el género *Aspergillus* presente en 48 de las muestras de piensos (77%), mientras que

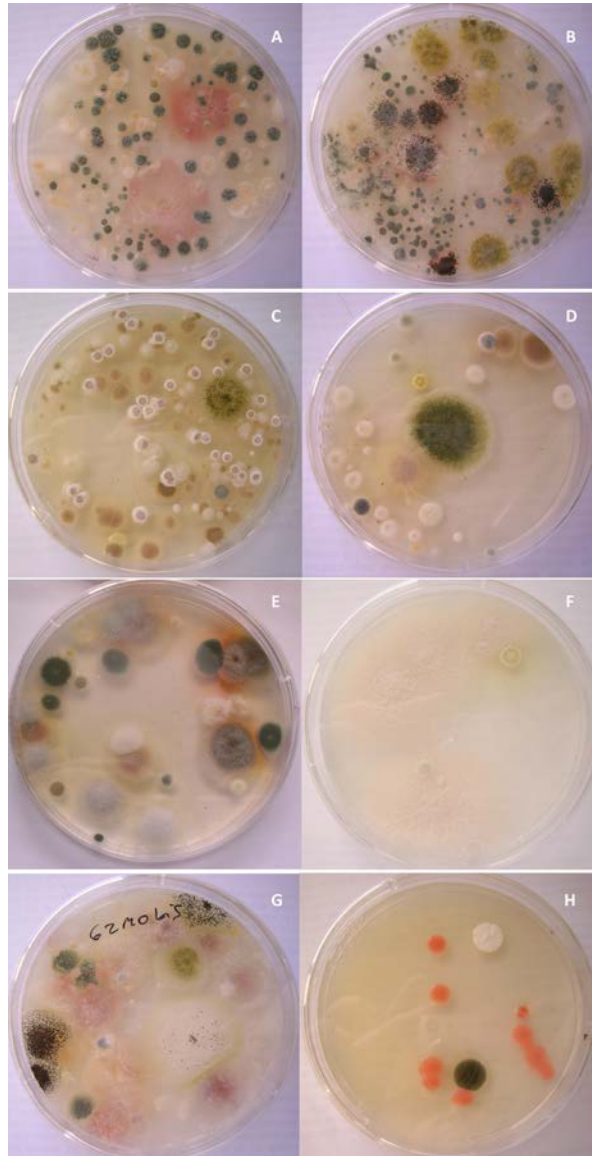
*Penicillium* spp. fue identificado en 27 (44%), *Fusarium* en 35 (56%) y *Alternaria* en 6 (10%) de las muestras analizadas.

La Figura 55 muestra los resultados obtenidos en cuanto a distribución de hongos de las diferentes secciones, en función del tipo de pienso analizado. Los dos tipos de pienso con mayor número de muestras estudiadas fueron los destinados a ganado porcino (20 muestras) y ovino/caprino (17 muestras) y presentaron perfiles de contaminación fúngica similares. El perfil de contaminación fúngica para el resto de los piensos fue similar, excepto en las muestras de equino en las que no se detectó ninguna especie fúngica y las muestras de piensos de alimentación acuícola, en las que únicamente se detectó *A. ochraceus*.



**Figura 55.** Especies toxigénicas detectadas en base a protocolos específicos PCR en las muestras de piensos destinados al sector ganadero comercializados en España

Finalmente, la Figura 56 muestra, a modo de ejemplo, fotografías de varios cultivos realizados.



**Figura 56.** Cultivos en agar PDA y PDA con diclorán (H) de materia prima (cereales) para la fabricación de piensos para cereales (A y G), pienso para ovino/caprino (B, E y F), pienso para porcino (C, D y H).

# V. CONCLUSIONES FINALES





Los resultados obtenidos en la investigación desarrollada para la consecución de los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral conducen a las siguientes conclusiones:

1. La metodología por HPLC-FLD y HPLC-DAD desarrollada permite determinar AFB1, ZEA, DON, FB1, FB2, T-2 y HT-2 en las muestras de piensos en concentraciones muy inferiores a los límites establecidos en la legislación comunitaria vigente en piensos.
2. La validación de los métodos HPLC-FLD y HPLC-DAD desarrollados demostró que alcanzan bajos LOD y son robustos y reproducibles, de acuerdo con los criterios reconocidos actualmente para métodos de determinación de micotoxinas (Reglamento UE N° 401/2006).
3. El método multimicotoxinas UHPLC-MS/MS optimizado presenta gran interés, ya que permite abordar la determinación de AFB1, ZEA, OTA, DON, FB1, FB2, T-2, HT-2 y otras micotoxinas como AFB2, AFG1, AFG2, FUSX, 3 y 15-ADON, DAS en matrices complejas, como son los piensos en los que se ha producido un menor desarrollo metodológico. Ello favorece su proyección futura ante cambios legislativos sobre micotoxinas en piensos, ya que los LOQ son muy inferiores a los establecidos para las micotoxinas reguladas.
4. La extensa validación del método UHPLC-MS/MS llevada a cabo en la presente Tesis es acorde con todos los criterios de funcionamiento de métodos de ensayo para la determinación de micotoxinas por espectrometría de masas (Reglamento UE N° 401/2006 y SANCO/12571/2013 y SANTE/11945/2015) y demuestra que se trata además de un método con bajos LOD, es robusto, reproducible, muy rápido y permite reducir costes asociados al uso de columnas de IAC.
5. El método UHPLC-Q-TOF-MS optimizado ha permitido confirmar y ampliar enormemente la información sobre el espectro de micotoxinas presentes en las muestras de piensos, y se han identificado hasta 14 compuestos, lo que abre nuevas y futuras investigaciones en el campo de la toxicología alimentaria animal.
6. La combinación de los métodos UHPLC-Q-TOF-MS y UHPLC-MS/MS llevada a cabo por vez primera en esta Tesis Doctoral permite la detección/cuantificación de numerosos metabolitos en las muestras de

- piensos incluyendo las micotoxinas reguladas en la Unión Europea (en piensos).
7. Ninguna de las muestras de piensos analizadas presentó niveles de micotoxinas superiores a los permitidos en la legislación Comunitaria vigente.
  8. Los resultados obtenidos en las muestras de piensos analizadas por UHPLC-MS/MS, confirmaron los obtenidos por HPLC-FLD y HPLC-DAD, Se encontraron las toxinas FB1, FB2, OTA, ZEA, AFB1, DON y T-2 en el 43,5%, 43,5%, 29,0%, 14,5%, 12,9%, 9,7% y 1,6% de las muestras, respectivamente.
  9. Mediante el equipo UHPLC-Q-TOF-MS se detectó, a través de la identificación de masa exacta combinada con espectros MS/MS, diversas micotoxinas acompañantes de las citadas anteriormente, entre las que cabe destacar: emodina, eniatina B, macrosporina, alternariol metil éter, 2-amino-14,16-dimetiloctadecan-3-ol, estaurosporina, eniatina A1, toxina AAL-TA1, curvularina, miriocina, paspalinina, fusaproliferina, roquefortina C, roridina A, geldanamicina, pestalotina, ácido ciclopiazónico y physcion.
  10. En términos generales, y considerando todas las muestras de piensos analizadas, las especies fúngicas productoras de micotoxinas encontradas, por orden de incidencia, fueron: *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Aspergillus* spp. agregado *niger*, *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *F. proliferatum*.
  11. La distribución de especies entre los distintos tipos de piensos estudiados, en general, fue similar, aunque el nivel de contaminación fúngica fue variable dependiendo del tipo de pienso. Las muestras con mayor carga fúngica fueron las destinadas a ganado bovino, seguidas de las destinadas a ganado porcino, ovino/caprino, avícola y cunícula, respectivamente.
  12. La presencia de las diferentes especies fúngicas en las muestras de piensos analizadas, identificadas por PCR, en general, presentó una correlación positiva con las toxinas identificadas por métodos cromatográficos. Se puede concluir, por tanto, que la presencia de la especie productora es un buen indicador del riesgo de que se presente la toxina o toxinas que produce en el pienso listo para el consumo.



## VI. BIBLIOGRAFÍA





- Abdin, M.Z., Ahmad, M.M., Javed, S., 2010. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Archives of Microbiology* 192, 409-425.
- Abdullah, N., Nawawi, A., Othman, I., 2000. Fungal spoilage of starch-based foods in relation to its water activity ( $a_w$ ). *Journal of Stored Products Research* 36, 47-54.
- Abia, W.A., Warth, B., Sulyok, M., Krska, R., Tchana, A.N., Njobeh, P.B., Dutton, M.F., Moundipa, P.F., 2013. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control* 31, 438-453.
- Abildgren, M.P., Lund, F., Thrane, U., Elmholt, S., 1987. Czapek-Dox agar containing iprodione and dicloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Letters in Applied Microbiology* 5, 83-86.
- Abramović, B., Jajić, I., Abramović, B., Čosić, J., Jurić, V., 2007. Detection of deoxynivalenol in wheat by fourier transform infrared spectroscopy. *Acta Chimica Slovenica* 54, 859–867.
- Adányi, N., Bori, Z., Szendrő, I., Erdélyi, K., Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., 2013. Biosilica-based immobilization strategy for label-free OWLS sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 177, 1-7.
- Adányi, N., Levkovets, I.A., Rodríguez-Gil, S., Ronald, A., Váradi, M., Szendrő, I., 2007. Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 797-802.
- Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V., Korhonen, H.J., 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*.
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M., 2001. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A* 932, 153-157.
- Andrews, S., Pitt, J.I., 1986. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1235-1238.
- Anklam, E., Stroka, J., Boenke, A., 2002. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control* 13, 173-183.
- AOAC International (2016) Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th edn. AOAC International, Gaithersburg, USA
- AOAC Official Method 985. 18 $\alpha$ -Zearalenol and Zearalenone in corn, Liquid Chromatographic Method, AOAC Official Methods of Analysis, AOAC.
- Arranz, I., Baeyens, W.R.G., Van der Weken, G., De Saeger, S., Van Peteghem,

- C., 2004. Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxins. *Critical reviews in food science and nutrition* 44, 195-203.
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J.F., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M., 2013. A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta* 115, 61-67.
- Atkins, D., Norman, J., 1998. Mycotoxins and food safety, *Nutrition and Food Science* 98, 260-266.
- Baggerman, W.I., Samson, R.A., 1988. Heat resistance of fungal spores. En: Samson, R.A., Hoekstra, E.S. (Eds.), *Introduction to Food-Borne Fungi*, third ed. Centralbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
- Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., 2007. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* 591, 29-39.
- Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., 2008. Molecular imprinted polymers as synthetic receptors for the analysis of myco- and phyco-toxins. *The Analyst* 133, 719-730.
- Bagneris, R.W., Gaul, J.A., Ware, G.M., 1986. Liquid chromatographic determination of zearalenone and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69, 894-898.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Barnett, H.L., Hunter, B., 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, EUA.
- Bartók, T., Szécsi, A., Szekeres, A., Mesterházy, A., Bartók, M., 2006. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2447-2462.
- Basile, A., Rigano, D., Loppi, S., Di Santi, A., Nebbioso, A., Sorbo, S., Conte, B., Paoli, L., De Ruberto, F., Molinari, A.M., Altucci, L., Bontempo, P., 2015. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 7861-7875.
- Batthey, A.S., Duffy, S., Schaffner, D.W., 2001. Modelling mould spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. *Food Microbiology* 18, 521-529.
- Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., Fels-Klerx, H.J., Booij,

- C.J.H., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., Brera, C., van der Fels-Klerx, H.J., Booij, C.J.H., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., Brera, C., 2012. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. EFSA Supporting Publications 9.
- Becci, P.J., Voss, K.A., Hess, F.G., Gallo, M.A., Parent, R.A., Stevens, K.R., Taylor, J.M., 1982. Long-term carcinogenicity and toxicity study of zearalenone in the rat. *Journal of Applied Toxicology* 2, 247-254.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2004. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38, 72-77.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
- Berek, L., Petri, I.B., Mesterházy, A., Téren, J., Molnár, J., 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology in Vitro* 15, 25-30.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. De, Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J., 2013. Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition and Food Research* 57, 165-186.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krska, R., 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1062, 209-216.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119, 33-37.
- Beti, J.A., Phillips, T.W., Smalley, E.B., 1995. Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. *Journal of Economic Entomology* 88, 1776-1782.
- Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G., Vleggaar, R., 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1988, 743-745.
- Binder, E.M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* 133, 149-166.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137, 265-282.
- Blesa, J., Berrada, H., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Maes, J., 2004. Rapid

- determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1046, 127-131.
- Blesa, J., Soriano, J., Moltó, J., Marín, R., Mañes, J., 2003. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1011, 49-54.
- Blout, W. P., 1961. Turkey "X" disease. *Turkeys* 9, 52, 55-58, 61, 77.
- Bluhm, B.H., Woloshuk, C.P., 2005. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 1333-1339.
- Bott, R., 2014. Modelling microorganisms in food, Igarss 2014. CRC Press.
- Bräse, S., Gläser, F., Kramer, C., Lindner, S., Linsenmeier, A.M., Masters, K.-S., Meister, A.C., Ruff, B.M., Zhong, S., 2013. *The Chemistry of Mycotoxins, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Vienna, Vienna.
- Brera, C., Debegnach, F., Grossi, S., Miraglia, M., 2004. Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B1 in dry milling corn fractions. *Journal of Food Protection* 67, 1261-1266.
- Broecker, S., Herre, S., Pragst, F., 2012. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Science International* 218, 68-81.
- Broecker, S., Pragst, F., Bakdash, A., Herre, S., Tsokos, M., 2011. Combined use of liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD) in systematic toxicological analysis. *Forensic Science International* 212, 215-226.
- Brown, A.D., 1974. Microbial water relations: features of the intracellular composition of sugar tolerant yeasts. *Journal of Bacteriology* 118, 769-777.
- Brul, S., Klis, F.M., 1999. Mechanistic and mathematical inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal genetics and biology* 27, 199-208.
- Bryła, M., Roszko, M., Szymczyk, K., Jędrzejczak, R., Obiedziński, M.W., 2016. Fumonisin and their masked forms in maize products. *Food Control* 59, 619-627.
- Bryła, M., Roszko, M., Szymczyk, K., Jędrzejczak, R., Obiedziński, M.W., Sękul, J., 2013. Fumonisin in plant-origin food and fodder-a review. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 30, 1626-1640.
- Bullerman, L.B., Bianchini, A., 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 119, 140-146.

- Bünger, J., Westphal, G., Mönnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., Müller, M., 2004. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* 202, 199-211.
- Cahill, L.M., Kruger, S.C., McAlice, B.T., Ramsey, C.S., Prioli, R., Kohn, B., 1999. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 859, 23-28.
- Calleri, E., Marrubini, G., Brusotti, G., Massolini, G., Caccialanza, G., 2007. Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, 396-403.
- Caporaël, L.R., 1976. Ergotism: the satan loosed in Salem? *Science* 192, 21-26.
- Caretti, A., Bragonzi, A., Facchini, M., De Fino, I., Riva, C., Gasco, P., Musicanti, C., Casas, J., Fabriàs, G., Ghidoni, R., Signorelli, P., 2014. Anti-inflammatory action of lipid nanocarrier-delivered myriocin: therapeutic potential in cystic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840, 586-594.
- Cavret, S., Lecoœur, S., 2006. Fusariotoxin transfer in animal. *Food and chemical toxicology* 44, 444-453.
- Cazzaniga, D., Basílico, J.C., González, R.J., Torres, R.L., De Greef, D.M., 2001. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Letters in Applied Microbiology* 33, 144-147.
- CCFAC, 2000. Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Posting date. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Position paper on zearalenone. Publication CCFAC 00/19. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy.
- CESFAC, 2005. Guía de aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control en la industria de fabricación de piensos. Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para Animales (CESFAC)
- Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V., Brereton, P., 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography- fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1059, 13-16.
- Char, C., Guerrero, S., Gonzalez, L., Alzamora, S.M., 2005. Growth response of *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum* in argentine milk jam. *Food Science and Technology International* 11, 297-305.
- Cigić, I.K., Prosen, H., 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 62-115.

- 
- Codex Alimentarius (CAC), 1997. General principles of Food Hygiene CAC/RCP 1-1969, Rev. 3-1997.
- Codex Alimentarius (CAC), 2003. Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes. CAC/RCP 51-2003.
- Coulombe, R.A., 1994. Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B1. En: Eaton D.L., Groopman J.D., (Eds). The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, San Diego, CA, pp. 89-101.
- Council Directive, 1999. Council Directive 1999/29/EC of 22 April 1999 on the undesirable substances and products in animal nutrition. Official Journal of the European Communities L115, 32-46.
- Council Regulation, 1993. Council Regulation (EEC) No 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food. Official Journal of the European Communities, L37, 1-3.
- Cox, P.D., Collins, L.E., 2002. Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. Journal of Stored Products Research 38, 95-115.
- Creppy, E.E., 1999. Human ochratoxicosis. Journal of Toxicology Toxin Reviews 18, 277-293.
- Cullen, J., Newberne, P., 1993. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. En: Eaton D.L., Groopman J.D., (Eds). The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, San Diego, CA, pp. 3-26
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology 69, 155-166.
- D'Mello, J.P.F., Porter, J.K., Macdonald, A.M.C., Placinta, C.M., 1997. *Fusarium* mycotoxins. En: D'Mello J.P.F. (Ed.), Handbook of Plant and Fungal Toxicants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 287-301.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gasparini, M., Sforza, S., Dossena, A., Marchelli, R., 2004. Simultaneous liquid chromatography-fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. Journal of Chromatography A 1047, 241-247.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Mangia, M., Sforza, S., Dossena, A., Marchelli, R., 2009. Free and bound fumonisins in gluten-free food products. Molecular Nutrition and Food Research 53, 492-499.
- Dall'Asta, C., Falavigna, C., Galaverna, G., Battilani, P., 2012. Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and fumonisin
-



- production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 3800-3808.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M. 2005. Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology* 100, 187-196.
- Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., Roussos, S., 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology* 108, 286-291.
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., Magan, N., 2007. Mould germination: Data treatment and modelling. *International Journal of Food Microbiology* 114, 17-24.
- Davey, K.R., 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *The Journal of Applied Bacteriology* 67, 483-488.
- De Kuppler, A.L.M., Steiner, U., Sulyok, M., Krska, R., Oerke, E.-C. 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 151, 78-86.
- De Saeger, S., Sibanda, L., Van Peteghem, C., 2003. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 487, 137-143.
- Delves, P.J., Roitt, I.M., 2011. *Roitt's essential immunology*. Chichester, West Sussex, Wiley-Blackwell.
- Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Cunsolo, V., Muccilli, V., Sforza, S., Dossena, A., Drahos, L., Vékey, K., 2012. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography A* 1259, 74-85.
- Directive, 1981. Council Directive 81/851/EEC of 28 September 1981 on the approximation of the laws of the Member States relating to veterinary medicinal products. *Official Journal of the European Communities* L317, 1-15.
- Directive, 1990. Council Directive 1990/167/EEC of 26 March 1990 laying down the conditions governing the preparation, placing on the market and use of medicated feedingstuffs in the Community. *Official Journal of the European Communities* L92, 42-48.
- Do, J.H., Choi, D.K., 2007. Aflatoxins: Detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12, 585-593.
- Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D., Kuca, K., 2008. Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism* 9, 77-82.
- Dowd, P.F., 2003. Insect management to facilitate preharvest mycotoxin

- management. *Toxin Reviews* 22, 327-350.
- Draughon, F.A., Ayres, J.C., 1981. Inhibition of aflatoxin production by selected insecticides. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 972-976.
- Duarte, S.C., Lino, C.M., Pena, A., 2011. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: an undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Veterinary Microbiology* 154, 1-13.
- Duarte, S.C., Lino, C.M., Pena, A., 2012. Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *Veterinary Journal* 192, 286-292.
- Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M., 2009. Ochratoxin A non-conventional exposure sources — A review. *Microchemical Journal* 93, 115-120.
- Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M., 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology* 27, 187-198.
- Duffy, M.J., Reid, R.S., 1993. Measurement of the stability of T-2 toxin in aqueous solution. *Chemical Research in Toxicology* 6, 524-529.
- Duncan, K., Kruger, S., Zabe, N., Kohn, B., Prioli, R., 1998. Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B1, B2 and B3. *Journal of Chromatography A* 815, 41-47.
- Dunkel, F. V., 1988. The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. *International Journal of Food Microbiology* 7, 227-244.
- Dutton, M.F., Ehrlich, K.C., Bennett, J.W., 1985. Biosynthetic relationship among aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin M1, and aflatoxin M2. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1392-1395.
- Dzuman, Z., Zachariasova, M., Lacina, O., Veprikova, Z., Slavikova, P., Hajslova, J., 2014. A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. *Talanta* 121, 263-272.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cotty, P.J., 2005. Divergent regulation of aflatoxin production at acidic pH by two *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 159, 579-581.
- Ehrlich, K.C., 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: Advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology* 5, 50.
- European Commission, 2001. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in food. *Official Journal of the European Communities*, L77, 1-13.
- European Commission, 2002. Commission Decision (EC) No 657/2002 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the

- 
- performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities L221, 8-36.
- European Commission, 2003a. Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. Official Journal of the European Union L285, 33-37.
- European Commission, 2003b. Commission Regulation (EC) No 1425/2003 of 11 August 2003 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin. Official Journal of the European Communities L203, 1-3.
- European Commission, 2003c. Commission Recommendation 2003/598/CE of 11 August 2003 on the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. Official Journal of the European Union L203, 54-59.
- European Commission, 2004. Commission Regulation (EC) No 683/2004 of 13 April 2004 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children. Official Journal of the European Communities L106, 3-5
- European Commission, 2005. Commission Regulation (EC) No 856/2005 of 6 June 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards *Fusarium* toxins. Official Journal of the European Union L146, 3-8.
- European Commission, 2006a. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union L364, 5-24.
- European Commission, 2006b. 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. Official Journal of the European Union L70, 12-13.
- European Commission, 2006c. Commission Recommendation 2006/583/EU of 17 August 2006 on the prevention and reduction of *Fusarium* toxins in cereals and cereal products. Official Journal of the European Union L234, 35-40.
- European Commission, 2006d. Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding Official Journal of the European Union L229, 7-9.
- European Commission, 2007. Adapting to Climate Change in Europe –Options for EU Action. Green Paper from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee of the Regions, SEC (2007) 849. Brussels, Belgium: European Commission: COM (2007) 354 final.
-

- 
- European Commission, 2010. Commission Regulation (EU) No 242/2010 of 19 March 2010 creating the Catalogue of feed materials. Official Journal of the European Union L77, 17-32.
- European Commission, 2012. Commission Recommendation 2012/154/EU of 15 March 2012 on the monitoring of the presence of ergot alkaloids in feed and food. Official Journal of the European Union L77, 20-21.
- European Commission, 2013. Commission Recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. Official Journal of the European Union L91, 12-15.
- European Commission, 2014. Commission Recommendation 2014/662/EU of 10 September 2014 on good practices to prevent and to reduce the presence of opium alkaloids in poppy seeds and poppy seed products. Official Journal of the European Union L271, 96-100.
- European Commission, 2015. Commission Recommendation 2015/976/UE of 19 June 2015 on the monitoring of the presence of tropane alkaloids in food. Official Journal of the European Union L157, 97-98.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2004a. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to ochratoxin A as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 101, 1–36.
- EFSA, 2004b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 89, 1-35.
- EFSA, 2004c. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 73, 1–42.
- EFSA, 2005a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. EFSA Journal 235, 1–32.
- EFSA, 2005b. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to Exposure Assessments. EFSA Journal 249, 1–26.
- EFSA, 2005c. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ergot as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 225, 1–27.
- EFSA, 2006a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. EFSA Journal 365, 1–56.
- EFSA, 2006b. Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA related to Uncertainties in Dietary Exposure Assessment. EFSA Journal 438, 1–54.
-

- 
- EFSA, 2007. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. EFSA Journal 446, 1–127.
- EFSA, 2009. Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. CFP/EFSA/CONTAM/2008/01 Preparado por Battilani P., Costa L.G., Dossena A., Gullino M.L., Marchelli R., Galaverna G., Pietri A., Dall'Asta C., Giorni P., Spadaro D., Gualla A.
- EFSA, 2010a. Scientific Opinion. Statement on recent scientific information on the toxicity of ochratoxin A. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA Journal 8, 1626.
- EFSA, 2010b. Scientific/technical report submitted to EFSA. Occurrence data of trichothecene mycotoxins T-2 toxin and HT-2 toxin in food and feed. EFSA-Q-2010-00949. Preparado por H.J. van der Fels-Klerx
- EFSA, 2010c. Scientific report submitted to EFSA. Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins. Question No EFSA-Q-2010-0143. CT/EFSA/CONTAM/2010/03 Preparado por Ulrike Schuhmacher-Wolz, Karin Heine y Klaus Schneider
- EFSA, 2011a. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. EFSA Journal 9, 2197.
- EFSA, 2011b. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in food and feed. EFSA Journal 9, 2407.
- EFSA, 2011c. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA Journal 9, 2481.
- EFSA, 2011d. GUIDANCE of EFSA Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment. EFSA Journal 9, 2097.
- EFSA, 2012a. Scientific Opinion on ergot alkaloids in food and feed. EFSA Journal 10, 2798.
- EFSA, 2012b. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA Journal 10, 2605.
- EFSA, 2012c. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of phomopsins in feed and food. EFSA Journal 10, 2567.
- EFSA, 2013a. Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. EFSA Journal 10, 3379.
- EFSA, 2013b. Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. EFSA Journal 11, 3254.
- EFSA, 2013c. Scientific Opinion on risks for animal and public health related to
-

- the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA Journal* 11, 3262.
- EFSA, 2014a. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal* 12, 3802.
- EFSA, 2014b. Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. *EFSA Journal* 12, 3699.
- European Parliament, 2002a. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities* L31, 1–24
- European Parliament, 2002b. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement. *Official Journal of the European Communities* L140, 10-22.
- European Parliament, 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Communities* L268, 29–43.
- European Parliament, 2004a. Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L139, 1-54.
- European Parliament, 2004b. Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. *Official Journal of the European Union* L165, 1-141.
- European Parliament, 2005. Regulation (EC) No 1831/2005 of the European Parliament and of the Council laying down requirements for feed hygiene. *Official Journal of the European Union* L35, 1-22.
- European Parliament, 2009. Regulation (EC) No 767/2009 of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed, amending European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003 and repealing Council Directive 79/373/EEC, Commission Directive 80/511/EEC, Council Directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC and 96/25/EC and Commission Decision 2004/217/EC. *Official Journal of the European Communities* L229, 1–28.
- Falavigna, C., Cirlini, M., Galaverna, G., Dall'Asta, C., 2012. Masked fumonisins in processed food: co-occurrence of hidden and bound forms and their stability under digestive conditions. *World Mycotoxin Journal* 5, 325-334.

- FAO, 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Cuaderno FAO N° 73, Roma. <http://fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s00.htm>
- FAO, 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudios FAO: Alimentación y Nutrición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.htm>
- FDA, 2016. Investigative Operation Manual 2016. Washington (DC): Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/downloads/ICECI/Inspections/IOM/UCM123507.pdf>.
- Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.-L., Guillarme, D., 2014. Current and future trends in UHPLC. Trends in Analytical Chemistry 63, 2-13.
- Feng, Y., Huang, S.L., Dou, W., Zhang, S., Chen, J.H., Shen, Y., Shen, J.H., Leng, Y., 2010. Emodin, a natural product, selectively inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and ameliorates metabolic disorder in diet-induced obese mice. British Journal of Pharmacology 161, 113-126.
- Fink-Gremmels, J., 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. The Veterinary Quarterly 21, 115-120.
- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., Woloshuk, C.P., 2003. PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. Applied and Environmental Microbiology 69, 5222-5227.
- Freeman, G.G., Morrison, R.I., 1948. Trichothecin: an antifungal metabolic product of *Trichothecium roseum* Link. Nature 162, 30.
- Frisvad, J.C., Andersen, B., Thrane, U., 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. Mycological Research 112, 231-240.
- Frisvad, J.C., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Studies in Mycology 50, 23-43.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., de Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabanes, F.J., Ehrlich, K., Samson, R.A. 2007a. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. Studies in Mycology 59, 31-37.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. Food Microbiology 26, 757-769.
- Gardiner, D.M., Osborne, S., Kazan, K., Manners, J.M., 2009. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. Microbiology 155, 3149-3156.

- Gelderblom, W.C., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vlegaar, R., Kriek, N.P., 1988. Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1806-1811.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419-431.
- Gibson, A.M., Hocking, A.D., 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology* 8, 353-358
- Gilbert, J., Anklam, E., 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry* 21, 468-486.
- Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M.A.T., Vázquez, C., Patiño, B., 2009. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131, 162-167.
- Gil-Serna, J., Mateo, E.M., González-Jaén, M.T., Jiménez, M., Vázquez, C., Patiño, B., 2013. Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach. *Food Additives and Contaminants: Part A* 30, 372-380.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M.T., Patiño, B. 2009. Discrimination of the main ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. *International Journal of Food Microbiology* 136, 83–87.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N., 2008. Effect of  $a_w$  and CO<sub>2</sub> level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology* 122, 109-113.
- Goldblatt, L., 1969. Aflatoxin. Scientific background, control, and implications. Academic Press, N.Y.
- González-Mariño, I., Quintana, J.B., Rodríguez, I., Cela, R., 2011. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Water Research* 45, 6770-6780.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C., González Jaén, M.T. 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters* 245, 353-361.
- Gortmaker, S.L., Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 1994. Applied logistic regression. *Contemporary Sociology* 23, 159.
- Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Calabrese, G., Gennaro, M.C.,



- Marengo, E., 2012. Identification of photodegradation products of Allura Red AC (E129) in a beverage by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 746, 84-89.
- Gottlieb, D., 1978. *The germination of fungus spores*. Meadowfield Press, Durham, England.
- Gross-Steinmeyer, K., Eaton, D.L., 2012. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicology* 299, 69-79.
- Grove, J.F., 1993. Macrocyclic trichothecenes. *Natural Product Reports* 10, 429-448.
- Grove, J.F., Trichothecenes, N., Grove, J.F., 1986. Non-Macrocyclic Trichothecenes. *Natural Product Reports* 5, 187-209.
- Hamilton, P.B., Huff, W.E., Harris, J.R., Wyatt, R.D., 1982. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Science* 61, 1832-1841.
- Hawksworth, D.L., 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95, 641-655.
- Hawksworth, D.L., 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105, 1422-1432.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (Eds.) 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8<sup>a</sup> Ed.)*. CAB International, Wallingford, Reino Unido. p. 616.
- Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J.L., Barthelmebs, L., 2012. Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control* 26, 401-415.
- Heathcote, J. G., and J. R. Hibbert., 1978. *Aflatoxins: chemical and biological aspects*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.
- Hidy, P.H., Baldwin, R.S., Greasham, R.L., Keith, C.L., McMullen, J.R., 1977. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Advances in Applied Microbiology* 22, 59-82.
- Hinojo, M.J., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Gimeno-Adelantado, J. V., Jiménez, M., Mateo, R., 2006. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiology* 23, 119-127.
- Hmaissia Khelifa, K., Ghali, R., Mazigh, C., Aouni, Z., Machgoul, S., Hedhili, A., 2012. Ochratoxin A levels in human serum and foods from nephropathy patients in Tunisia: Where are you now? *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 509-512.

- Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), 2006. Recommended methods for food mycology. En: *Advances in Food Mycology*. Springer US, pp. 343-348.
- Holčápek, M., Jirásko, R., Lída, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A* 1259, 3-15.
- Holmquist, G.U., Walker, H.W., Stahr, H.M., 1983. Influence of temperature, pH, water activity and anti-fungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science* 48, 778-782.
- Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J., Harris, C.C., 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350, 427-428.
- Huang, Y., Begum, M., Chapman, B., Hocking, A.D., 2010. Effect of reduced water activity and reduced matric potential on the germination of xerophilic and non-xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 140, 1-5.
- Hughes, B.J., Jarvis, B.B., Sharma, R.P., 1990. Effects of macrocyclic trichothecene congeners on the viability and mitogenesis of murine splenic lymphocytes. *Toxicology Letters* 50, 57-67.
- Hughes, B.J., Taylor, M.J., Sharma, R.P., 1988. Effects of verrucarin A and roridin A, macrocyclic trichothecene mycotoxins, on the murine immune system. *Immunopharmacology* 16, 79-87.
- Hussein, H., Brasel, J., 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology* 167, 101–134.
- Iavicoli, I., Brera, C., Carelli, G., Caputi, R., Marinaccio, A., Miraglia, M., 2002. External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 75, 381-386.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1996. Toxigenic Fungi: *Aspergillus*. pp 347-381. En: *Microorganisms in Foods. 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Roberts, T A, Baird-Parker, A C and Tompkin, R B (Eds). Blackie Academic & Professional, London, UK.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 56. Lyon, France.
- IARC, 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation, Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 82. Lyon,

- France.
- International Committee on Harmonization (ICH), 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), Nov. 2005.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.  
[https://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/publications\\_ipcc\\_fourth\\_assessment\\_report\\_synthesis\\_report.htm](https://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_synthesis_report.htm)
- Iqbal, S.Z., Nisar, S., Asi, M.R., Jinap, S., 2014. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control* 43, 98-103.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2001. Fiftyseventh meeting, Rome, 5-14 June 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
- JECFA, 2010. Seventy-second meeting, Rome, 16–25 February 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
- Jestoi, M., 2008. Emerging *Fusarium* -mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 21-49.
- Jestoi, M., Rokka, M., Yli-Mattila, T., Parikka, P., Rizzo, A., Peltonen, K., 2004. Presence and concentrations of the *Fusarium* -related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in finnish grain samples. *Food Additives and Contaminants* 21, 794-802.
- Jiménez, M., Máñez, M., Hernández, E., 1996. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 29, 417-421.
- Jiménez, M., Mateo, J.J., Mateo, R., 2000. Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 870, 473-481.
- Jin, H., Kumar, A.P., Paik, D.H., Ha, K.C., Yoo, Y.J., Lee, Y.I., 2010. Trace analysis of tetracycline antibiotics in human urine using UPLC-QToF mass spectrometry. *Microchemical Journal* 94, 139-147.
- Jornet, D., Busto, O., Guasch, J., 2000. Solid-phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 882, 29-35.

- Josephs, R.D., Krska, R., MacDonald, S., Wilson, P., Pettersson, H., 2004. Production of a calibrant certified reference material for determination of the estrogenic mycotoxin zearalenone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 1182–1189.
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. 2010. Genetic variability and fumonisin production by *F. proliferatum*. *Food Microbiology* 27, 50-57.
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V., González-Jaén, M.T., 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 681-689.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M.T., 2008. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2032-2036.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patino, B., González-Jaén, M.T. 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 562- 568.
- Kabak, B., W, A.D., W Dobson, A.D., Var, I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 593-619.
- Kavanagh, K. (Ed), 2011. *Fungi: Biology and Applications* 2nd edition. Chichester, West Sussex, Wiley-Blackwell.
- Kim, E.-K., Maragos, C.M., Kendra, D.F., 2004. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 196-200.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A., 2001. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*: 9th edition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Klich, M.A., 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48, 71-80.
- Klick, M.A., J.I. Pitt., 1998. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. En: Commonwealth Scientific and Industrial research organization. Division of food processing (Eds.), Australia.
- Klötzel, M., Gutsche, B., Lauber, U., Humpf, H.-U., 2005. Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8904-8910.
- Klötzel, M., Schmidt, S., Lauber, U., Thielert, G., Humpf, H.-U., 2005.

- Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC method. *Chromatographia* 62, 41-48.
- Koehler, P.E., Beuchat, L.R., Chinnan, M.S., 1985. Influence of trichotemperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea seeds and meal. *Journal of Food Protection* 48, 1040–1043
- Kok, W.T., 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 659, 127-137.
- Kokkonen, M.K., Jestoi, M.N., 2009. A multi-compound LC-MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains. *Food Analytical Methods* 2, 128-140.
- Kos, G., Lohninger, H., Krska, R., 2002. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. *Vibrational Spectroscopy* 29, 115-119.
- Kostelanska, M., Zachariasova, M., Lacina, O., Fenclova, M., Kolloš, A.L., Hajslova, J., 2011. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chemistry* 126, 1870-1876.
- Kotal, F., Holadová, K., Hajšlová, J., Poustka, J., Radová, Z., 1999. Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A* 830, 219-225.
- Krishnamachari, K.A., Bhat, R. V, Nagarajan, V., Tilak, T.B., 1975a. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet* 1, 1061-1063.
- Krishnamachari, K.A., Bhat, R. V, Nagarajan, V., Tilak, T.B., 1975b. Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of western India. *The Indian Journal of Medical Research* 63, 1036-1049.
- Krska, R., 1998. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A* 815, 49-57.
- Krska, R., Josephs, R., 2001. The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369, 469-476.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., Crews, C., 2008a. Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 25, 152-163.
- Krska, R., Stubbings, G., MacArthur, R., Crews, C., 2008b. Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 563-

576.

- Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., Mizaikoff, B., 2005. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants* 22, 345-353.
- Krska, R., Welzig, E., Boudra, H., 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137, 241-264.
- Kruger, S.C., Kohn, B., Ramsey, C.S., Prioli, R., 1999. Rapid immunoaffinity-based method for determination of zearalenone in corn by fluorometry and liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 82, 1364-1368.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7, 253-306.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences: BES* 2, 179-248.
- Kuiper-Goodman, T., 1991. Risk assessment of ochratoxin A residues in food. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Science Publications, Lyon 115, 307.
- Lacey, J. 1989. Prevention of mold growth and mycotoxin production through control environmental factors. En: Natori, S., Hashimoto, K. y Ueno, Y. (Eds.). *Mycotoxins and Phytotoxins*. Elsevier, Amsterdam, pp. 161-168.
- Lacey, J., Magan N., 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. J. Chelkowski (Ed.). Elsevier, Amsterdam. Holanda. 5: 77-118.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H., 2006. In vitro effects of water activity, temperature and solutes on the growth rate of *P. italicum* Wehmer and *P. digitatum* Sacc. *Journal of Applied Microbiology* 101, 628-636.
- Langseth, W., Rundberget, T., 1998. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A* 815, 103-121.
- Lattanzio, V.M.T., Solfrizzo, M., Powers, S., Visconti, A., 2007. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 3253-3261.
- Lattanzio, V.M.T., Pascale, M., Visconti, A., 2009. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry* 28, 758-768.

- Lattanzio, V.M.T., Gatta, S. Della, Suman, M., Visconti, A., 2011. Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25, 1869-1880.
- Lazzaro, I., Falavigna, C., Galaverna, G., Dall'Asta, C., Battilani, P., 2013. Cornmeal and starch influence the dynamic of fumonisin B, A and C production and masking in *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 166, 21-27.
- Lazzaro, I., Susca, A., Mulè, G., Ritieni, A., Ferracane, R., Marocco, A., Battilani, P., 2012. Effects of temperature and water activity on FUM2 and FUM21 gene expression and fumonisin B production in *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology* 134, 685-695.
- Leitao, J., de Saint-Blanquat, G., Bailly, J.R., 1987. Action of phosphine on production of aflatoxins by various *Aspergillus* strains isolated from foodstuffs. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2328-2331.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Luber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A.A.M., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Nyikal, J., Njuguna, C., Langat, A., Kilei, I.K., Tetteh, C., Likimani, S., Oduor, J., Nzioki, D., Kamau, B.W., Onsongo, J., Slutsker, L., Mutura, C., Mensah, P., Kessel, F., Park, D.L., Trujillo, S., Funk, A., Geiseker, K.E., Azziz-Baumgartner, E., Gupta, N., 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicoses in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives* 113, 1763-1767.
- Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. BOE nº160, de 6 de julio de 2011.
- Li, F.Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Lou, X.Y., Li, Y.W., 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4122-4126.
- Li, J., Feng, Y.H., Li, X.B., Han, W., Liu, H.Q., Shao, G.G., 2012. Concise synthesis of (-)-anisomycin. *Chinese Chemical Letters* 23, 647-649.
- Li, R., Wang, X., Zhou, T., Yang, D., Wang, Q., Zhou, Y., 2014. Occurrence of four mycotoxins in cereal and oil products in Yangtze Delta region of China and their food safety risks. *Food Control* 35, 117-122.
- Li, S.L., Shen, H., Zhu, L.Y., Xu, J., Jia, X. Bin, Zhang, H.M., Lin, G., Cai, H., Cai, B.C., Chen, S.L., Xu, H.X., 2012. Ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry based chemical profiling approach to rapidly reveal chemical transformation of sulfur-

- fumigated medicinal herbs, a case study on white ginseng. *Journal of Chromatography A* 1231, 31-45.
- Li, Y., Shi, W., Shen, J., Zhang, S., Cheng, L., Wang, Z., 2012. Development of a rapid competitive indirect ELISA procedure for the determination of deoxynivalenol in cereals. *Food and Agricultural Immunology* 23, 41-49.
- Lim, C.W., Lai, K.Y., Yeo, J.F., Tai, S.H., Chan, S.H., 2015. Quantitative assessment of moniliformin in cereals via alternative precipitation pathways, aided by LC-LIT-MS and LC-Q-TOF-MS. *Food Chemistry* 174, 372-379.
- Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J., 1998. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* 815, 3-20.
- Lino, C.M., Silva, L.J.G., Pena, A.L.S., Silveira, M.I., 2006. Determination of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384, 1214-1220.
- Lippolis, V., Pascale, M., Maragos, C.M., Visconti, A., 2008. Improvement of detection sensitivity of T-2 and HT-2 toxins using different fluorescent labeling reagents by high-performance liquid chromatography. *Talanta* 74, 1476-1483.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Logrieco, A., Jiménez, M., 2004a. Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 253-60.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., 2004b. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94, 43-54.
- Llorens, A., Mateo, R., Mateo, J.J., Jiménez, M., 2002. Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants* 19, 272-81.
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J., 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology* 96, 289-300.
- Lutsky, I.I., Mor, N., 1981. Alimentary toxic aleukia (septic angina, endemic panmyelotoxicosis, alimentary hemorrhagic aleukia): t-2 toxin-induced intoxication of cats. *The American Journal of Pathology* 104, 189-191.
- MacDonald, S.J., Chan, D., Breerton, P., Damant, A., Wood, R., Dao Duy, K., Felgueiras, I., Feron, T., Herry, M.P., Ioannou-Kakouri, E., Koch, P., Krska, R., Majerus, P., Nesbit, J., Reuter, M., Stangroom, S., Symonds, P., Weber,



- R., 2005. Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 88, 1197-1204.
- Magan, N., Lacey, J., 1984. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 82, 71-81.
- Magan, N., Aldred, D., Sanchis, V., Arora, D.K., 2004. The role of spoilage fungi in seed deterioration. En: Arora, D.K. (Ed.) *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 311-323.
- Magan, N., Olsen, M., 2004. *Mycotoxins in food: detection and control*, Woodhead Publishing Limited. CRC Press.
- Magan, N., 2006. Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia* 162, 245-53.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Why do fungi produce mycotoxins? En: Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (Eds.). *Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food*. Mycology Series, Vol. 21. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 121-159.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131-139.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D., 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology* 60, 150-163.
- Maier, N.M., Buttinger, G., Welhartizki, S., Gavioli, E., Lindner, W., 2004. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: Merits and limitations. *Journal of Chromatography B* 804, 103-111.
- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B.G., Vos, P., Oliver, R.P., 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* 100, 1107-1111.
- Majerus, P., Hain, J., Scheer, M., 2008. T-2 and HT-2 toxin analysis in cereals and cereal products following IAC cleanup and determination via GC-ECD after derivatization. *Mycotoxin Research* 24, 24-30.
- Manetta, A.C., Di Giuseppe, L., Giammarco, M., Fusaro, I., Simonella, A., Gramenzi, A., Formigoni, A., 2005. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. *Journal of Chromatography A* 1083, 219-222.
- Maragos, C.M., 2004. *Emerging Technologies for Mycotoxin Detection*. Toxin

---

Reviews 23, 317-344.

- Marasas, W.F., Kriek, N.P., Fincham, J.E., van Rensburg, S.J., 1984a. Primary liver cancer and oesophageal basal cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*. *International Journal of Cancer* 34, 383-7.
- Marasas, W.F., Toussoun, T.A., Nelson, P.E., 1984b. Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press.
- Marasas, W.F.O., Riley, R.T., Hendricks, K.A., Stevens, V.L., Sadler, T.W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C.A., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M.C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E., Merrill, A.H., 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *American Society for Nutritional Sciences* 134, 711-716.
- Marín, S., Bellí, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A.J., Ghorbel, A., Sanchis, V., 2006. Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. *Journal of Food Science* 71, 196-200.
- Marín, S., Cuevas, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2008. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology* 121, 139-149.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60, 218-237.
- Marín, S., Sanchis, V., Arnau, F., Ramos, A.J., Magan, N., 1998. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 45, 107-117.
- Marks, B.P., 2008. Status of Microbial Modeling in Food Process Models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 137-143.
- Mart, J., Maloy, C., 1996. An epidemiological analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus* 12, 7-24.
- Martínez Bueno, M.J., Ulaszewska, M.M., Gomez, M.J., Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., 2012. Simultaneous measurement in mass and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water. *Journal of Chromatography A* 1256, 80-88.
- Masoomi, L., Sadeghi, O., Banitaba, M.H., Shahrjerdi, A., Davarani, S.S.H., 2013. A non-enzymatic nanomagnetic electro-immunosensor for

- determination of Aflatoxin B1 as a model antigen. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 177, 1122-1127.
- Massart, F., Saggese, G., 2010. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *International Journal of Andrology* 33, 369-376.
- Mateo, E.M., Gil-Serna, J., Patiño, B., Jiménez, M., 2011. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. *International Journal of Food Microbiology* 149, 118-126.
- Mateo, J.J., Llorens, A., Mateo, R., Jiménez, M., 2001. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography A* 918, 99-112.
- Mateo, J.J., Mateo, R., Hinojo, M.J., Llorens, A., Jiménez, M., 2002a. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *Journal of Chromatography A* 955, 245-256.
- Mateo, J.J., Mateo, R., Jiménez, M., 2002b. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 72, 115-123.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E.M., Mateo, F., Jiménez, M., 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology* 119, 79-83.
- McErlean, B.A., 1952. Vulvovaginitis in swine. *Veterinary Record* 64, 539-540.
- Medina, A., Jiménez, M., Gimeno-Adelantado, J. V., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., 2005. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of chromatography A* 1083, 7-13.
- Medina, A., Jiménez, M., Mateo, R., Magan, N., 2007a. Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2234-2239.
- Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M., Jiménez, M., 2007b. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 119, 230-235.
- Medina, Á., Valle-Algarra, F.M., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., Mateo, F., Jiménez, M., 2006. New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *Journal of Chromatography A* 1121, 178-183.

- Meggio, F., Donella Deana, A., Ruzzene, M., Brunati, A.M., Cesaro, L., Guerra, B., Meyer, T., Mett, H., Fabbro, D., Furet, P., 1995. Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *European Journal of Biochemistry* 234, 317-322.
- Meggs, W.J., 2013. Epidemics of mold poisoning past and present. *Toxicology and Industrial Health* 25, 571-576.
- Meisner, H., Meisner, P., 1981. Ochratoxin A, an in vivo inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 208, 146-153.
- Miller, J.C., J.N. Miller. 1993. En: *Estadística para Química Analítica*. E. Horwood (Ed.). Addison-Wesley Iberoamerican, Wilmington, Delaware. p. 99.
- Miller, J.D., 2002. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 19-27.
- Minervini, F., Fornelli, F., Flynn, K.M., 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* 18, 21-28.
- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R.W.A., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G.J., Vespermann, A., 2009. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009-1021.
- Mirocha, C.J., Pathre, S. V, Robison, T.S., 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food and Cosmetics Toxicology* 19, 25-30.
- Mol, H.G.J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., De Rijk, T.C., Stolker, A. A. M., Mulder, P.P.J., 2008. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry* 80, 9450-9459.
- Molina, M., Giannuzzi, L., 2002. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International* 35, 585-594.
- Morgavi, D.P., Riley, R.T., 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 137, 201-212.
- Moss, M.O., 1996. Mycotoxins. *Mycological Research* 100, 513-523.
- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S., 2011. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin

- production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Applied Microbiology* 111, 1262-1274.
- Mullett, W., Lai, E.P.C., Yeung, J.M., 1998. Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Analytical Biochemistry* 258, 161-167.
- Munkvold, G.P., Desjardins, A.E., 1997. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81, 556-565.
- Muri, S.D., Van der Voet, H., Boon, P.E., Van Klaveren, J.D., Brüsweiler, B.J., 2009. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2963-2974.
- Murray, K.K., Boyd, R.K., Eberlin, M.N., Langley, G.J., Li, L., Naito, Y., 2013. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry* 85, 1515-1609.
- Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Magro, S. Lo, Palermo, C., Centonze, D., 2011. Simultaneous determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in foods and feed materials. *Methods in Molecular Biology* 739, 203-210.
- Nagl, V., Schwartz, H., Krska, R., Moll, W.-D., Knasmüller, S., Ritzmann, M., Adam, G., Berthiller, F., 2012. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats. *Toxicology Letters* 213, 367-73.
- Naseem, S.M., Pace, J.G., Wannemacher, R.W., 1995. A high-performance liquid chromatographic method for determining [3H]T-2 and its metabolites in biological fluids of the cynomolgus monkey. *Journal of Analytical Toxicology* 19, 151-156.
- Navarro-Villoslada, F., Urraca, J.L., Moreno-Bondi, M.C., Orellana, G., 2007. Zearalenone sensing with molecularly imprinted polymers and tailored fluorescent probes. *Sensors and Actuators B: Chemical* 121, 67-73.
- Nazari, F., Sulyok, M., Kobarfard, F., Yazdanpanah, H., Krska, R., 2015. Evaluation of emerging *Fusarium* mycotoxins beauvericin, enniatins, fusaproliferin and moniliformin in domestic rice in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 14, 505-512.
- Nelson, P.E., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology* 31, 233-252.
- Ni, S., Qian, D., Duan, J.A., Guo, J., Shang, E.X., Shu, Y., Xue, C., 2010. UPLC-QTOF/MS-based screening and identification of the constituents and their metabolites in rat plasma and urine after oral administration of *Glechoma longituba* extract. *Journal of Chromatography B* 878, 2741-2750.
- Nielsen, K.F., Smedsgaard, J., 2003. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of*

- Chromatography A 1002, 111-136.
- Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 119, 38-46.
- Niu, C., Payne, G.A., Woloshuk, C.P., 2015. Transcriptome changes in *Fusarium verticillioides* caused by mutation in the transporter-like gene FST1. *BMC Microbiology* 15, 90.
- Nováková, L., Vlčková, H., 2009. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* 656, 8-35.
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C.P.B., Lucci, P., 2012. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 1228, 298-323.
- Oikawa, H., Yamawaki, D., Kagawa, T., Ichihara, A., 1999. Total synthesis of AAL-toxin TA1. *Tetrahedron Letters* 40, 6621-6625.
- Ominski, K.H., Marquardt, R.R., Sinah, R.N., Abramson, D., 1994. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. En: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain-compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, 287-312
- Oueslati, S., Romero-González, R., Lasram, S., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., 2012. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2376-2381.
- Palazzini, J.M., Ramirez, M.L., Alberione, E.J., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2009. Osmotic stress adaptation, compatible solutes accumulation and biocontrol efficacy of two potential biocontrol agents on *Fusarium* head blight in wheat. *Biological Control* 51, 370-376.
- Pallaroni, L., Von Holst, C., Eskilsson, C.S., Björklund, E., 2002. Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374, 161-166.
- Papp, E., H-Otta, K., Záray, G., Mincsovcics, E., 2002. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal* 73, 39-46.
- Parra, R., Magan, N., 2004. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *Journal of Applied Microbiology* 97, 429-438.
- Pascale, M., De Girolamo, A., Visconti, A., Magan, N., Chianella, I., Piletska, E. V, Piletsky, S.A., 2008. Use of itaconic acid-based polymers for solid-phase extraction of deoxynivalenol and application to pasta analysis. *Analytica Chimica Acta* 609, 131-138.

- Pascale, M., Haidukowski, M., Visconti, A., 2003. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. *Journal of Chromatography A* 989, 257-264.
- Pascale, M., Panzarini, G., Visconti, A., 2012. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta* 89, 231-236.
- Pascale, M., Visconti, A., Prończuk, M., Wiśniewska, H., Chelkowski, J., 1997. Accumulation of fumonisins in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74, 1-6.
- Paterson, R.R.M., Lima, N., 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International* 43, 1902-1914.
- Paterson, R.R.M., Lima, N., 2011. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International* 44, 2555-2566.
- Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., 2005. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology* 104, 207-214.
- Patiño, B., Medina, A., Doménech, M., González-Jaén, M.T., Jiménez, M., Vázquez, C. 2007. PCR diagnosis for *Penicillium brevicompactum*, a contaminant of grapes and mycophenolic acid producer. *Food Additives and Contaminants, Part A* 24, 165-172.
- Peers, F.G., Linsell, C.A., 1973. Dietary aflatoxins and liver cancer-a population based study in Kenya. *British Journal of Cancer* 27, 473-84.
- Peraica, M., Rašić, D., 2012. The impact of mycotoxicoses on human history. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 63, 513-518.
- Pereira, V.L., Fernandes, J.O., Cunha, S.C., 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology* 36, 96-136.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W., Goto, T., 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93, 689-703.
- Petterson, H., Åberg, L., 2003. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control* 14, 229-232.
- Petterson, H., Börjesson, T., Persson, L., Lerenius, C., Berg, G., Gustafsson, G. 2008. T-2 and HT-2 toxins in oats grown in northern Europe. *Cereal Research Community* 36, 591-592.

- Pfohl-Leszkowicz, A., Chekir-Ghedira, L., Bacha, H., 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis* 16, 2315-2320.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 61-99.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Piraux, F., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F., 2011. The dent stage of maize kernels is the most conducive for fumonisin biosynthesis under field conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8382-8390.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G., 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants* 21, 479-87.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A., 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 725-735.
- Pitt, J.I. 1991. A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO, Division of Food Processing. Canberra, Australia.
- Pitt, J.I., 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. En: Duckworth R.B. (Ed). *Water Relations of Foods*. Academic Press, London, pp. 273–307.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009a. *Aspergillus* and related teleomorphs. En: Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.). *Fungi and food spoilage*. Springer Science + Business Media, New York, pp. 275-337.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.). 2009b. *Fungi and food spoilage*. Springer Science + Business Media, New York, pp 540.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Glenn, D.R., 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *The Journal of Applied Bacteriology* 54, 109-114.
- Pitt, R.E., 1993. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental-conditions. *Journal of Food Protection* 56, 139-146.
- Placinta, C.M., D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 2016. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21-37.
- Plattner, R.D., Norred, W.P., Bacon, C.W., Voss, K.A., Peterson, R., Shackelford, D.D., Weisleder, D., 1990. A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia* 82, 698-702.



- Prelusky, D.B., 1994. Residues in food products of animal origin. En: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins*. Egan Press. St. Paul, Minn, pp. 405–419.
- Prelusky, D.B., Scott, P.M., Trenholm, H.L., Lawrence, G.A., 1990. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 25, 87-103.
- Prelusky, D.B., Warner, R.M., Trenholm, H.L., 1989. Sensitive analysis of the mycotoxin zearalenone and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography alpha. *Journal of Chromatography* 494, 267-277.
- Prieto-Simón, B., Campàs, M., Marty, J.-L., Noguera, T., 2008. Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples. *Biosensors and Bioelectronics* 23, 995-1002.
- Proctor, R.H., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Busman, M., Butchko, R.A.E., 2006. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2424-2430.
- Quinto, M., Spadaccino, G., Palermo, C., Centonze, D., 2009. Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1216, 8636-8641.
- Rahimtula, A.D., Béréziat, J.C., Bussacchini-Griot, V., Bartsch, H., 1988. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin a toxicity. *Biochemical Pharmacology* 37, 4469-4477.
- Rahmani, A., Jinap, S., Soleimany, F., 2009. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 202-251.
- Raj, H.G., Prasanna, H.R., Magee, P.N., Lotlikar, P.D., 1986. Effect of purified rat and hamster hepatic glutathione S-transferases on the microsome mediated binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to DNA. *Cancer Letters* 33, 1-9.
- Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23, 117-125.
- Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology* 106, 291-296.
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), 2014. 2013 Annual Report. The

- Health and Consumers Directorate-General of the European Commission. Office for Official Publications of the European Communities. Publications Office of the European Union. Luxembourg.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology* 154, 1222-1226.
- Razzazi-Fazeli, E., Rabus, B., Cecon, B., Bohm, J., 2002. Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 968, 129-142.
- RD, 1988. Real Decreto 475/1988, de 13 de Mayo de 1988, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para consumo humano BOE nº 121, 15329.
- RD, 1998. Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. BOE nº 188, 26910-26927
- RD, 2003. Real Decreto 465/2003 de 25 de abril sobre las sustancias indeseables en la alimentación animal. BOE nº 102, 16485-16493
- 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.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Vismer, H.F., 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2101-2105.
- Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3-10.
- Ritchie, F., McQuilken, M.P., Bain, R.A., 2006. Effects of water potential on mycelial growth, sclerotial production, and germination of *Rhizoctonia solani* from potato. *Mycological Research* 110, 725-733.
- Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F.M., 2016. Effectiveness of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells A review. *Food Additives and Contaminants* 22, 369-378.
- Rodríguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J.-L., Guillarme, D., 2012. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. *Journal of Chromatography A* 1292, 2-18.
- Rodríguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D.B., 2007. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for

- monitoring of emerging contaminants in water, *Journal of Chromatography A* 1152, 97-115.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology* 162, 447-463.
- Royer, D., Humpf, H.-U., Guy, P.A., 2004. Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 21, 678-692.
- Russell, R., Paterson, M. 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry* 41, 1467-1474.
- Rutqvist, L., Bjorklund, N.E., Hult, K., Hökby, E., Carlsson, B., 1978. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 36, 920-925.
- Sachin, B.S., Najar, I.A., Sharma, S.C., Verma, M.K., Reddy, M. V., Anand, R., Khajuria, R.K., Koul, S., Johri, R.K., 2010. Simultaneous determination of etoposide and a piperine analogue (PA-1) by UPLC-qTOF-MS: Evidence that PA-1 enhances the oral bioavailability of etoposide in mice. *Journal of Chromatography B* 878, 823-830.
- Säde, E., Björkroth, J., 2014. Identification methods | DNA Fingerprinting: Restriction Fragment-Length Polymorphism. En: Batt C.A., Tortorello M.L., (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, pp. 274-281.
- Sáez, J.M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., Jiménez, M., 2004. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1029, 125-133.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. *International Journal of Food Microbiology* 114, 160-167.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44, 133-148.
- Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50, 45-61.
- Sanchis, V., Magan, N., 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins,

- En: Magan, N., Olsen, M. (Eds.). *Mycotoxins in food. Detection and Control*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 174-189.
- Sanchis, V., Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J., 2006. Ecophysiology of fumonisin producers in *Fusarium* Section *Liseola*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 571, 115-122.
- SANCO, 2010. Guidance document for competent authorities for the control of compliance with EU legislation on aflatoxins. November 2010. [http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs\\_contaminants\\_sampling\\_analysis-guidance-2010\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_contaminants_sampling_analysis-guidance-2010_en.pdf)
- SANCO, 2013. SANCO/12571/2013 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues in food and feed. [http://www.eur-pesticides.eu/library/doc/allcrl/AqcGuidance\\_Sanco\\_2013\\_12571.pdf](http://www.eur-pesticides.eu/library/doc/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf)
- SANCO, 2014. Guidance document for the implementation of Comisión Regulation (EU) No 519/2014 of 1 may 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in food. [http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs\\_contaminants\\_sampling\\_guidance-sampling-final\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_contaminants_sampling_guidance-sampling-final_en.pdf)
- Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2010. Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by a highly sensitive PCR assay. *Food Additives and Contaminants A* 27, 853–858.
- Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Geisen, R., 2013. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. *International Journal of Food Microbiology* 166, 407-412.
- Schoental, R., 1983. Precocious sexual development in Puerto Rico and oestrogenic mycotoxins (zearalenone). *Lancet* 1, 537.
- Schothorst, R. C., Jekel, A., 2001. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry* 73, 111-117.
- Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Van Egmond, H.P., De Mul, A., Boon, P.E., Van Klaveren, J.D., 2005. Determination of trichothecenes in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Food Additives and Contaminants* 22, 48-55.
- Scientific Committee on Food (SCF), 2000. Opinion on *Fusarium* toxins, Part 2, Zearalenone. Scientific Committee on Food SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev. 3 Final.
- Scientific Committee on Food (SCF), 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, adopted on 26 February 2002. SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final.

- Scientific Committee on Food (SCF), 2003. Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3. Scientific Committee on Food SCF/CS/CNTM/MYC/28.
- SCOOP (Scientific Co-Operation), 2003. SCOOP Task 3.2.10. Reports on tasks for scientific co-operation. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Final Report. Scientific Co-Operation on Questions relating to Food. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, 609 pp. <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>.
- Scott, P.M., Trucksess, M.W., 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International* 80, 941-949.
- Scott, P.M., Zhao, W., Feng, S., Lau, B.P.Y., 2012. *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether in grain foods in Canada. *Mycotoxin Research* 28, 261-266.
- Scott, W.J., 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Advances in Food Research* 7, 83-127.
- Sebastià, N., Meca, G., Soriano, J.M.M., Mañes, J., 2012. Presence of *Fusarium* emerging mycotoxins in tiger-nuts commercialized in Spain. *Food Control* 25, 631-635.
- Seefelder, W., Knecht, A., Humpf, H.-U., 2003. Bound fumonisin B1: analysis of fumonisin-B1 glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5567-5573.
- Selvaraj, J.N., Zhou, L., Wang, Y., Zhao, Y. ju, Xing, F. guo, Dai, X. feng, Liu, Y., 2015. Mycotoxin detection - Recent trends at global level. *Journal of Integrative Agriculture* 14, 2265-2281.
- Senyuva, H.Z., Gilbert, J., 2010. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B* 878, 115-132.
- Serrano, A.B., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E., 2013. Emerging *Fusarium* mycotoxins in organic and conventional pasta collected in Spain. *Food and Chemical Toxicology* 51, 259-266.
- Serrano, A.B., Meca, G., Font, G., Ferrer, E., 2012. Risk assessment associated to the intake of the emerging *Fusarium* mycotoxins BEA, ENs and FUS present in infant formula of Spanish origin. *Food Control* 28, 178-183.
- Shank, R.A., Foroud, N.A., Hazendonk, P., Eudes, F., Blackwell, B.A., 2011. Current and future experimental strategies for structural analysis of trichothecene mycotoxins--a prospectus. *Toxins* 3, 1518-1553.
- Sheibani, A., Ghaziaskar, H.S., 2009. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> from pistachio. *Food Control* 20, 124-128.

- Shephard G.S., 2004. Mycotoxins worldwide: current issues in Africa. En: Barug, D., Van, Egmond H.P., López Garcíá, R., Van Osenbruggen, W.A., Visconti, A., (Eds.) Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 81–88
- Shephard, G.S., 1998. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *Journal of Chromatography A* 815, 31-39.
- Shephard, G.S., Sewram, V., 2004. Determination of the mycotoxin fumonisin B1 in maize by reversed-phase thin-layer chromatography: a collaborative study. *Food Additives and Contaminants* 21, 498-505.
- Sibanda, L., De Saeger, S., Van Peteghem, C., 2002. Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. *Journal of Chromatography A* 959, 327-330.
- Sibanda, L., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Tomczak, M., 2000. Detection of T-2 toxin in different cereals by flow-through enzyme immunoassay with a simultaneous internal reference. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5864-5867.
- Sifou, A., Meca, G., Serrano, A.B., Mahnine, N., El Abidi, A., Mañes, J., El Azzouzi, M., Zinedine, A., 2011. First report on the presence of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in rice on the Moroccan retail markets. *Food Control* 22, 1826-1830.
- SILUM, 2015. Datos de producción de piensos 2015. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.  
[http://aplicaciones.magrama.es/silum/silum\\_docs/novedades/6983/1.pdf](http://aplicaciones.magrama.es/silum/silum_docs/novedades/6983/1.pdf)
- Silva, L., Fernández-Franzón, M., Font, G., Pena, A., Silveira, I., Lino, C., Mañes, J., 2009. Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors. *Food Chemistry* 112, 1031-1037.
- Simatos, D., Karel, M., 1988. Characterization of the condition of water in foods—physicochemical aspects. En: Seow, C.C., Teng, T.T., Quah, C.H. (Eds.), *Food Preservation by Moisture Control*. Elsevier Applied Science, London, 1–41.
- Simonella, A., Torreti, L., Filippini, C., Falgisi, A., Ambrosii, L., 1987. Simultaneous determination of aflatoxins G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, in animal feedstuffs by HPTLC and RP-HPLC. *Journal of High Resolution Chromatography* 10, 626-628.
- Sirhan, A.Y., Tan, G.H., Wong, R.C.S., 2013. Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). *Food Control* 31, 35-44.

- Smedsgaard, J., Frisvad, J.C., 1996. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *Journal of Microbiological Methods* 25, 5-17.
- Soboleva, T.K., Pleasants, A.B., Le Roux, G., 2000. Predictive microbiology and food safety. *International Journal of Food Microbiology* 57, 183-192.
- Soleimany, F., Jinap, S., Abas, F., 2012a. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 130, 1055-1060.
- Soleimany, F., Jinap, S., Faridah, A., Khatib, A., 2012b. A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. *Food Control* 25, 647-653.
- Sørensen, L.K., Elbæk, T.H., 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 820, 183-196.
- Spanjer, M., 2006. Theory and criteria for practical sampling. Abstracts of lectures and posters, The World Mycotoxin Forum, The Fourth Conference, Cincinnati, USA, November 6–8, 2006, p. 55.
- Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Scholten, J.M., 2008. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives and Contaminants, Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 25, 472-489.
- Spaulding, R.S., George, K.M., Thompson, C.M., 2006. Analysis and sequencing of the active-site peptide from native and organophosphate-inactivated acetylcholinesterase by electrospray ionization, quadrupole/time-of-flight (QTOF) mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 830, 105-113.
- Squire, R.A., 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 214, 877-880.
- Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U., Gilbert, J., Jrisen, U., Gilbert, J., Barmark, A., Brera, C., Clasen, P.E., Galagher, F., Gardikis, J., Jensen, L.B., Lee, F., Luz, M., Michelet, J.Y., Noutio, K., Palvras, L., Pittet, A., Reutter, M., Scholten, J.M., Strassmeier, E., Szymanski, L., Jörissen, U., Gilbert, J., 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 83, 320-340.
- Stroka, J., Capelletti, C., Papadopoulou-Bouraoui, A., Pallaroni, L., Anklam, E., 2002. Investigation of alternative reagents to 2-mercaptoethanol for the pre-column derivatization of fumonisins with ophthalaldehyde, for HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 25,

---

1821-1833.

- Stroka, J., Otterdijk, R. van, Anklam, E., 2000. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A* 904, 251-256.
- 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.
- Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., 2007a. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 1505-1523.
- Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., 2007b. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. *Food Additives and Contaminants* 24, 1184-1195.
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43, 141-158.
- Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenström, S., Snijman, P.W., Van Schalkwyk, D.J., 1996. Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin B1, B2, and B3 in Corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 79, 688-696.
- Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., 2006. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 1422-1428.
- Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y., Ueno, Y., 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 882, 23-28.
- Thompson, W.L., Wannemacher, R.W., 1986. Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicon* 24, 985-994.
- Thuret, G., Chiquet, C., Herrag, S., Dumollard, J.-M., Boudard, D., Bednarz, J., Campos, L., Gain, P., 2003. Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *The British Journal of Ophthalmology* 87, 346-352.
- Tonoli, D., Varesio, E., Hopfgartner, G., 2012. Quantification of acetaminophen



- and two of its metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography-low and high resolution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 904, 42-50.
- Trebstein, A., Seefelder, W., Lauber, U., Humpf, H.U., 2008. Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4968-4975.
- Ueno, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Sato, N., SHIMADA, N., 1973. Comparative toxicology of trichothec mycotoxins: inhibition of protein synthesis in animal cells. *Journal of Biochemistry* 74, 285-96.
- Ueno, Y., Tashiro, F., 1981. alpha-Zearalenol, a major hepatic metabolite in rats of zearalenone, an estrogenic mycotoxin of *Fusarium* species. *Journal of Biochemistry* 89, 563-71.
- Uhlig, S., Botha, C.J., Vrålstad, T., Rolén, E., Miles, C.O., 2009. Indole-diterpenes and ergot alkaloids in *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) infected with *Claviceps cynodontis* from an outbreak of tremors in cattle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 11112-11119.
- Uhlig, S., Petersen, D., Flåøyen, A., Wilkins, A., 2005. 2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol, a new sphingosine analogue toxin in the fungal genus *Fusarium*. *Toxicon* 46, 513-522.
- Urraca, J.L., Benito-Peña, E., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M.C., Pestka, J.J., 2005. Analysis of zearalenone in cereal and swine feed samples using an automated flow-through immunosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3338-3344.
- Urraca, J.L., Carbajo, M.C., Torralvo, M.J., González-Vázquez, J., Orellana, G., Moreno-Bondi, M.C., 2008. Effect of the template and functional monomer on the textural properties of molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 155-161.
- Urraca, J.L., Marazuela, M.D., Merino, E.R., Orellana, G., Moreno-Bondi, M.C., 2006. Molecularly imprinted polymers with a streamlined mimic for zearalenone analysis. *Journal of chromatography A* 1116, 127-134.
- Urraca, J.L., Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C., 2004. Analysis for zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 524, 175-183.
- Urry, W.H., Wehrmeister, H.L., Hodge, E.B., Hidy, P.H., 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters* 7, 3109-3114.
- USDA, 2003. Pathogen Modelling Program, Version 7.0. U.S. Dept. of Agriculture, A.R.S., Eastern Regional research Center.

- Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J. V., Jiménez, M., 2011. Determination of type A and type B trichothecenes in paprika and chili pepper using LC-triple quadrupole-MS and GC-ECD. *Talanta* 84, 1112-1117.
- Valle-Algarra, F.M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J. V, Llorens, A., Jiménez, M., Mateo, R., 2005. Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD. *Talanta* 66, 194-201.
- Vallverdú-Queralt, A., Jáuregui, O., Di Lecce, G., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., 2011. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF). *Food Chemistry* 129, 877-883.
- Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., Rychlik, M., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., 2014. Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control* 37, 165-170.
- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, D.B., Theron, J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.
- Van Dongen, P.W.J., de Groot, A.N.J.A., 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 60, 109-116.
- Van Egmond, H.P., 2004. Natural toxins: Risks, regulations and the analytical situation in Europe. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 1152-1160.
- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jonker, M.A., 2007. Regulations relating to mycotoxins in food : Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 147-157.
- Varga, E., Glauner, T., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., 2013. Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 5087-5104.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z., 2006. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology* 17, 72-81.
- Vdovenko, M.M., Lu, C.C., Yu, F.Y., Sakharov, I.Y., 2014. Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk. *Food Chemistry* 158, 310-314.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2000. The effect of

- fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* 59, 59-66.
- Ventura, M., Guillén, D., Anaya, I., Broto-Puig, F., Lliberia, J.L., Agut, M., Comellas, L., 2006. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> and ochratoxin A in beer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 3199-3204.
- Vindeløv, J., Arneborg, N., 2002. Effects of temperature, water activity, and syrup film composition on the growth of *Wallemia sebi*: Development and assessment of a model predicting growth lags in syrup agar and crystalline sugar. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1652-1657.
- Visconti, A., Lattanzio, V.M.T., Pascale, M., Haidukowski, M., 2005. Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1075, 151-158.
- Visconti, A., Pascale, M., 1998. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 815, 133-140.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 864, 89-101.
- Voss, K.A., Plattner, R.D., Riley, R.T., Meredith, F.I., Norred, W.P., 1998. In vivo effects of fumonisin B1-producing and fumonisin B1 -nonproducing *Fusarium moniliforme* isolates are similar: Fumonisin B2 and B3 cause hepato- and nephrotoxicity in rats. *Mycopathologia* 141, 45-58.
- Voss, K.A., Riley, R.T., Snook, M.E., Gelineau-van Waes, J., 2009. Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B1 and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: Hydrolyzed fumonisin B1 did not cause neural tube defects. *Toxicological Sciences* 112, 459-467.
- Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., Haesaert, G., 2016. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 2284-2302.
- Wang, X., Wang, S., Cai, Z., 2013. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 52, 170-185.
- Wang, X.H., Wang, S., 2008. Sensors and biosensors for the determination of small molecule biological toxins. *Sensors* 2008, 6045-6054.

- Weidenbörner, M., 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Springer-Verlag, Berlin.
- Weidenborner, M., 2007. Mycotoxins in feedstuffs, Springer, New York.
- Weidenborner, M., 2011. Mycotoxins and Their Metabolites in Humans and Animals, Springer, New York.
- Weingaertner, J., Krska, R., Praznik, W., Grasserbauer, M., Lew, H., 1997. Use of Mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electron-capture gas chromatography. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 357, 1206-1210.
- Wheeler, K.A., Hurdman, B.F., Pitt, J.I., 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology 12, 141-149.
- Whitaker, T.B., 2006. Sampling foods for mycotoxins. Food Additives and Contaminants 23, 50-61.
- Whiting, R.C., 1995. Microbial modeling in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 6, 467-494.
- WHO/FAO, 1990. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Chapter Patulin. The 35th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Food Additives Series 26, 143–165
- WHO/FAO, 1991. Toxicological evaluation of certain Food Additives and Contaminants. Chapter Ochratoxin A. The 37th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Food Additives Series 28, 365–417
- WHO/FAO, 1996. Toxicological evaluation of certain Food Additives and Contaminants. Chapters Ochratoxin A and Patulin. The 44th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Food Additives Series 35, 363–402
- WHO/FAO, 1999. Evaluation of certain Food Additives and Contaminants. Aflatoxins. Forty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Report Series 884, 69–77
- WHO/FAO, 2000. Evaluation of certain Food Additives and Contaminants. Zearalenone. Fifty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Report Series 896, 93–96
- WHO/FAO, 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in Food: Aflatoxin M<sub>1</sub>, Fumonisin, Ochratoxin A, trichothecenes Deoxynivalenol, T-2 and HT-2. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives series 47 and FAO Food and Nutrition Paper 74. International Programme on Chemical Safety, World

- Health Organization, Geneva.
- WHO/FAO, 2002. Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 906, World Health Organization, Geneva.
- WHO/FAO, 2008. Evaluation of certain mycotoxins in food. Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 947, World Health Organization, Geneva.
- WHO/FAO, 2011. Evaluation of certain mycotoxins in food. Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 959, World Health Organization, Geneva.
- WHO/FAO, 2012. Discussion Paper on Proposed Draft Maximum Levels for Fumonisin in Maize and Maize-Products and Associated Sampling Plans, Codex Alimentarius Commission.
- Widestrand, J., Pettersson, H., 2001. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. *Food Additives and Contaminants* 18, 987-992.
- Wild, C.P., Turner, P.C., 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17, 471-481.
- Wilkes, J.G., Sutherland, J.B., 1998. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. *Journal of Chromatography B* 717, 135-156.
- Wong, M.C.Y., Lee, W.T.K., Wong, J.S.Y., Frost, G., Lodge, J., 2008. An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/QToF MS. *Journal of Chromatography B* 871, 341-348.
- Wong, S.-S., Zhou, H.-R., Pestka, J.J., 2002. Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on the binding of transcription factors AP-1, NF-kappaB, and NF-IL6 in raw 264.7 macrophage cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 65, 1161-80.
- Wu F., 2006. A tale of two commodities: how EU mycotoxin regulations have hurt, or helped, food industries. Abstracts of lectures and posters, The World Mycotoxin Forum, The Fourth Conference, 2006, p 30.
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Yuan, Z., 2010. Metabolic pathways of trichothecenes. *Drugs Metabolism Reviews* 42, 250-267.
- Wu, W., He, K., Zhou, H.-R., Berthiller, F., Adam, G., Sugita-Konishi, Y., Watanabe, M., Krantis, A., Durst, T., Zhang, H., Pestka, J.J., 2014. Effects of oral exposure to naturally-occurring and synthetic deoxynivalenol congeners on proinflammatory cytokine and chemokine mRNA expression in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 278, 107-115.

- Xu, X., Nicholson, P., Ritieni, A., 2007. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* 119, 67-71.
- Yates, S.G.G., Tookey, H.L.L., Ellis, J.J.J., Burkhardt, H.J.J., 1968. Mycotoxins produced by *Fusarium nivale* isolated from tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Phytochemistry* 7, 139-146.
- Yin, Y., Lou, T., Yan, L., Michailides, T.J., Ma, Z., 2009. Molecular characterization of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, collected from peanut fields in China. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1857-1865.
- Yoshizawa, T., Yamashita, A., Luo, Y., 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1626-1629.
- Yu, J.C.C., Lai, E.P.C., 2004. Polypyrrole film on miniaturized surface plasmon resonance sensor for ochratoxin A detection. *Synthetic Metals* 143, 253-258.
- Zachariassova, M., Lacina, O., Malachova, A., Kostelanska, M., Poustka, J., Godula, M., Hajslova, J., 2010. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 662, 51-61.
- Zain, M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15, 129-144.
- Zhang, H.M., Li, S.L., Zhang, H., Wang, Y., Zhao, Z.L., Chen, S.L., Xu, H.X., 2012. Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62, 258-273.
- Zheng, M.Z., Richard, J.L., Binder, J., 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161, 261-73.
- Zhou, J.Z., Waszkuc, T., Garbis, S., Mohammed, F., 2002. Liquid chromatographic determination of S-adenosyl-L-methionine in dietary supplement tablets. *Journal of AOAC International* 85, 901-905.
- Zhu, Y., Hassan, Y.I., Watts, C., Zhou, T., 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients-A review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology* 216, 19-29.
- Zinedine, A., González-Osnaya, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Idrissi, L., Mañes, J., 2007. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology* 114, 25-29.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of

- zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1-18.
- 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.
- 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. *Journal of Chromatography A* 1177, 50-57.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Notermans, S., 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van't Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094-1101.