



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Agradecimientos:

Quisiera dedicar unas palabras de agradecimiento a mis tutoras, Susana Lorán y Marta Herrera, por su indispensable ayuda en la realización de este trabajo. A Patricia y Noemí, por su ayuda durante el trabajo en el laboratorio. A mis padres, mi marido y mi hijo por su infinita paciencia y apoyo durante este tiempo.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo (Grupo de investigación consolidado AO1: "Análisis y evaluación de la seguridad alimentaria").

Índice

Índice	0
1- Resumen.....	1
2- Abstract	2
3- Introducción	3
3.1- Micotoxinas	3
3.2- Aflatoxinas.....	4
4- Justificación y objetivos	12
5- Metodología:	13
5.1- Preparación de las muestras.....	13
5.2- Análisis de aflatoxinas mediante Inmunocromatografía de Flujo Lateral (IFL). 15	
5.3- Análisis de aflatoxinas mediante método instrumental HPLC.....	18
6- Resultados y discusión.	22
6.1- Resultados.....	22
a) Análisis del contenido de humedad de las muestras de cereales.....	22
b) Análisis de aflatoxinas en muestras de cereales por el método IFL.....	23
6.2- Análisis de aflatoxinas en muestras de cereales mediante HPLC con detector de fluorescencia.	25
6.3- Discusión de los resultados.....	26
7- Conclusiones.	30
8- Conclusions.....	31
9- Aportaciones en materia de aprendizaje: Identificación de las aportaciones que, en materia de aprendizaje, han supuesto esta asignatura.....	32
10- Bibliografía.....	33

1- Resumen

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas naturalmente por el metabolismo secundario de algunas especies de hongos filamentosos. De todas las micotoxinas conocidas, las aflatoxinas se consideran unas de las más importantes por su elevada toxicidad debido a su acción carcinógena. Son producidas fundamentalmente por las especies *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*, hongos que pueden desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, con una alta humedad relativa y con nutrientes básicos. Actualmente se conocen hasta 18 tipos diferentes de aflatoxinas siendo las más importantes las de tipo B₁, B₂, G₁ y G₂ (Soriano del Castillo, 2007).

Los cereales y frutos secos son los productos en los que más frecuentemente se detectan estas toxinas. Según los datos publicados por el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos de la Unión Europea (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), en los últimos años, las notificaciones por micotoxinas han aumentado siendo en torno al 90 % de ellas debidas a aflatoxinas, y estando mayoritariamente asociadas a frutos secos procedentes de zonas tropicales fuera de la Unión Europea. Además, se han notificado algunos casos de contaminación por aflatoxinas en los países de la costa mediterránea, lo que se asocia al aumento de las temperaturas debido al cambio climático (Fernández, 2014).

En el presente estudio se ha planteado como objetivo evaluar las tasas de contaminación de muestras de cereales procedentes de diferentes regiones de España, las cuales se analizaron por un método de cribado de inmunocromatografía de flujo lateral (IFL) y posterior confirmación por cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia y fotoquímico (HPLC-PHRED-FLD).

Ninguna de las muestras analizadas por el método de confirmación (HPLC-PHRED-FLD) sobrepasó el límite de cuantificación del método, el cual es muy inferior al límite máximo legal establecido para estas toxinas en alimentos según el Reglamento (CE) n°1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (2 µg/kg para aflatoxina B₁ y 4 µg/kg para aflatoxinas totales (B₁+B₂+G₁+G₂) en cebada, 5 y 10 µg/kg para aflatoxina B₁ y totales respectivamente para el maíz).

2- Abstract

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by some filamentous moulds. The most important among them because of their high toxicity due to their carcinogenic properties are aflatoxins. These toxins are mainly produced by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*, species which can grow in a wide range of temperatures, with high relative humidity and basic nutrients. Currently, up to 18 different types of aflatoxins are known, being the most important B₁, B₂, G₁ and G₂ (Soriano del Castillo, 2007).

Cereal and nuts are the commodities in which these toxins are most frequently detected. According to data published by the European Union Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), in recent years, there has been an increase of notifications for mycotoxins (around 90 % of them are due to aflatoxins) mostly associated with nuts from tropical areas outside the EU. In addition, some cases of aflatoxin contamination have been reported in countries along the Mediterranean coast, which is associated with increased temperatures related to climate change (Fernández, 2014).

The objective of this study was to evaluate the contamination rates of cereals coming from different regions of Spain, which were analyzed by lateral flow immunochromatography (IFL) screening method and subsequent confirmation by high performance liquid chromatography with fluorescence and photochemical detectors (HPLC- -PHRED-FLD).

None of the samples analyzed by the confirmatory method (HPLC-FLD) exceeded the limit of quantification (LOQ), which is far below the legal limit established for these contaminants by European Commission Regulation (EC) n°1881/2006 of 19 December 2006 laying down maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (2 µg/kg for B₁ aflatoxin and 4 µg/kg for all aflatoxins (B₁+B₂+G₁+G₂) in barley, 5 and 10 µg/kg for B₁ aflatoxin and all aflatoxins respectively for maize.

3- Introducción

3.1- Micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos altamente tóxicos resultado del metabolismo secundario de algunos hongos filamentosos. Éstos los producen a partir de aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, azúcares y proteínas presentes en diferentes sustratos y bajo condiciones ambientales específicas (Cameán y Repetto, 2006).

Existe una gran variedad de hongos productores de micotoxinas, aunque los géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos pueden reproducirse en multitud de alimentos, tanto en pre-cosecha como en post-cosecha, por lo que se han detectado micotoxinas en una gran variedad de productos alimenticios, fundamentalmente en cereales, frutos secos y frutas (Tabla 1). Los efectos tóxicos de las micotoxinas son diversos y varían en función del tipo y de la dosis ingerida, pudiendo llegar a ser mortales en caso de una exposición elevada.

Tabla 1. Resumen de las principales micotoxinas. Fuente: Sociedad Española de Microbiología

Micotoxina	Hongo productor	Alimentos implicados	Efectos crónicos	Órgano diana
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i>	Frutos secos, maíz, trigo, cebada, especias, leche.	Cáncer, teratogénesis, mutagénesis, inmunosupresión.	Hígado.
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	Maíz, trigo, cebada, uvas y derivados, café, especias.	Cáncer, teratogénesis, inmunosupresión.	Riñón.
Patulina	<i>Penicillium</i>	Frutas, zumos y sidras.	Inmunosupresión.	-
Tricotecenos	<i>Fusarium</i>	Maíz, trigo y cebada.	Teratogénesis, inmunosupresión.	Piel y mucosas.
Fumonisinias	<i>Fusarium</i>	Maíz.	Cáncer, inmunosupresión.	Esófago.
Zearalenona	<i>Fusarium</i>	Maíz, trigo y cebada.	Inmunosupresión.	Sistema reproductor.

Es relevante destacar la influencia del cambio climático en la presencia de micotoxinas en alimentos. En los últimos años se están produciendo cambios en las precipitaciones, temperatura y concentración de CO₂ en el planeta. Estos factores alteran el ciclo vital de las plantas y también favorecen la colonización de las especies que generan las micotoxinas, las cuales posteriormente aparecen en la cadena alimentaria (Fernández, 2014). Por estas razones, los patrones de aparición de las micotoxinas están cambiando, generando un incremento del número de casos en los que se detectan determinadas micotoxinas, en zonas en las que antes su síntesis no era habitual.

Las toxinas fúngicas son compuestos termoestables, por lo que resisten a tratamientos térmicos de higienización en la industria, o culinarios en el hogar, siendo muy difícil eliminarlas una vez sintetizadas. Sin embargo, con buenas prácticas agrícolas, y la implantación de un correcto sistema de autocontrol en la industria alimentaria, es posible prevenir y controlar su aparición (ELIKA, 2005).

Se estima que el 25 % de los cultivos mundiales de cereal, dentro de los que se encuentran muchos alimentos básicos, están contaminados con algún tipo de micotoxina. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agriculture Organization*, FAO) estima que la contaminación de las cosechas con estos compuestos supone pérdidas del orden de 1.000 millones de toneladas de cereal al año (Köppen *et al.*, 2010).

Por todas estas razones, podemos afirmar que las micotoxinas son un problema de salud pública de dimensiones globales, por lo que se requiere un estudio más profundo de las mismas, además de la aplicación de medidas de prevención y métodos de control.

3.2- Aflatoxinas.

Las aflatoxinas son toxinas fúngicas producidas por algunas cepas de hongos del género *Aspergillus* como *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos microorganismos se desarrollan fundamentalmente en cereales, frutos secos y semillas, habitualmente durante el periodo de post-cosecha. Durante los últimos años, también se están detectando aflatoxinas en

alimentos como consecuencia de la aparición de estos mohos en periodos previos a la cosecha (EFSA, 2012).

Hasta la fecha se conocen unos 18 tipos de aflatoxinas diferentes, siendo las más importantes por su incidencia y toxicidad las aflatoxinas B₁ y B₂ (producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*), G₁ y G₂ (producidas por *A. parasiticus*), así como la aflatoxina M₁. Esta última, es resultado del metabolismo de la aflatoxina B₁, que sufre un proceso de hidroxilación en el hígado de los mamíferos que la ingieren y que se excreta a través de la leche.

La síntesis de las aflatoxinas se produce en la fase exponencial de crecimiento del hongo, al mismo tiempo que se producen las conidias (*Figura 1*), que son esporas producidas para su reproducción asexual (Shibamoto, 1996).

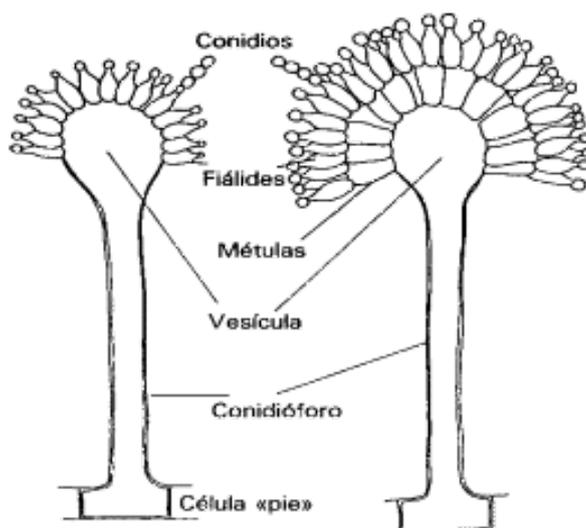


Figura 1. Esquema de la reproducción asexual de los hongos por conidias. Fuente: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

La actividad de agua mínima necesaria para el crecimiento del hongo es de 0,83, siendo la óptima para la síntesis de aflatoxinas entre 0,95 y 0,99. En el caso del rango de temperaturas, estos mohos pueden crecer entre 4 y 45 °C, siendo la temperatura óptima para la síntesis de la toxina entre 20 y 30 °C. Los requerimientos de nutrientes son básicos (fuentes de carbono y de nitrógeno), aunque la presencia de vitaminas del grupo B y minerales como el hierro, cadmio o el zinc, pueden incrementar la síntesis de aflatoxinas. Además, es importante resaltar que en ambientes con una concentración de

CO₂ superior al 10 %, o con una concentración de O₂ inferior al 20 % o mayor al 90 %, se inhibe la producción de micotoxinas (Weidenbörner, 2001).

Desde el punto de vista químico, las aflatoxinas son cumarinas que contienen anillos de bisfurano y configuración tipo lactona comunes a todas ellas. Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350 Dalton y la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol. Las aflatoxinas son estables en un rango de pH entre 3 y 10, y sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C (Soriano del Castillo, 2007).

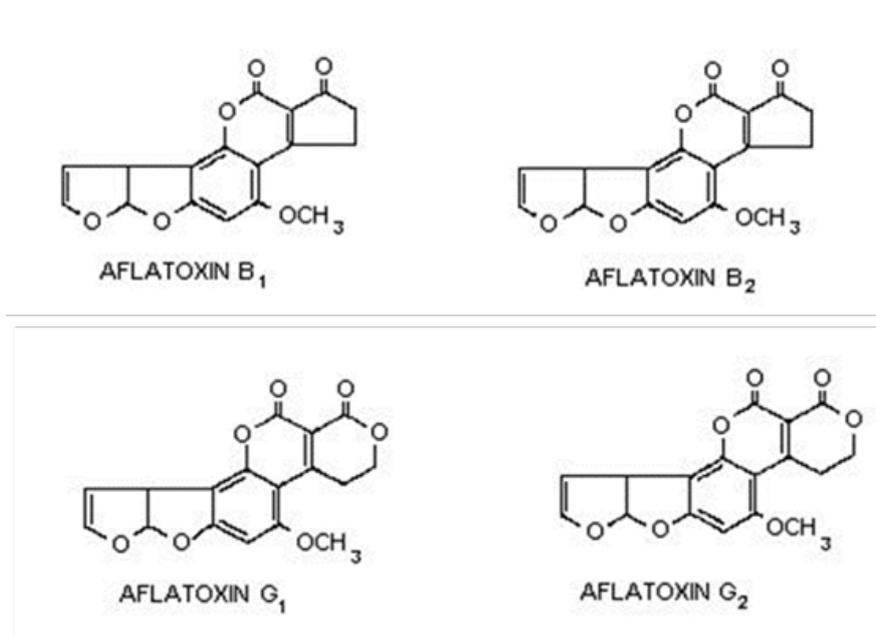


Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas más importantes. Fuente: Food-INFO.

Dependiendo de la estructura química, tienen una fluorescencia verde o azul (*Blue* y *Green*, en inglés), pudiendo clasificarlas de esta manera en aflatoxinas del grupo B (*Blue*: B₁, B₂) o del grupo G (*Green*: G₁, G₂). Debido a su condición apolar son liposolubles y no se destruyen en condiciones normales de cocinado, ya que tienen una alta termorresistencia, soportando temperaturas de hasta 250 °C (Weidenbörner, 2001).

Toxicidad

El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas da lugar a diferentes afecciones, denominadas aflatoxicosis, que las padecen tanto los humanos como los animales. Los síntomas agudos que producen estas toxinas en el hombre son fundamentalmente vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, convulsiones, coma y muerte. Más probable sin embargo es la toxicidad crónica, debida a la exposición continuada a bajas

concentraciones de aflatoxinas a través del consumo de distintos alimentos. La toxicidad de estos metabolitos afecta fundamentalmente al sistema hepático, pero también a los sistemas neurológico, renal, inmune, circulatorio y reproductivo (Lindner, 1995).

En el dictamen del 23 de septiembre de 1994 del Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH), las aflatoxinas fueron consideradas cancerígenos genotóxicos. Con arreglo a este dictamen, en la Unión Europea se consideró conveniente limitar el contenido total de estos contaminantes en los alimentos (la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂) así como el contenido de aflatoxina B₁ en particular, ya que es un metabolito mucho más tóxico que las demás (AECOSAN, 2015).

Asimismo, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) ha catalogado las aflatoxinas como cancerígenos para el hombre (grupo 1), haciendo una clasificación aparte para el metabolito M₁, que pertenece al grupo 2B, es decir, se ha clasificado como probable carcinógeno (IARC, 2012).

El principal mecanismo de toxicidad de estos compuestos, es la desnaturalización de los ácidos nucleicos. Los metabolitos de la aflatoxina B₁ se unen al ácido desoxirribonucleico, principalmente en el nitrógeno 7 de la guanina, por lo que no se puede producir la transcripción y disminuye la síntesis de ácido ribonucleico. Es por ello, que la acción carcinogénica de la aflatoxina se explica por la obstaculización de la síntesis de DNA. Además, también disminuye la síntesis de proteínas y obstaculiza procesos metabólicos, como el ciclo de Krebs y el transporte de los electrones en las mitocondrias (Lindner, 1995).

Si bien hasta la fecha no se han fijado niveles de ingesta diaria tolerable para estos contaminantes, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria estableció un valor BMDL10 (Límite Mínimo de Confianza, en inglés: *Benchmark Dose Lower confidence limit*) de 0,87 µg/kg de peso corporal y día, es decir, la ingesta diaria de esta cantidad incrementaría en un 10 % el riesgo de padecer cáncer en el 95% de la población expuesta (EFSA, 2007).

Aflatoxinas en alimentos

Las condiciones de temperaturas cálidas y humedades relativas altas favorecen el desarrollo de los mohos y explican que los alimentos de países de clima cálido se contaminen con aflatoxinas con mayor frecuencia que los países de climas fríos. Este tipo de contaminación puede presentarse en cereales (maíz, arroz, sorgo, centeno, avena, cebada, etc.), plantas oleaginosas (soja, girasol, etc.), especias (pimienta, mostaza, clavo, etc.), higos, vinos y pasas. Algunos ingredientes se pueden usar como pienso para alimentos de animales y pasar a la carne, leche y huevos (ACSA, 2011).

En los últimos años debido al cambio climático, el patrón de temperaturas y de precipitaciones ha variado. Esto propicia que, en países considerados de climas templados, esté aumentando la presencia de los mohos productores de aflatoxinas y, por consiguiente, se eleve el número de casos en los que se detectan estos contaminantes en alimentos (EFSA, 2012).

Un ejemplo, es el caso de contaminación por aflatoxinas sucedido en Andalucía (España) en el año 2013. En este caso, se utilizó maíz con concentraciones de aflatoxina B₁ superiores al límite máximo legal permitido (5 µg/kg), para la elaboración de piensos de ganado vacuno. A consecuencia del uso de estos piensos por parte de una empresa ganadera, se detectó un nivel de aflatoxinas M₁ en la leche procedente de sus granjas superior al límite legal (establecido en 0,05 µg/kg). A causa de esta investigación se inmovilizaron 200.000 kg de maíz contaminado y hubo que destruir 2.000.000 L de leche (Caballero, 2013).

Casos como el expuesto, han ido en aumento en los últimos años. En el año 2007, debido a la preocupación sobre la influencia que el cambio climático pudiera tener en la contaminación de los alimentos por aflatoxinas, la EFSA inició una investigación sobre la presencia de estos contaminantes en cereales y subproductos del cereal, que finalmente culminó en 2013 con la presentación de un informe técnico en el que se exponían los resultados (EFSA, 2013).

En este extenso estudio, se analizaron durante el periodo 2007-2012, muestras de diversos cereales y productos derivados, procedentes en su mayoría de Alemania, Austria y Eslovenia. De las 2.138 muestras analizadas, 219 (en torno al 10 %),

presentaron concentraciones de aflatoxinas por encima de 0,45 µg/kg. La contaminación hallada se encontró en un rango de concentración entre 2,21 y 2,60 µg/kg para los cereales y entre 0,45 y 1,87 µg/kg para los productos de cereales procesados, no sobrepasando en ningún caso los límites legales establecidos para la suma de aflatoxinas.

Debido a la elevada toxicidad de las aflatoxinas y a las recomendaciones por parte de las autoridades sanitarias de limitar la ingesta por parte de la población, la Comisión Europea fijó contenidos máximos para estos contaminantes en las materias primas y alimentos susceptibles destinados a alimentación humana. Actualmente se recogen en el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes como las micotoxinas en los productos alimenticios. Concretamente, este Reglamento establece unos contenidos máximos para todas las matrices alimentarias en las que se pueden encontrar aflatoxinas, tanto para la forma B₁, como para la suma total de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂). De entre todos ellos, podemos encontrar límites para los cereales (entre los que se incluye la cebada) y otros más específicos para el maíz y el arroz, los cuales se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Tabla límites máximos de aflatoxinas permitidos en cereales. Fuente: Reglamento (CE) nº 1881/2006.

Productos alimenticios	Contenidos máximos (µg/kg)	
	Aflatoxina B ₁	Suma total de aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂)
Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos de cereales transformados (salvo excepciones del Reglamento)	2,0	4,0
Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0

La Unión Europea, a través del Reglamento (CE) nº 178/2002, estableció los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria y fijó los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Uno de estos procedimientos, fue el desarrollo del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF), el cual se encarga de la comunicación y coordinación de las alertas alimentarias a nivel europeo.

Gracias a este sistema, podemos saber que el número de notificaciones por aflatoxinas de los últimos años ha aumentado de manera alarmante. En el año 2015, un porcentaje mayoritario de las notificaciones por micotoxinas, el 88,6 % en alimentos y el 89,5 % en piensos, fueron debidas a la contaminación por aflatoxinas, una tendencia que se ha mantenido desde el año 2004. El pequeño porcentaje restante se deben a otras micotoxinas, como ocratoxina A o zearalenona (RASFF, 2015).

En el informe preliminar del RASFF del 2016, destaca en el “top 10” de notificaciones la presencia de aflatoxinas en diferentes alimentos, siendo los frutos secos y semillas seguido de los cereales los más frecuentemente relacionados con esta contaminación. La mayoría de estas notificaciones han sido rechazos en frontera de productos procedentes de fuera de la UE, mayoritariamente de países asiáticos, siendo los frutos secos y semillas los más afectados por esta contaminación. En la *Figura 3* se puede observar que hubo un descenso en el número de notificaciones, pero que en general la tendencia es ascendente, poniendo de manifiesto la necesidad de un mayor estudio y control de las aflatoxinas.

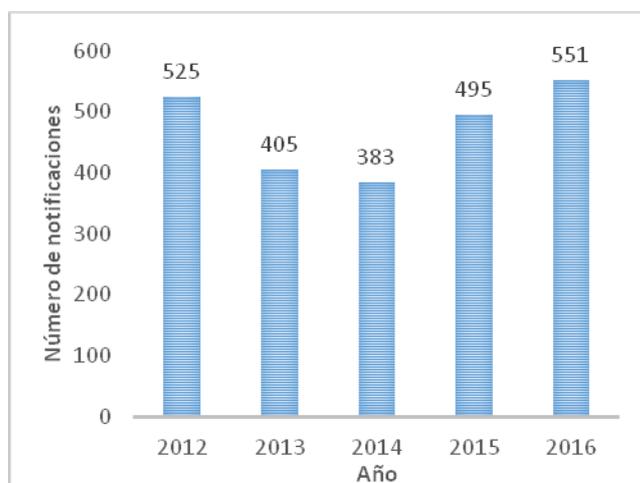


Figura 3. Número de notificaciones por micotoxinas en los últimos años. Fuente: Informe Preliminar RASFF 2016.

Prevención y control.

Las aflatoxinas son química y térmicamente muy estables por lo que, una vez sintetizadas, son muy difíciles de eliminar de los alimentos mediante los tratamientos tecnológicos convencionales. Si bien la mejor estrategia para evitar su presencia en los

alimentos y piensos se basa en establecer medidas de prevención y control tanto en el campo, como en el almacenamiento y procesado de las materias primas y alimentos:

- Estrategias en pre-cosecha: Estrategias dirigidas a evitar el desarrollo de los mohos y la formación de aflatoxinas en los cultivos. Una de las más efectivas se basa en el control de plagas de insectos, disminuyendo su presencia y favoreciendo tanto que haya menor daño en el cultivo como una menor dispersión de los mohos. Este control se puede llevar a cabo mediante la aplicación de fungicidas y pesticidas, el cultivo de especies resistentes a las plagas y evitando el estancamiento de las aguas de riego en los campos de cultivo. Otra estrategia efectiva es el crecimiento competitivo de cepas de *A. parasiticus* y *A. flavus* no toxigénicas.
- Estrategias post-cosecha: Son aquellas medidas que se aplican desde la recogida del cereal hasta su almacenamiento. Los trabajos en esta fase se deben realizar evitando que el cereal esté en contacto con vectores de transmisión con medidas para el control de plagas, asegurando una limpieza adecuada de los equipos de recogida y transporte así como almacenando el cereal en silos cerrados y acondicionados. Durante este almacenamiento, los parámetros de temperatura y humedad relativa deben controlarse continuamente, evitando que éstos se eleven impidiendo así el desarrollo de los microorganismos en los granos de cereal (Njapau *et al.*, 2004). Otras acciones que se podrían utilizar para reducir o eliminar la toxina una vez está presente en el alimento son la aplicación de temperaturas de tratamiento térmico muy elevadas (> 250 °C), adición de adsorbentes a las materias primas como la bentonita que adsorben las micotoxinas y favorecen su eliminación o extracción de las mismas con disolventes orgánicos. Estos tratamientos no son viables desde el punto de vista económico y porque cambiarían además las características intrínsecas de las materias primas y del producto final. Además, se ha estudiado la utilización de otras sustancias como el ozono, peróxido de hidrógeno, amoníaco o cloro para intentar eliminar la toxina, ya que reaccionan con las aflatoxinas rápidamente, pero se ha comprobado que este tipo de compuestos provoca la pérdida de nutrientes y puede afectar a la inocuidad de los productos alimenticios (Weidenbörner, 2001).

4- Justificación y objetivos

En los últimos años existe una preocupación creciente sobre la presencia de aflatoxinas en piensos y alimentos procedentes de la zona mediterránea ya que ésta ha aumentado notablemente, debido probablemente a los efectos del cambio climático.

Este incremento en la incidencia unido al potencial carcinogénico de las aflatoxinas, plantea la necesidad de establecer acciones de vigilancia de estos contaminantes en diferentes matrices alimentarias, especialmente frutos secos y cereales.

Por todo ello en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- Analizar 24 muestras de maíz y 9 de cebada destinados a alimentación humana y animal mediante técnicas de cribado (inmunocromatografía de flujo lateral) e instrumentales (HPLC).
- Evaluar el grado de contaminación de las muestras analizadas mediante la comparación con otros estudios realizados a nivel internacional y con los límites de seguridad establecidos para los alimentos en la Unión Europea.
- Investigar las tasas de contaminación en las materias primas analizadas para identificar posibles factores de riesgo que influyan en la contaminación con micotoxinas.

5- Metodología:

Para conseguir un control efectivo de los niveles de contaminación por aflatoxinas es necesario disponer de técnicas sensibles y precisas. En la actualidad se utiliza la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), pero requiere de mucho tiempo y mano de obra cualificada (Rubinson, 2004).

Para agilizar el proceso, dado el acelerado ritmo de la industria alimentaria, es habitual el uso de los métodos rápidos de cribado o *screening* como la inmunocromatografía de flujo lateral (IFL). Son técnicas fáciles de realizar y se pueden aplicar *in situ* en el campo, permitiendo una toma de decisiones rápida, aunque no hay que olvidar la necesidad de un posterior análisis de confirmación para las muestras que resulten positivas por técnicas instrumentales de análisis (EFSA, 2007).

El método analítico para evaluar las tasas de contaminación por aflatoxinas en este estudio consistió en primer lugar en la realización de un análisis de cribado por un método rápido de inmunocromatografía de flujo lateral. Esta técnica, con un límite de detección de 2 µg/kg para las aflatoxinas totales no discrimina entre los diferentes tipos de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂). Es por ello que, cuando se detectan cantidades de estos contaminantes por encima de los límites máximos, se requiere de una confirmación posterior mediante un método instrumental, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para confirmar los resultados y para cuantificar individualmente las aflatoxinas presentes en las muestras (Nielsen, 2003)

5.1- Preparación de las muestras.

En este trabajo se analizaron 33 muestras de cereales, 24 de maíz y 9 de cebada:

- Las muestras de maíz fueron cultivadas en diversas localizaciones de la comunidad autónoma de Aragón, cosechadas durante el año 2016 y enviadas directamente al laboratorio. Estas muestras fueron codificadas, nombrándolas con la letra "M" (Maíz) seguido del número de muestra (M1 a M24).

- Las muestras de cebada procedían de diferentes almacenes de grano de Cataluña. Se codificaron, nombrándolas con una “C” (Cebada) seguido del número de muestra (C1 a C9), y se cosecharon en los años 2015 y 2016.

Para conocer el porcentaje de humedad del grano cosechado, se utilizó un equipo NIR (Método de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano) (Infratec, 1241, FOSS, Barcelona, España). Posteriormente, las muestras que superaban un contenido de humedad del 15 % se sometieron a secado a 60 °C durante 10-12 horas en una estufa (Modelo Digitheat-TF, JP SELECTA S.A, Barcelona, España) hasta alcanzar un valor inferior a dicho porcentaje. Este paso fue necesario para poder obtener resultados homogéneos en cuanto al cálculo de la concentración de micotoxinas en las muestras de cereal, dado que se expresa la cantidad de aflatoxina por unidad de masa ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Previo al análisis, las muestras se trituraron y homogenizaron con el molino K-6 Platino (Ascaso Factory, Barcelona, España). La influencia del tamaño de partícula en la técnica de inmunocromatografía de flujo lateral aplicada en este estudio, se evaluó analizando por esta metodología muestras de cebada molidas a dos tamaños de partícula diferentes:

- Tamaño de partícula muy fino: obtenido al aplicar un tiempo de molido de dos minutos.
- Tamaño de partícula medio (utilizado habitualmente): se obtiene al aplicar un tiempo de molido de un minuto.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento de la señal producida por interferencias de la matriz, mayor en el caso de las muestras con un menor tamaño de partícula, por lo que el tiempo de molido con el que se procesaron el conjunto de las muestras a analizar se fijó finalmente en 1 minuto.

Las muestras de cereales molidos se guardaron en congelación a -20 °C hasta el momento de su análisis.

5.2- Análisis de aflatoxinas mediante Inmunocromatografía de Flujo Lateral (IFL).

Las técnicas de inmunocromatografía de flujo lateral, se basan en un inmunoensayo tipo sándwich. Estos se realizan utilizando dos anticuerpos, el de captura y el de detección. El primero se inmoviliza en una superficie (plástico o nitrocelulosa) y el segundo es el que proporciona la señal colorimétrica (unido a látex coloreado u oro coloidal).

Los analitos, por capilaridad, recorren un soporte de nitrocelulosa, pasando por una zona inicial con alto contenido en anticuerpos de detección. Después se desplazan hasta la zona del anticuerpo de captura inmovilizado, donde se puede observar una línea de color en caso positivo. Se adiciona una zona de control posterior, que contiene reactivo capaz de ligar con el exceso de anticuerpo de detección que pasa a través de la zona de ensayo, comprobando que se ha desarrollado apropiadamente con la aparición de color.

La determinación de aflatoxinas en las muestras de cereales se ha llevado a cabo en este trabajo con el Kit VICAM® Afla-V (Waters Corporation, Milford, MA., USA) que incluye junto con las tiras de inmunocromatografía de flujo lateral, el material y reactivos necesarios para hacer la extracción y preparación de las muestras (tubos de extracción, papel Whatman nº4, tubos Eppendorf y buffer Afla-V). Tras su incubación en la placa de incubación de Benchmark (Benchmark Scientific, Edison, New Jersey, USA), la lectura colorimétrica de estas tiras y deteminación de la concentración de aflatoxinas en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ se llevó a cabo mediante el equipo denominado “Lector de Flujo Lateral Vertu” del fabricante VICAM (Waters Corporation, Milford, MA., USA) (*Figura 4*)

En este método se utilizan anticuerpos monoclonales anti-aflatoxinas, pudiendo detectar y medir la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ a distintos niveles en un rango desde 2 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. El método de análisis completo comprende una extracción de la muestra con disolventes para posteriormente someter el extracto filtrado y diluido al análisis por inmunocromatografía de flujo lateral.

Para ello se pesaron en balanza analítica 5 g de la muestra triturada y descongelada usando como recipiente el tubo de extracción de 50 mL proporcionado por el kit, en el cual se añadieron 25 mL de metanol al 70 %.



Figura 4. Placa de incubación Benchmark (izquierda) y equipo de lectura VERTU (derecha).

Posteriormente se mezcló en un agitador a máxima velocidad durante 2 minutos y se filtró el contenido del tubo de extracción con papel Whatman nº4. A continuación se homogeneizaron 100 μ L del extracto filtrado con 100 μ L del buffer Afla-V en un tubo Eppendorf, agitando en el rotatubos MS2 Minishaker IKA (Staufen, Alemania) durante 1 minuto. Después se transfirieron 100 μ L de la solución obtenida a la tira reactiva, a un ritmo de una o dos gotas por segundo. El soporte con la tira y la muestra se dejó reposar en la placa de incubación Benchmark a 25 °C durante 5 minutos y se introdujo la tira en el equipo Vertu® para realizar la lectura. Las etapas que comprende el método de análisis se resumen en la *Figura 5*.

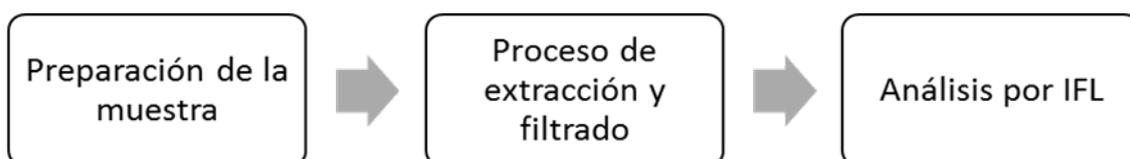


Figura 5. Esquema del método de Inmunocromatografía de flujo lateral (IFL) recomendado por el fabricante.

Con el análisis de las muestras de cereales por esta técnica, se obtuvo un elevado número de resultados positivos. Ante la sospecha de un posible efecto matriz, se decidió introducir una modificación en el método descrito por el fabricante, adicionando una etapa de purificación con columna de inmovinofinidad además de una posterior confirmación por un método instrumental.

Modificación del método IFL.

Con esta modificación se quiso comprobar si la presencia de interferencias de la matriz incrementaba la señal analítica dando lugar a falsos positivos. Para ello, se introdujo un cambio en la metodología anteriormente descrita, consistente en la adición de una etapa de purificación previa a la adición de la muestra extraída en las tiras reactivas (*Figura 6*).

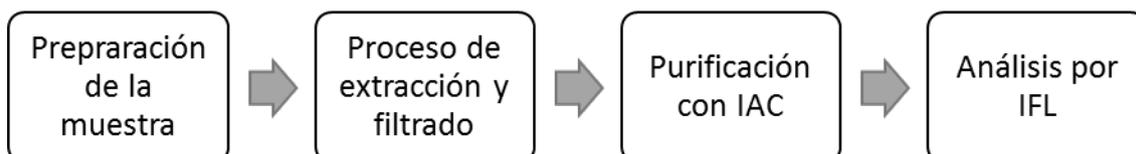


Figura 6. Esquema del método de Inmunocromatografía de Flujo Lateral (IFL) modificado.

Para la purificación se utilizaron unas columnas de inmunoafinidad (IAC) AflaTest WBV-SR (Vicam, Milford, Massachusetts, EEUU), las cuales hubo que someter a un proceso de acondicionamiento. Para ello la solución tampón con la que se comercializa la columna se hizo discurrir por la misma a un ritmo de dos gotas por segundo, gracias a la presión positiva ejercida con la ayuda de una jeringa,.

Para este ensayo se comenzó pesando en la balanza analítica 5 g de cereal en un tubo de extracción, y 0,5 g de cloruro de sodio (NaCl, Panreac Química, Barcelona, España). Después se añadieron 20 mL de metanol al 80 % y se agitó la mezcla en un agitador durante un minuto. Posteriormente se filtró el extracto con la ayuda de un embudo de cristal y papel Whatman nº4. Seguidamente se recogieron 4 mL del filtrado y se adicionaron 16 mL de tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) preparado previamente. Esta disolución se realizó añadiendo un sobre del preparado comercial PBS en 1 L de agua desionizada, homogeneizando y rotulando el envase con fecha de preparación (su estabilidad en refrigeración es de máximo un mes).

Tras el acondicionamiento de la columna, se adicionaron los 20 mL de la mezcla del extracto y el PBS que se hicieron fluir por la columna a una velocidad de flujo de una gota por segundo, y forzando el paso de aire con jeringa tras el paso del extracto para secarla. Después se hizo un lavado de la columna con 10 mL de agua desionizada para

eliminar las posibles interferencias procedentes de la matriz, secándola posteriormente forzando de nuevo el paso de aire.

Finalmente, los analitos retenidos en la columna se eluyeron con 1 mL de metanol y se recogió el eluato en un vial de vidrio ámbar. Se tomaron 10 μ L de eluato en un tubo Eppendorf al cual se adicionaron 100 μ L de buffer Afla-V. La totalidad del contenido, homogeneizado en rotatubos, se recogió con una micropipeta y se depositó en la tira reactiva procediendo a la incubación y lectura según se describe en el método IFL que se ha descrito en el punto anterior.

5.3- Análisis de aflatoxinas mediante método instrumental HPLC.

El método utilizado es una adaptación de la norma UNE-EN-ISO 16050:2011 “Determinación de aflatoxina B₁ y contenido total de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución”. El protocolo desarrollado se presenta de forma esquemática en la *Figura 7*.

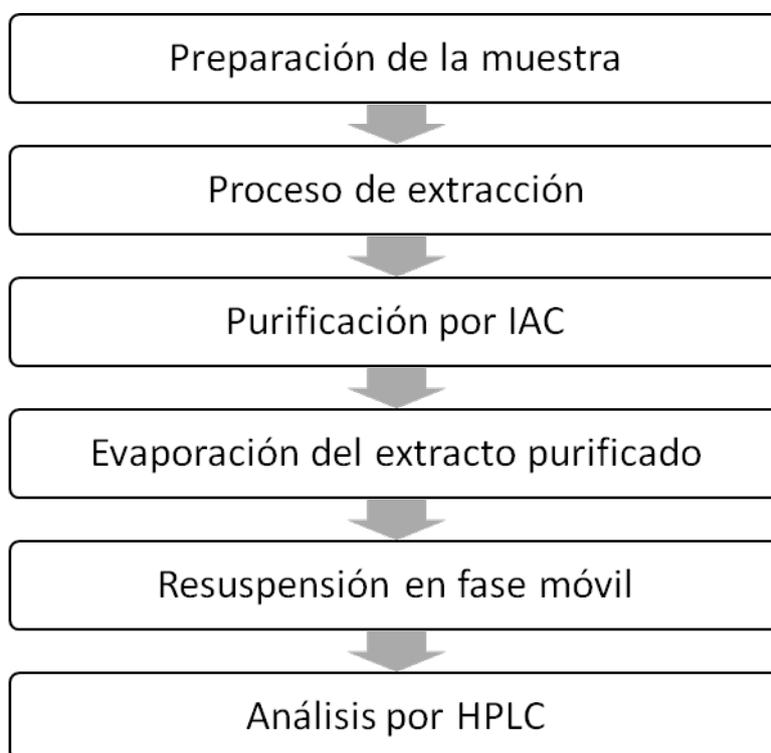


Figura 7. Esquema del método instrumental de confirmación (HPLC).

Preparación de patrones para cuantificación por HPLC.

Para la preparación de patrones, realizados cada día de análisis de muestras, se partió de un patrón mix comercial de aflatoxinas en metanol (pureza 99,5 %) con concentraciones de 1000 µg/mL de aflatoxinas B₁ y G₁, y de 300 µg/mL de aflatoxinas B₂ y G₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

En un vial ámbar debidamente rotulado, se preparó con metanol una disolución intermedia (A) con una concentración de 100 µg/mL de aflatoxinas B₁ y G₁, y de 30 µg/mL de aflatoxinas B₂ y G₂, la cual se homogeneizó en rotatubos durante 1 min.

Para la realización de nuestros patrones, fue preciso obtener otra solución intermedia aún más diluida, por lo que se preparó de nuevo en metanol otra disolución (B) en un vial ámbar rotulado. Esta última disolución tenía una concentración de 10 µg/mL de aflatoxinas B₁ y G₁, y de 3 µg/mL de aflatoxinas B₂ y G₂.

Finalmente, se prepararon las soluciones patrón con las cuales se elaboró la recta de calibrado disolviendo la solución B en fase móvil, la cual consistía en una mezcla de agua desionizada, metanol y acetonitrilo en proporción 4:1:5. Se obtuvieron 5 patrones de concentraciones: 0,25; 0,50; 1; 2,5 y 5 µg/mL para aflatoxinas B₁ y G₁, y de 0,075; 0,15; 0,3; 0,75 y 1,5 µg/mL de aflatoxinas B₂ y G₂, respectivamente.

Método de análisis

Para la realización del análisis de las muestras por HPLC, se comenzó pesando en la balanza analítica 5 g de cereal y 0,5 g de cloruro de sodio.

Tras el pesado de las muestras se procedió a realizar un proceso de extracción y purificación por columna de inmunoafinidad, procediendo del mismo modo descrito en el punto anterior: *Modificación del método IFL*.

Finalmente, se eluyeron los analitos (aflatoxinas) retenidos en la columna con 1 mL de metanol, recogiendo el eluato en un vial de vidrio ámbar. Este eluato se llevó a sequedad con un concentrador de muestras con placa calefactora para evaporación (Biocote, Coventry, Reino Unido), por corriente de gas nitrógeno N₂ C55 (Carbueros

Metálicos, Zaragoza, España) a una temperatura de 50 °C. Una vez obtenido el residuo seco, se resuspendió con 500 µL de fase móvil previamente preparada (solución de metanol, acetonitrilo y agua desionizada en proporción 4:1:5). Posteriormente se inyectaron 100 µL del eluato reconstituido con una microjeringa de vidrio de 250 µL SGE para HPLC (Symta, Madrid, España), en el equipo de cromatografía líquida HPLC Agilent HP 1100 series (Agilent Technologies Minneapolis, MN; EEUU). El inyector del equipo utilizado era manual, con un módulo de bomba de sistema binario para la fase móvil.

El equipo de cromatografía consta de una columna cromatográfica de fase reversa octadecil RP C18 de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, ACE 5 C18 (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Escocia) y una precolumna de fase reversa RP18 pK5 (Symta, Madrid, España) acopladas a un detector de fluorescencia (FLD) y detector de derivatización fotoquímica PHRED (LCTech UVE, Dorfen, Alemania).

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- Velocidad de flujo: 1 mL/min.
- Loop: 100 µL
- λ_{ex} : 365 nm.
- λ_{em} : 435 nm para la detección de B₁, B₂ / 460 nm para G₁, G₂. (Se tomó una longitud de onda intermedia (455 nm), en la cual se pueden detectar y cuantificar las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂).
- Tiempo de análisis: 20 minutos con un postrun de 2 minutos.
- T^a columna: 25 °C.

Los datos obtenidos se analizaron con la unidad de control del equipo y tratamiento de datos, con el software Chemstation 3D (Agilent Technologies Minneapolis, MN; EEUU). Cada día de análisis y previo a la inyección de las muestras, se analizaron los patrones y se midieron las áreas de los picos coincidentes con los tiempos de retención establecidos para cada una de las aflatoxinas, relacionándolas con las concentraciones de los patrones preparados (método de patrón externo).

Durante el estudio, todas las rectas de calibración obtenidas dieron como resultado valores de R^2 superiores a 0,99 (Figura 8).

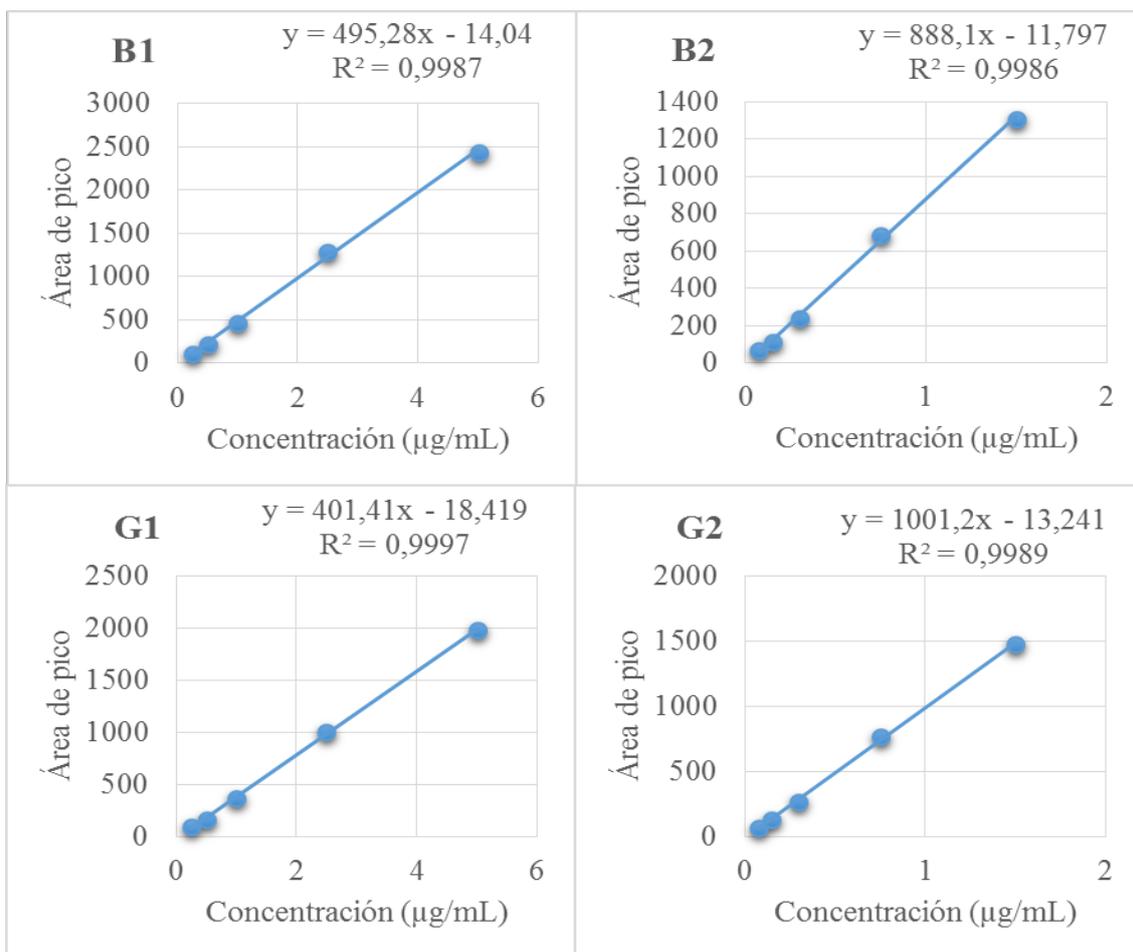


Figura 8. Ejemplo de las rectas patrón obtenidas en la realización de uno de los análisis de detección de aflatoxinas por la técnica HPLC.

6- Resultados y discusión.

6.1- Resultados

a) Análisis del contenido de humedad de las muestras de cereales.

Para poder establecer una relación causal entre los valores elevados de humedad del grano y el aumento en las tasas de contaminación de cereales por aflatoxinas, se realizó una valoración previa de la humedad de las muestras a analizar. Los resultados hallados se muestran en las *Tablas 3 y 4*. Como puede observarse, para las muestras de maíz se obtuvieron valores de humedad muy diversos por lo que fue necesario realizar un proceso de secado de las mismas hasta obtener valores de humedad inferiores al 15%, (descrito en el punto “5.1- Preparación de las muestras” de la memoria). Es importante tener en cuenta la importancia que tiene homogenizar el contenido de humedad del grano por la influencia que tiene este parámetro en la valoración de la contaminación de las muestras, que se expresa por unidad de masa.

Tabla 3. Contenido en humedad de muestras de maíz obtenido mediante el método NIR, expresado en % de humedad del grano.

N° Muestra	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Humedad grano (%)	25,0	25,0	16,0	37,0	36,8	36,0	23,0	16,9	38,0	38,1	42,0	25,6
N° Muestra	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
Humedad grano (%)	26,1	21,9	28,4	27,6	31,0	29,9	15,7	23,0	31,0	32,2	26,1	28,4

En el caso de la cebada (*Tabla 4*), la humedad del grano fue similar en todas las muestras, ya que se cosechan a una humedad inferior y no necesitan llevarse a secadero como en el caso de maíz.

Tabla 4. Contenido en humedad de muestras de cebada obtenido mediante el método NIR, expresado en % de humedad del grano.

N° Muestra	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Humedad grano (%)	11,9	12,0	12,3	12,3	12,3	12,2	12,2	12,4	12,2

b) Análisis de aflatoxinas en muestras de cereales por el método IFL.

Muestras de maíz.

Para la evaluación de la contaminación por aflatoxinas en maíz, se analizaron un total de 24 muestras de este cereal. De este análisis se obtuvo la concentración de la suma de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂), también llamado aflatoxinas totales, presentes en las muestras (*Tabla 5*).

Tabla 5. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de maíz por el método de cribado, expresados en microgramos de aflatoxinas totales (B₁+B₂+G₁+G₂) por kilogramo de muestra. Límite de cuantificación (LC): 2 µg/kg.

Nº de muestra	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
µg/kg de aflatoxinas totales	4,58	5,73	4,18	4,68	3,17	5,09	5,36	5,32
Nº de muestra	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16
µg/kg de aflatoxinas totales	5,25	5,77	3,22	3,68	3,31	3,48	<LC	4,07
Nº de muestra	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
µg/kg de aflatoxinas totales	<LC	2,8	4,1	3,07	2,88	3,42	<LC	2,07

Para una mejor comprensión de los resultados, hay que recordar que las técnicas de inmunocromatografía de flujo lateral sólo permiten cuantificar el contenido de aflatoxinas totales (suma de B₁, B₂, G₁ y G₂). Debido a que la legislación contempla un contenido máximo de aflatoxina B₁ de 5 µg/kg y ante la imposibilidad de saber si la concentración obtenida en las muestras refleja la presencia de esta aflatoxina en exclusiva o de la suma de las cuatro, tomamos como condicionante de positividad el límite máximo de B₁ en maíz.

Como se observa en la *tabla 5*, ninguna muestra superó el nivel máximo permitido para la suma de aflatoxinas en maíz (B₁, B₂, G₁ y G₂) establecido en 10 µg/kg por el Reglamento (CE) nº 1881/2006.

Sin embargo, un 25 % de las muestras (6 de las 24) presentaron un valor superior a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por lo que se seleccionaron para una posterior confirmación, así como aquellas con un nivel de contaminación por encima de 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Muestras de cebada.

Para realizar la evaluación de la contaminación por aflatoxinas en cebada, se analizaron 9 muestras de este cereal (*Tabla 6*).

Tabla 6. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de cebada por el método de cribado, expresados en microgramos de aflatoxinas totales ($B_1+B_2+G_1+G_2$) por kilogramo de muestra. Límite de cuantificación (LC): 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Nº de muestra	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
$\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas totales	7,61	7,88	5,27	5,85	6,34	6,71	7,4	4,67	6,45

Los resultados obtenidos mostraron en todas las muestras una concentración de aflatoxinas totales superior al máximo establecido para la cebada (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas totales) en el Reglamento (CE) nº 1881/2006.

Como se ha comentado anteriormente, el alto porcentaje de positividad de las muestras de cereales nos llevó a investigar las posibles causas de este resultado. Para ello se introdujo una etapa de purificación mediante columna de inmunoafinidad en el método IFL y se realizó una confirmación analítica por cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados obtenidos en cada caso se muestran a continuación.

Análisis de aflatoxinas en muestras de cereales por el método IFL con etapa de purificación.

El análisis de aflatoxinas por el método IFL adicionando una etapa de purificación se aplicó a 5 muestras de cebada.

Como se puede observar en la *Tabla 8*, la adición de la etapa de purificación reduce los resultados drásticamente, confirmando un efecto matriz. Basándonos en los resultados obtenidos en esta prueba, adicionando una columna de inmunoafinidad, sólo una de las muestras de cebada (la C8) tendría una concentración superior al límite de

cuantificación del método. Además, al ser una muestra de cebada, estaría por encima de la concentración máxima de aflatoxina B₁, establecida por el Reglamento (CE) n° 1881/2006.

Tabla 8. Comparativa de los resultados obtenidos por el método IFL facilitado por el fabricante (Sin IAC) y el método IFL modificado (Con IAC) en muestras de cebada. Límite de cuantificación (LC): 2 µg/kg.

Nº Muestra		C2	C3	C5	C8	C9
Sin IAC	µg/kg de aflatoxinas	7,88	5,27	6,34	4,67	6,45
Con IAC	totales	<LC	<LC	<LC	2,01	<LC

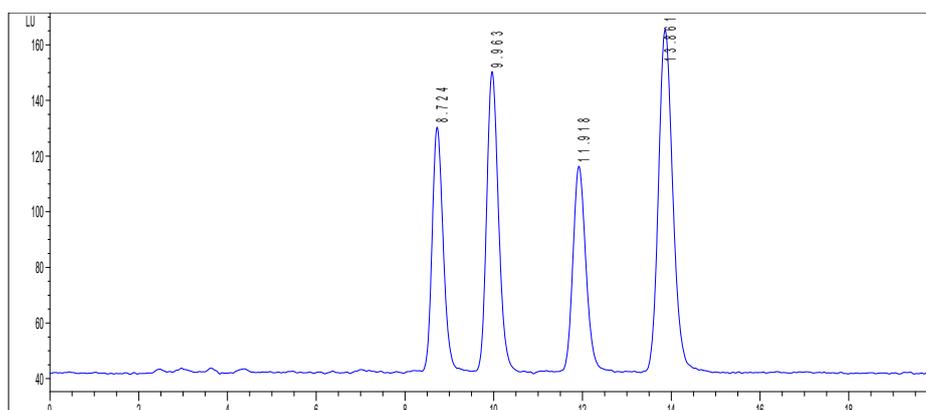
6.2- Análisis de aflatoxinas en muestras de cereales mediante HPLC con detector de fluorescencia.

Muestras de maíz

Tras el análisis por el método de cribado se realizó una confirmación de las muestras de maíz que presentaron concentraciones de aflatoxinas superiores a 4,5 µg/kg. Gracias a este análisis, pudimos comprobar que ninguna de las muestras de maíz analizadas por HPLC-PHRED-FLD obtuvo una concentración superior al límite de cuantificación de la técnica para ninguna de las aflatoxinas (0,083µg/kg).

A modo de ejemplo, en las *Figura 9* y *10* se representan, en primer lugar, el cromatograma obtenido en el análisis de un patrón de calibración de aflatoxinas donde

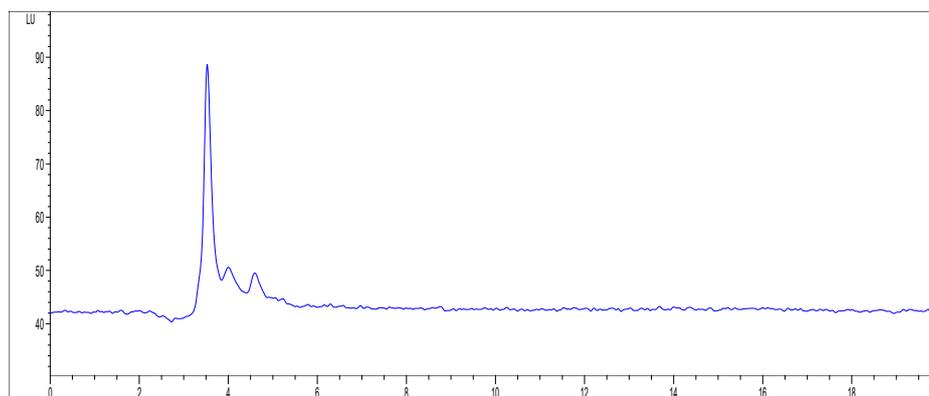
Figura 9. Cromatograma del patrón de calibración de aflatoxinas de 2,5 µg/mL para aflatoxinas B₁ y G₁, y de 0,75 µg/mL de aflatoxinas B₂ y G₂.



pueden verse los tiempos de retención de los analitos de interés: 8,7 minutos (AF G₂), 9,9 minutos (AF G₁), 11,9 minutos (AF B₂) y 13,8 minutos (AF B₁).

En segundo lugar (Figura 10), el cromatograma obtenido de la muestra de maíz M1, similar al resto de cromatogramas obtenidos en el resto de las muestras. En ella no se registra ningún pico cromatográfico en los tiempos de retención correspondientes con las aflatoxinas analizadas con en esta técnica.

Figura 10. Cromatograma correspondiente a la muestra de maíz M1.



Muestras de cebada

Tras el análisis por el método de cribado (IFL) y por el método IFL con la adición de la etapa de purificación, se realizó una confirmación por el método instrumental. A pesar de que en el método IFL con purificación los resultados obtenidos fueron inferiores al límite de cuantificación de la técnica, se quiso confirmar que realmente los resultados obtenidos eran exclusivamente producidos por un efecto matriz. Por ello se seleccionaron las tres muestras con mayor concentración según el método de cribado (C1, C2 y C8). Ninguna de ellas sobrepasaba el límite de cuantificación del método instrumental HPLC, establecido en 0,083µg/kg.

6.3- Discusión de los resultados.

Relación entre la humedad y la tasa de contaminación por aflatoxinas.

Según la bibliografía consultada (EFSA, 2012) es bien sabido que existe una relación entre niveles altos de contaminación por aflatoxinas y una elevada humedad de grano (por encima del 15 %). La razón de esta relación es que los mohos del género *Aspergillus*, productores de aflatoxinas, necesitan una actividad de agua superior a 0,80,

lo que equivale a una humedad del sustrato del 13-14 %, desarrollándose mejor cuanto mayor es la humedad del sustrato y del ambiente (Gimeno, 2002).

Dado que en nuestros resultados ninguna de las muestras de cereal sobrepasa el límite de cuantificación de la técnica, no se puede establecer una correlación con la humedad de grano determinada.

Evaluación de la tasa de contaminación por aflatoxinas.

Teniendo en consideración los resultados obtenidos por el método IFL, se detectaron un elevado número de muestras de cereales que superaron los contenidos máximos establecidos para el maíz y la cebada en el Reglamento (CE) nº 1881/2006. En concreto, el 25 % de las muestras de maíz y un 100 % en las muestras de cebada analizadas (45 % del total de muestras analizadas).

Tras los resultados obtenidos en la adición de la etapa de purificación por columna de inmunoafinidad se observó que la totalidad de las muestras analizadas obtuvieron como resultado una concentración inferior al resultado obtenido por la técnica IFL. Por ello se llegó a la conclusión de que el método IFL por sí sólo tiene un marcado efecto matriz y puede sobreestimar el contenido de aflatoxinas en las muestras, dando lugar a falsos positivos.

Además, ninguna de las muestras analizadas por el método instrumental de confirmación obtuvo concentraciones por encima del límite de cuantificación en ninguna de las aflatoxinas analizadas. Los resultados obtenidos por HPLC confirmaron de nuevo la sobreestimación de la concentración de aflatoxinas por el método IFL y se demostró que el método inmunológico es menos selectivo para las aflatoxinas que el método de confirmación instrumental.

Teniendo en cuenta los resultados finales, podemos decir que el nivel de contaminación de nuestras muestras fue bajo (ningún resultado superior a 0,083 µg/kg) e inferior a los hallados en otros trabajos. Por ejemplo, está por debajo de los resultados que se recogen en el informe de la EFSA del 2013. En él se determinó que un 10 % de las muestras que se habían analizado en diversos estudios contenían aflatoxinas en un rango entre 0,45 y

2,60 µg/kg. En nuestro caso, en ninguna de las 33 muestras analizadas se obtuvo una señal cuantificable.

En otro estudio realizado por Cavaliere *et al.* en 2007, en el que analizaron muestras de maíz procedente de Italia por técnicas instrumentales, estos autores determinaron que el 31 % de las mismas contenían aflatoxinas por encima de 0'1 µg/kg. Además, el 10 % sobrepasaban los contenidos máximos establecidos para la UE (5 µg/kg para el maíz). En este trabajo se analizaron un total de 48 muestras de maíz, un número de muestras algo más elevado que en el presente estudio.

Tabuc *et al* (2011), también realizaron en Rumanía una evaluación de la contaminación por aflatoxinas por técnicas instrumentales en 2009, incluyendo 21 muestras de maíz y 11 de cebada entre otras muestras de cereales. En este estudio, un 38 % de las muestras de maíz presentaron contaminación por aflatoxina B₁ (con una media de 3,2 µg/kg) y un 4,76 % de las muestras superaron el límite máximo permitido por la UE (5 µg/kg para el maíz y 2 µg/kg para la cebada), obteniendo una concentración máxima en una de las muestras de 42,6 µg/kg. A pesar de que el tamaño de muestra es muy similar al de nuestro trabajo, los resultados obtenidos por Tabuc *et al* muestran tasas de contaminación mucho más elevadas.

Jakić-Dimić *et al* (2009), en otro trabajo realizado en Serbia, analizaron 968 muestras de cereal por técnicas inmunológicas (ELISA). De ellas, 443 muestras eran de maíz en las que detectaron que el 18,3 % contenían niveles de aflatoxinas por encima del límite de detección de la técnica (1,75 µg/kg), pero todas ellas por debajo de los 5 µg/kg. Además, analizaron 27 muestras de cebada en las que no detectaron contaminación por aflatoxinas por encima de sus límites de detección. El tamaño de muestra en el trabajo de Jakić-Dimić *et al* es muy superior al nuestro y, aunque las muestras no superaban los límites establecidos por la UE según el método ELISA, no hubo confirmación por métodos instrumentales.

Si comparamos los resultados obtenidos en estos estudios con otros realizados fuera de la Unión Europea, vemos como por lo general, en estos países las tasas de contaminación de cereales son muy superiores a los hallados habitualmente en nuestras latitudes (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados obtenidos por otros autores de diferentes países fuera de la UE tras el análisis de cereales y el rango de concentración de las muestras positivas.

Autor	Muestras positivas (%)	Rango (µg/kg)	País	Cereales
Abia <i>et al.</i> , 2013	30	47-52	Camerún	Maíz
Li <i>et al.</i> , 2014	4,8	1-32	China	Maíz, avena, arroz
Oueslati <i>et al.</i> , 2012	80	5-52	Túnez	Avena, cebada

Las diferencias observadas entre los resultados hallados en nuestro trabajo y los descritos en la bibliografía consultada podrían ser consecuencia de diferentes variables, siendo una de las más importantes que nuestro tamaño de muestra era inferior a otros estudios realizados por otros autores. Otra variable destacable es que la procedencia del cereal difiere en los estudios, dándose diferentes climatologías que influyen entre otras cosas en la humedad del grano y en la temperatura del cultivo, factores que son a su vez condicionantes de la posibilidad de crecimiento de los mohos micotoxigénicos y su capacidad de síntesis de aflatoxinas. Además, esta diferencia entre países es más marcada si tenemos en cuenta los estudios de los países de fuera de la UE en los que las medidas de prevención y control de la contaminación por micotoxinas son más limitadas. Por ello la contaminación por mohos toxigénicos es más probable durante el cultivo y la falta de control de la humedad en el almacenamiento puede favorecer el desarrollo de los mohos y la síntesis de toxinas.

7- Conclusiones.

Primera

Tras el análisis de las muestras de cereales mediante diferentes metodologías: Inmuno cromatografía de flujo lateral (IFL), IFL con la adición de una etapa de purificación con columna de inmutioafinidad (IAC); cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia y fotoquímico (HPLC-PHRED-FLD), se comprobó que existe un importante efecto matriz en la determinación de aflatoxinas en cebada y maíz mediante el método de cribado de IFL, que resultó ser poco selectivo. De este modo, la evaluación de la contaminación de las muestras de maíz y cebada de manera sensible y precisa, solo fue posible mediante la metodología de análisis instrumental basada en la Norma UNE-EN 16050:2011.

Segunda

En ninguna de las muestras analizadas se confirmó la presencia de aflatoxinas en cantidades por encima del límite de cuantificación del método, y por lo tanto no superaron el contenido máximo establecido en la legislación tanto para aflatoxina B₁ (5 µg/kg en el caso del maíz y 2 µg/kg para la cebada) como para la suma de aflatoxinas totales, B₁, B₂, G₁ y G₂ (10 µg/kg para maíz y 4 µg/kg para cebada). Los niveles de contaminación tan bajos confirman la escasa susceptibilidad del maíz y la cebada a dichas micotoxinas en nuestras latitudes.

Tercera

A pesar de la relación existente entre la presencia de niveles altos de contaminación por aflatoxinas y una elevada humedad del grano de maíz (por encima del 15 %), el bajo nivel de contaminación de las muestras analizadas, en todos los casos por debajo del límite de cuantificación del método, no permitió establecer una correlación con la humedad en las muestras analizadas.

8- Conclusions.

First

After the analysis of the cereal samples by different methodologies: lateral flow immunochromatography (LFI), LFI with the addition of a purification stage with immunoaffinity column (IAC); high-performance liquid chromatography with fluorescence and photochemical detector (HPLC-PHRED-FLD), it was found that there is an important matrix effect in the determination of aflatoxins in barley and maize by the LFI screening method that turned out to be not very selective. In this way, the evaluation of the contamination of maize and barley samples in a sensitive and precise manner was only possible through the instrumental analysis methodology based on the UNE-EN 16050: 2011 standard.

Second

In none of the analyzed samples was the presence of aflatoxins in quantities above the method's quantification limit, and therefore did not exceed the maximum content established in the legislation for both aflatoxin B₁ (5 µg/kg in the case of corn and 2 µg/kg for barley) as for the sum of total aflatoxins, B₁, B₂, G₁ and G₂ (10 µg/kg for corn and 4 µg/kg for barley). The such low contamination levels confirm the low susceptibility of corn and barley to mycotoxins in our latitudes.

Third

Despite the relationship between the presence of high levels of contamination by aflatoxins and a high humidity of the corn grain (above 15 %), the low level of contamination of the analyzed samples, in all cases below the limit of quantification of the method, did not allow to establish a correlation with the humidity in the samples analyzed.

9- Aportaciones en materia de aprendizaje: Identificación de las aportaciones que, en materia de aprendizaje, han supuesto esta asignatura

La realización de este trabajo ha supuesto la mejora de diversas habilidades, como la búsqueda de información bibliográfica en diversos formatos: libros, artículos, páginas web como ELIKA, RASFF, etc. También me ha ayudado al desarrollo de un sistema de referencias bibliográficas adecuado, al desarrollo de capacidades transversales (organización del trabajo de laboratorio y resolución de problemas e imprevistos surgidos durante la realización del mismo), y ha supuesto una mejora de los conocimientos de lengua extranjera (uso del inglés).

Además, han mejorado mis conocimientos sobre micotoxinas, mis conocimientos de las técnicas instrumentales usadas para su determinación y mi visión sobre la realización de un trabajo de investigación.

10- Bibliografía

- Abia, W. A., Warth, B., Sulyok, M., Krska, R., Tchana, A. N., Njobeh, P. B., Moundipa, P. F. (2013). Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control*, 31 (2), 438–453
- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, ACSA (2011). Mapa de peligros alimentarios: Aflatoxinas.
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, AECOSAN (2015). Monográfico aflatoxinas (AECOSAN).
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, AESAN (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos.
- Asociación Española de Normalización y Certificación, (2011). Norma UNE-EN-ISO 16050: 2011. Productos Alimenticios. Determinación de aflatoxina B1 y contenido total de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución.
- Caballero, A.M. (2013). Los pedroches: detectados niveles altos de aflatoxinas. *Diario de Córdoba*, 12 de Junio de 2013.
- Cameán, A.M., Repetto, M. (2006). *Toxicología Alimentaria*. Editorial Diaz de Santos, Madrid (España).
- Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Nazzari, M., Samperi, R., & Laganà, A. (2007). A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 21 (4), 550-556.
- Comisión Europea (2006). Reglamento (CE) no 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- Comisión Europea (2011). Reglamento (UE) nº 16/2011 de la comisión, de 10 de enero de 2011, por el que se establecen las medidas de ejecución del Sistema de Alerta Rápida para Productos Alimenticios y los Alimentos para Animales.

- European Food Safety Authority, EFSA, (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. The EFSA Journal (2007), 446, 1-127.
- European Food Safety Authority, EFSA, (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change.
- European Food Safety Authority (EFSA, 2013). Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products. Supporting Publications, 2013.
- Fernández, A. (2014). El cambio climático y la prevalencia de micotoxinas.
- Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria, ELIKA (2005). Aflatoxinas M1 en leche.
- Gimeno, A. (2002). Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas (2-5).
- International Agency for Research on Cancer, IARC (2012) IARC Monograph: Aflatoxins. Volumen 100F-23.
- Jakić-Dimić, D., Nešić, K., & Petrović, M. (2009). Contamination of cereals with aflatoxins, metabolites of fungi *Aspergillus flavus*. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5-6-2), 1203-1208.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. y Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*. 86. pp: 1595-1612.
- Li, R., Wang, X., Zhou, T., Yang, D., Wang, Q., & Zhou, Y. (2014). Occurrence of four mycotoxins in cereal and oil products in Yangtze Delta region of China and their food safety risks. *Food Control*, 35(1), 117–122
- Lindner, E., (1995). *Toxicología de los Alimentos.*, 2a. ed. Acribia S.A., Zaragoza (España).
- Nielsen, S., (2003). *Análisis de los alimentos.* Acribia S.A., Zaragoza (España).
- Njapau, H., Trujillo S., van Egmond H.P., Park D.L., (2004) *Mycotoxins and phycotoxins. Advances in determination, toxicology and exposure management.* Wageningen Academic Publishers.
- Oueslati, S., Romero-González, R., Lasram, S., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2012). Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products

marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (7), 2376–2381.

- Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF (2015). The Rapid Alert System for Food and Feed 2015 annual report.
- Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF (2016).
- Rubinson, K.A. (2004). *Análisis Instrumental*. Pearson Educación, Madrid (España).
- Shibamoto, T. (1996). *Introducción a la toxicología de los alimentos*. Acribia S.A., Zaragoza (España).
- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (2010). *Aspergillus y aspergilosis*. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com.es/2014/11/morfologia-de-hongos.html> (consultado 16/Nov/2017).
- Sociedad Española de Microbiología (2006). *Curso online de Microbiología*. Disponible en: <https://twitter.com/SEM microbiologia/status/737738438741393408> (consultado 16/Nov/2017).
- Soriano del Castillo, M.J. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Díaz Santos, Barcelona (España).
- Tabuc, C., Taranu, I., & Calin, L. (2011). Survey of mould and mycotoxin contamination of cereals in South-Eastern Romania in 2008–2010. *Archiva Zootechnica*, 14 (4), 25.
- Weidenbörner, M. (2001), *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer.