

**Máster en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes.
Control Alimentario y Ambiental**

Trabajo Fin de Máster:

**“DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EN HUEVO
UTILIZANDO UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN BASADO EN
EL PROCEDIMIENTO QuEChERS Y ANÁLISIS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ULTRA PRESIÓN
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM”**



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Hidrogeología y Química Analítica

María Luz Gómez Pérez

Julio 2011

TRABAJO FIN DE MÁSTER

El presente trabajo ha sido realizado por María Luz Gómez Pérez para la obtención del Título de Máster “Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental”, dentro del Programa de Másteres Universitarios Oficiales.

Fdo. María Luz Gómez Pérez

Tutora: Antonia Garrido Frenich

Fdo. Antonia Garrido Frenich

INDICE

I. PRESENTACIÓN	4
II. MEMORIA CIENTÍFICA	10
1. Objeto y campo de aplicación	10
2. Introducción	11
2.1. Planteamiento del problema	11
2.2. Micotoxinas	12
2.3. Legislación	18
3. Análisis de micotoxinas en huevo	19
3.1. Extracción de micotoxinas en huevo	19
3.2. Determinación de micotoxinas	21
3.2.1. Cromatografía de líquidos	22
3.2.2. Espectrometría de masas	23
III. EXPERIMENTAL	26
4. Reactivos y materiales	26
5. Instrumentación	26
6. Análisis por UHPLC-MS/MS	27
7. Preparación de las muestras	28
8. Procedimiento de validación	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
9. Optimización del método cromatográfico	31
10. Optimización del método de extracción	35
10.1. Evaluación del disolvente de extracción	35
10.2. Evaluación de la adición de sales	36
10.3. Evaluación del tiempo de extracción	37
10.4. Evaluación de la etapa de limpieza	38
11. Validación del método analítico	41
12. Análisis de muestras reales	45
V. CONCLUSIONES	47
VI. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	48
VII. REFERENCIAS	49

PRESENTACIÓN

I. PRESENTACIÓN

El Máster '*Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental*' ha sido realizado durante el curso 2010-2011, consta de 60 créditos ECTS y se estructura en cinco módulos, los tres primeros de contenido fundamentalmente teórico, el cuarto de carácter teórico-práctico y el último de ellos corresponde al desarrollo, redacción y exposición del Trabajo Fin de Máster.

El contenido de los módulos se describe brevemente a continuación:

Módulo I: Plaguicidas

Consta de las siguientes asignaturas:

- Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos, cursada)
- Políticas de Seguridad Alimentaria (3 créditos, convalidada)
- Registro de plaguicidas (3 créditos, cursada)
- Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos, cursada)

En este módulo se ha adquirido una visión general sobre el conjunto de políticas, leyes, normas y decretos que se aplican al control de residuos de plaguicidas y contaminantes en alimentos, tanto en el ámbito internacional como en el nacional y autonómico. Cabe destacar la importancia de conocer y comprender la problemática de los plaguicidas en el medio ambiente, las distintas clases de plaguicidas que existen, la eficacia de la aplicación y su impacto en el medio ambiente.

Por otro lado se han estudiado los objetivos y procedimientos para el registro de plaguicidas dentro del marco normativo y administrativo a nivel nacional y europeo.

PRESENTACIÓN

Finalmente, se han abordado aspectos sobre la preparación, caracterización y evaluación de los diferentes tipos de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas y sus aplicaciones agronómicas.

Módulo II: Contaminantes

Consta de las siguientes materias:

- Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos, cursada)
- Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos, convalidada)
- Contaminación y remediación de suelos (3 créditos, cursada)

En este módulo se han tratado temas relacionados con la calidad y Seguridad Alimentaria, estrategias analíticas para la detección y control del fraude alimentario, así como la trazabilidad alimentaria y su gestión.

Por otra parte, se han adquirido conocimientos en toxicología general y, de una manera más específica, se ha profundizado en la toxicología ambiental y alimentaria.

Además se ha proporcionado una visión general sobre la constitución del suelo, los procesos de contaminación por plaguicidas, fertilizantes y metales pesados así como las principales técnicas de remediación de suelos que se pueden aplicar.

Módulo III: Gestión de Laboratorios

Consta de las siguientes materias:

- Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos, cursada)
- Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos, cursada)
- Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos, cursada)

PRESENTACIÓN

En este módulo se incide sobre el importante papel que juegan en el método analítico tanto la etapa de muestreo como la del tratamiento de muestra. Se han considerado los tipos de muestreo, la incertidumbre asociada, el diseño de un plan de muestreo, así como la legislación relacionada. Se han expuesto los objetivos y tendencias en la etapa de tratamiento de muestra, así como las principales técnicas de pre-concentración en análisis de trazas.

Se ha mostrado la utilidad de las herramientas estadísticas para asegurar la comparación de las medidas, el diseño de experimentos, validación y control de calidad.

Finalmente, también se han abordado aspectos básicos de la gestión de la calidad en los laboratorios de ensayo, así como las actividades necesarias para evaluar y asegurar la calidad en los mismos.

Módulo IV: Experimentación en Técnicas Cromatográficas

Consta de las siguientes materias:

- Espectrometría de masas (3 créditos, cursada)
- Exposición a plaguicidas (3 créditos, cursada)
- Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos, cursada)

En este módulo se han adquirido conocimientos sobre los fundamentos de la técnica de espectrometría de masas y los distintos tipos de fuentes de ionización, analizadores, modos de operación, criterios de identificación y modos de cuantificación aplicados en el desarrollo de métodos de análisis de contaminantes orgánicos.

Además se han tratado aspectos relacionados con la exposición humana y ambiental a plaguicidas, evaluación de la exposición potencial dérmica y respiratoria en lugares de trabajo, identificación de casos, fuentes de exposición y biomarcadores asociados.

PRESENTACIÓN

En cuanto a las técnicas cromatográficas, se han tratado aspectos tanto teóricos como prácticos, relacionados con los fundamentos, funcionamiento y aplicaciones de la cromatografía de líquidos (LC) acoplada a sistemas de detección clásicos, como la fluorescencia, y avanzados, como la espectrometría de masas (MS). Se han optimizado parámetros básicos de la separación cromatográfica, como la composición de fase móvil, el gradiente de inyección y el volumen de inyección, así como los principales parámetros para la detección de los compuestos. También se han adquirido conocimientos teóricos y prácticos relacionados con la cromatografía de gases (GC). En el laboratorio se han llevado a cabo diversos trabajos experimentales centrados en la optimización de métodos multi-residuo, en los que se han optimizado parámetros como la temperatura del sistema de inyección, la influencia del tiempo de purga, la influencia de la temperatura del inyector y la influencia del flujo total. También se han optimizado métodos de MS, incidiendo en aspectos como el modo de ionización y detección o los voltajes de fragmentación. Se han realizado búsquedas en bibliotecas espectrales y distintas operaciones de mantenimiento de un cromatógrafo de gases.

Módulo V – Trabajo Fin de Máster (15 créditos)

El Trabajo Fin de Máster titulado: “Determinación de micotoxinas en huevo utilizando un método de extracción basado en el procedimiento QuEChERS y análisis mediante cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas en tándem” se ha realizado en el Grupo de Investigación “*Química Analítica de Contaminantes*” (FQM-170), perteneciente al Departamento de Hidrogeología y Química Analítica, Universidad de Almería.

PRESENTACIÓN

El trabajo se encuadra en la línea de investigación titulada: *Métodos analíticos para residuos y contaminantes orgánicos en muestras alimentarias, ambientales y biológicas mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas.*

Para poder llevar a cabo este trabajo de investigación han sido fundamentales los conocimientos, tanto previos como adquiridos, referentes a las asignaturas:

- Políticas de Seguridad Alimentaria.
- Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental.
- Tratamiento de datos analíticos.
- Espectrometría de masas.
- Experimentación en técnicas cromatográficas.

En el desarrollo de dicho trabajo he adquirido habilidades y conocimientos para:

- Buscar información bibliográfica y legislación relacionada con la temática del trabajo científico a desarrollar.
- Planificar y llevar a cabo estudios científicos relacionados con la presencia de residuos de micotoxinas en alimentos.
- Desarrollar y validar métodos multi-residuo mediante LC de ultra presión acoplada a MS en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS).
- Aplicar distintas técnicas de tratamiento de muestra y optimizar el método de extracción finalmente seleccionado.
- Evaluar los resultados obtenidos tras la etapa de análisis mediante UHPLC y obtener conclusiones sobre la eficacia del método.

PRESENTACIÓN

- Llevar a cabo un tratamiento de datos, tanto en la etapa de validación del método como en la posterior aplicación del mismo a muestras reales, donde ha sido necesario procesar, evaluar, sintetizar y obtener conclusiones de la información obtenida.

En definitiva, los conocimientos adquiridos me proporcionan la aptitud necesaria para poder planificar, documentar, desarrollar, validar y aplicar de forma autónoma métodos analíticos para el análisis de residuos y contaminantes en muestras alimentarias.

Finalmente, cabe destacar que el cursar todas estas asignaturas en el Máster, así como el desarrollo del Trabajo Fin Máster, me han permitido adquirir una serie de competencias tan importantes como son la capacidad de planificación y organización basadas en criterios de calidad y eficacia. Dichas competencias son fundamentales tanto para la realización de la Tesis Doctoral como para mi desarrollo profesional posterior.

*MEMORIA CIENTIFICA***II. MEMORIA CIENTÍFICA****1. Objeto y campo de aplicación**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de hongos. La presencia de estos contaminantes en alimentos de origen animal es consecuencia de la administración de piensos contaminados al ganado, con lo cual, dichos contaminantes pasan a la cadena alimentaria, pudiendo aparecer en tejidos animales y productos derivados. Las condiciones de producción, almacenamiento, transporte, distribución, venta y consumo de los alimentos, desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y proliferación de estos hongos y, por tanto, en la producción de micotoxinas. Estos compuestos son tóxicos y presentan un riesgo para la salud, por lo que es fundamental disponer de métodos analíticos que ayuden a asegurar la calidad y seguridad de los alimentos.

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un método rápido multi-micotoxina que permita la determinación simultánea de diferentes familias de micotoxinas en huevo mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.

Para tal fin se ha procedido a:

1. Desarrollar un método instrumental para la determinación simultánea de diferentes clases de micotoxinas mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
2. Buscar y optimizar el método de extracción que permita la determinación de micotoxinas en muestras de huevo.
3. Validar el método analítico seleccionado y optimizado.
4. Aplicar el método al análisis de muestras reales.

*MEMORIA CIENTIFICA***2. Introducción****2.1. Planteamiento del problema**

Hoy en día, el huevo y sus derivados son alimentos esenciales en la dieta humana debido a sus múltiples propiedades, entre ellas su contenido en proteínas de alto valor biológico. Además, es una materia prima ampliamente utilizada en platos precocinados, pastas, repostería, etc. Esto lo convierte en un alimento altamente consumido en la Unión Europea (UE). Sin embargo, este consumo no está exento del riesgo que implica la presencia de sustancias no saludables, como son las micotoxinas. Por todo ello, la contaminación del huevo y de sus productos derivados es una causa de preocupación en el campo de la Seguridad Alimentaria.

Las micotoxinas son producidas por diversos hongos. Éstas pueden aparecer en forraje, grano o piensos, destinados a la alimentación del ganado. Las condiciones de producción, almacenamiento, transporte y distribución desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y proliferación de los hongos productores de micotoxinas. Es por esto que, al alimentar al animal con piensos contaminados, las micotoxinas o sus metabolitos pasan a la cadena alimentaria, pudiéndose encontrar estos residuos en diversos alimentos de origen animal como carne, leche, huevos, etc. Entre todos los tipos de micotoxinas que pueden aparecer en huevo, las aflatoxinas son el grupo más relevante debido al riesgo que representan para la salud pública, pues son consideradas como carcinógenos de clase I según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC). La ocratoxina A y la citrinina pueden coexistir en productos almacenados y cereales, por lo que pueden pasar a formar parte de los piensos y, en consecuencia, pueden encontrarse en productos de origen animal, como el huevo. Otras micotoxinas como la beauvericina y el grupo de las enniatinas están presentes de manera frecuente

MEMORIA CIENTIFICA

en granos almacenados y, debido a que son contaminantes lipofílicos, pueden bioacumularse en la yema de huevo.

En consecuencia, la presencia de micotoxinas en este tipo de muestras de consumo habitual constituye un serio problema para la salud debido a su elevada toxicidad y a sus efectos nocivos y/o cancerígenos.

A fin de asegurar la salud de los consumidores y la inocuidad de los alimentos, la UE ha establecido límites máximos de residuos (LMRs) para estos contaminantes en piensos, pero no existe legislación específica para el huevo. Por tanto, es importante establecer medidas de control para asegurar la salud pública, de manera que el análisis de estos contaminantes debe llevarse a cabo mediante el uso de metodologías analíticas que garanticen resultados fiables.

2.2. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen natural producidos por diversas especies de hongos filamentosos [1]. Los principales hongos responsables de la producción de estos contaminantes son los de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* [2,3], *Stachybotris* y *Cephalosporium* [1]. Actualmente, más de 400 micotoxinas han sido identificadas en el mundo [4] y, la mayoría de ellas, pueden incluirse dentro de los tres primeros géneros [5,6]. Todo tipo de productos agrícolas (semillas, cereales, especias, frutos secos, granos, frutas...) pueden verse afectados por el crecimiento de hongos y la aparición de micotoxinas, lo cual supone un riesgo para la salud, tanto humana como animal [1,7,8]. Los hongos forman estos metabolitos secundarios bajo condiciones de estrés o condiciones que son adecuadas para su desarrollo, favoreciendo así su presencia en alimentos [7]. Los principales factores que influyen en la proliferación de mohos son la humedad, la temperatura y las plagas [9]. Para un contenido en humedad dado, diferentes cereales presentan actividades acuosas diversas y, por consiguiente, favorecen la proliferación de distintos tipos de mohos con diversas tasas de crecimiento [10]. También

MEMORIA CIENTIFICA

pueden proliferar en un amplio rango de temperaturas y, por lo general, su tasa de crecimiento será menor cuanto menor sea la temperatura. Los insectos y los ácaros (artrópodos) pueden contribuir notablemente al deterioro biológico de los cereales [11], debido a los daños físicos y a la pérdida de nutrientes que ocasiona su actividad, y también a causa de su interacción compleja con mohos y micotoxinas. Otro factor importante es la proporción de granos quebrados en una partida de cereales, ya que el endospermo expuesto es propenso a la invasión de mohos [12]. En el campo, los cereales se contaminan principalmente con mohos que requieren actividades acuosas altas para proliferar, mientras que en los granos almacenados pueden proliferar mohos que requieren contenidos de humedad más bajos [13].

Las condiciones ambientales, climatólogicas, geográficas y de almacenaje, condiciones pluviométricas, ubicación continental, etc., son factores que también influyen en el desarrollo y proliferación de los hongos y por tanto en la posible contaminación micotóxica de los alimentos. Por esta razón, las micotoxinas pueden formarse en cualquier etapa del proceso de producción y/o transformación de los productos alimenticios [10,14] (Figura 1).

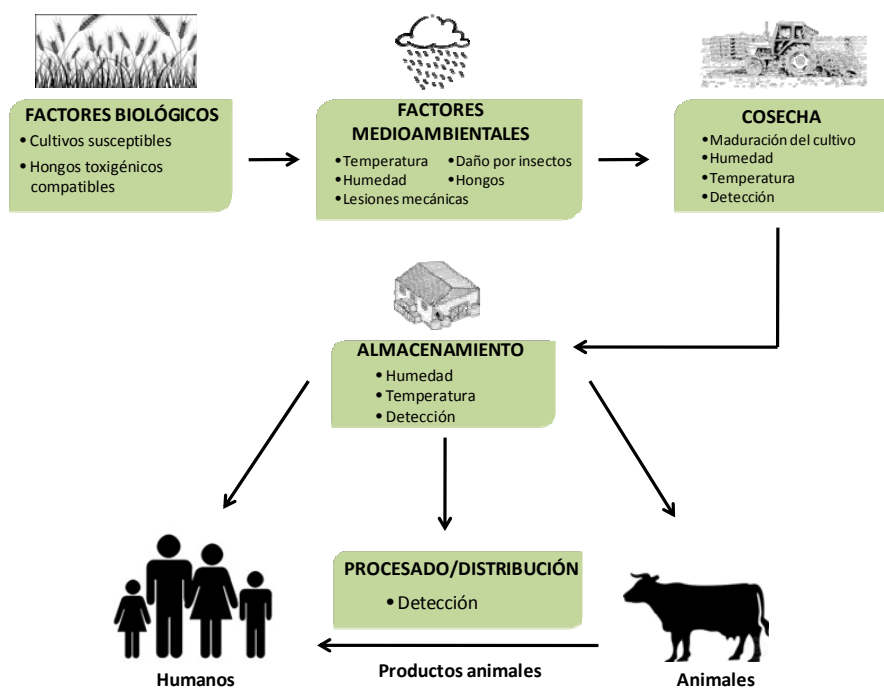


Figura 1. Factores que afectan al crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas [15].

MEMORIA CIENTIFICA

Algunos hongos son capaces de producir más de un tipo de micotoxina y algunas de ellas pueden ser producidas por más de una especie de hongo. Aunque el número de micotoxinas caracterizadas es considerable [16], debido a su elevada toxicidad en el hombre y en animales, las más estudiadas son las aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, citrina, esterigmatocistina y alcaloides ergóticos [16,17].

Todos estos compuestos presentan una toxicidad que puede variar desde la producción de varios trastornos hormonales, inmunosupresión hasta la inducción de actividad carcinogénica, teratogénica o mutagénica [18].

De todas las micotoxinas anteriormente mencionadas, en este estudio sólo nos vamos a centrar en algunas que pueden aparecer en huevo, como son las aflatoxinas y ocratoxina A, muy importantes debido a su elevada toxicidad y poder carcinogénico, la beauvericina, enniatinas y citrinina.

Las aflatoxinas son, sin lugar a dudas, las micotoxinas más importantes. Se caracterizan por ser sustancias hepatotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas, mutagénicas [2] y son grandes agentes destructores del sistema hepático. Además son consideradas inmunosupresoras, citotóxicas y antinutricionales ya que provocan deficiencia en la absorción de hierro, zinc y vitamina A. Están producidas por tres especies de la sección *Flavi*: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* [8,19,20]. También *A. pseudotamarii* [14,21], *A. bombycis* y *A. ochraceoroseus* [14,22] han sido señalados como productores de estas micotoxinas. Existen alrededor de 18 aflatoxinas [1,23], pero sólo 4 de ellas (B1, B2, G1 y G2) (Figura 2) son las más estudiadas, ya que han sido encontradas en alimentos y piensos [24]. Entre las aflatoxinas, la B1 es la que presenta una mayor tasa de toxicidad para los animales [25,26], seguida por las aflatoxinas G1, G2 y B2. Además, la aflatoxina B1 puede ser metabolizada por el ganado obteniéndose aflatoxina M1, la cual ha sido también detectada a niveles traza en huevo [27]. Debido a su alta toxicidad, tanto en términos agudos como crónicos [22], y a su alto efecto cancerígeno [17], la Organización Mundial de la

MEMORIA CIENTIFICA

Salud (OMS) y la IARC han clasificado a la aflatoxina B1 dentro del grupo 1 (clase de agentes que sin duda son cancerígenos para los humanos) [28].

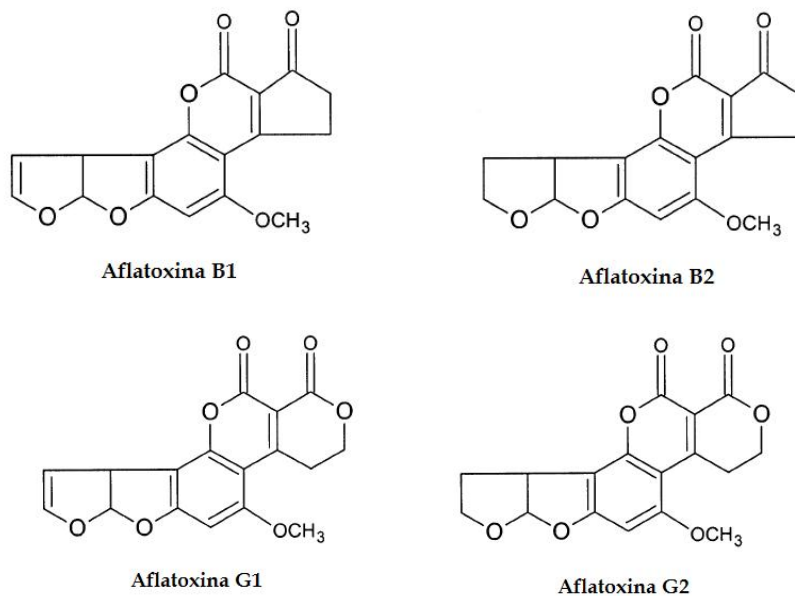


Figura 2. Estructura de las aflatoxinas.

Las ocratoxinas son el primer grupo de micotoxinas caracterizadas después de las aflatoxinas y están recibiendo una especial atención en todo el mundo por su marcado carácter nefrotóxico [29,30]. La ocratoxina A es también una de las micotoxinas más importantes y ha sido detectada en una gran variedad de productos alimenticios como cereales, granos de café y bebidas [31]. Diversos estudios han demostrado que la ocratoxina A (Figura 3) posee además propiedades carcinogénicas, teratogénicas e inmunotóxicas [32,33] y ha sido clasificada en el grupo 2B por la IARC [28]. Desde su descubrimiento en 1965 la producción de esta micotoxina se asocia en el género *Aspergillus* a siete especies de la sección *Circumdati*: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus pretakii*, *Aspergillus sclerotiorum* y *Aspergillus sulphureus*. Recientemente se ha descrito la producción de esta micotoxina por otras dos especies de dicha sección: *Aspergillus albertensis* y *Aspergillus auricomus* [34].

MEMORIA CIENTIFICA

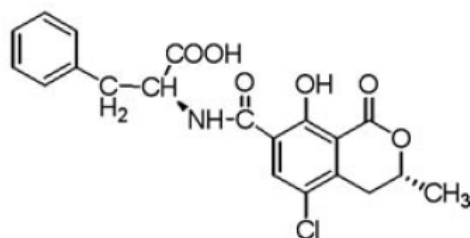


Figura 3. Estructura de la ocratoxina A.

La citrinina es un metabolito secundario tóxico producido, principalmente, por la especie *Penicillium citrinum*, aunque también es producida por otras especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Monascus* [35]. Su principal efecto nocivo es su carácter hepato-nefrotóxico en un amplio rango de especies. Además, la citrinina (Figura 4) y la ocratoxina A coexisten frecuentemente, bajo condiciones favorables para su desarrollo, en productos almacenados, cereales, fruta, carne y queso, actuando sinérgicamente [35]. Esto puede facilitar el paso de dichos contaminantes a los piensos y, a su vez, a la cadena alimentaria, pudiéndose encontrar en huevo [36,37]. Además de su toxicidad, son responsables de la disminución en la producción de huevo [38].

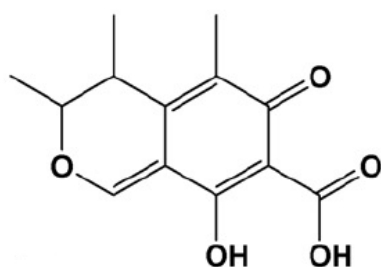
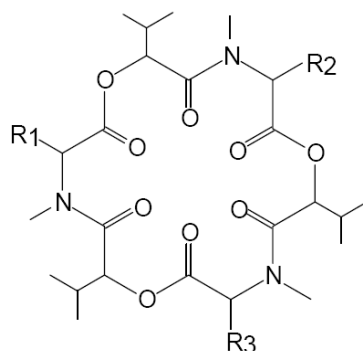


Figura 4. Estructura de la citrinina.

MEMORIA CIENTIFICA

Por último, se encuentran la beauvericina y el grupo de las enniatinas, en concreto la A, A1 y B1. Todas tienen una estructura similar (Figura 5) [39], como se muestra a continuación:



Compuesto	R1	R2	R3
Enniatina A	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	CH(CH ₃)C ₂ H ₅
Enniatina A1	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂
Enniatina B	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
Enniatina B1	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)C ₂ H ₅
Beauvericina	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅

Figura 5. Estructura de la beauvericina y del grupo de las enniatinas.

Estas micotoxinas son producidas por diferentes especies de *Fusarium* como *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* y *Fusarium tricinctum* [40,41]. Al tener estructuras químicas similares, su acción tóxica también es similar. Estas micotoxinas se caracterizan por tener propiedades ionofóricas, interfieren en el gradiente electroquímico de las membranas produciendo alteraciones fisiológicas y pueden interferir en la replicación del ADN. Todos estos estudios han sido llevados a cabo *in vitro* [42]. En los pocos estudios que se han llevado a cabo *in vivo*, la toxicidad de estos compuestos ha resultado ser baja [43]. Aunque la toxicidad de estas micotoxinas no sea tan importante como la producida por las aflatoxinas o la ocratoxina A, han sido incluidas en este estudio debido a su carácter lipofílico, lo que posibilita que puedan bioacumularse en la yema del huevo [44-46].

MEMORIA CIENTIFICA

2.3. Legislación

La presencia de micotoxinas en los alimentos, como ya se ha comentado anteriormente, constituye un serio problema para la salud, debido a la elevada toxicidad y efectos negativos sobre los seres humanos, así como a su posible efecto cancerígeno. Considerando los efectos toxicológicos de las micotoxinas y para asegurar la inocuidad de los alimentos para los consumidores, diversos gobiernos, organismos e instituciones regionales, nacionales y mundiales, han desarrollado una serie de Regulaciones, (Recomendaciones, Reglamentos, Directivas, opiniones de expertos, normas, etc.), en las que se establecen límites o valores orientativos sobre el contenido máximo de ciertas micotoxinas en determinados alimentos y materias primas, destinados a la alimentación tanto humana como animal.

A nivel nacional, el Real Decreto 475/1988 establece los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para el consumo humano [47] fijando un límite máximo de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y un máximo de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la B1.

A nivel de la Unión Europea, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 establece el contenido máximo de aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, deoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas y toxinas T2 y HT2 para diversos productos alimenticios [48].

Sin embargo es importante destacar que, concretamente para el huevo, no se han establecido LMRs que garanticen un alimento seguro al consumidor, por lo que los estudios que se llevan a cabo para determinar estos compuestos en esta matriz pueden servir para establecer dichos LMRs.

3. Análisis de micotoxinas en huevo

Con el objetivo de controlar la presencia de micotoxinas en huevo, se han desarrollado diferentes metodologías, aunque éstas están enfocadas, fundamentalmente, al análisis de un único compuesto [27,42]. Son pocas las publicaciones que realizan un análisis multiclase, siendo siete el número máximo de micotoxinas analizadas [49,50]. Una de las principales dificultades relacionadas con la determinación de estos analitos en huevo es el alto contenido en lípidos y proteínas presentes en esta matriz [51]. Estos componentes pueden ser coextraídos con los analitos de interés y, por tanto, interferir en la determinación analítica.

Por esta razón, el proceso empleado para llevar a cabo la extracción de micotoxinas en huevo puede resultar largo y tedioso, requiriendo para ello varias etapas de limpieza para eliminar este material coextraído de la matriz con los analitos.

3.1. Extracción de micotoxinas en huevo

El desarrollo de métodos multi-micotoxina, capaces de analizar varias clases de compuestos de forma simultánea, beneficia al rendimiento de un laboratorio de ensayo, ya que un elevado número de compuestos pueden ser determinados en un solo análisis. Sin embargo, las propiedades físico-químicas de los compuestos incluidos en cada grupo de contaminantes pueden resultar muy diferentes, lo que dificulta el desarrollo de un único y adecuado procedimiento de extracción. En el área de micotoxinas, tan sólo cinco trabajos se han centrado en la determinación de estos contaminantes en huevo, siendo siete el número máximo de compuestos analizados y perteneciendo éstos a la misma familia, presentando por tanto propiedades similares [49].

Los métodos descritos en literatura para la determinación de micotoxinas en huevo han empleado métodos de extracción tradicionales, como

MEMORIA CIENTIFICA

la extracción líquido-líquido (LLE) [52] y la extracción en fase sólida (SPE) [27,42].

La **LLE** es una técnica de extracción basada en la separación de los componentes de una mezcla líquida mediante la transferencia de materia a otro disolvente inmiscible, o parcialmente inmiscible con ella y en el que son solubles los compuestos de interés [53]. Entre los disolventes orgánicos empleados para la extracción de micotoxinas en huevo se encuentran el acetonitrilo (ACN) [42,52] y el metanol (MeOH) [50]. Debido a la cantidad de interferentes que se extraen junto a los analitos, en muchas ocasiones la LLE va acompañada de una etapa de limpieza basada en una SPE [27,42,50].

Además de ser usada como etapa de limpieza, la **SPE** es un método de preparación y tratamiento de muestra que purifica y concentra los analitos presentes en una disolución, por adsorción sobre una fase sólida, seguida por la elución de los analitos con un disolvente apropiado para el análisis instrumental. La purificación consiste en aislar el analito de los compuestos interferentes y matriz de la muestra y la concentración implica obtenerlo finalmente en un pequeño volumen de disolvente [54].

Entre los cartuchos de SPE empleados para la extracción de micotoxinas en huevo se encuentran los cartuchos de sílica [42] y los rellenos poliméricos [50]. Es importante destacar también el empleo de los adsorbentes de inmunoafinidad, tanto para la extracción de micotoxinas en huevo, como con fines de limpieza [49,50,52].

En muchos de estos procedimientos de extracción se incluye una etapa previa a la misma para eliminar grasas y proteínas presentes en el huevo. La centrifugación de la muestra, que puede diluirse previamente con disolventes como MeOH y ACN, ha sido el procedimiento más empleado para dicho fin [42,50].

Las numerosas etapas derivadas del uso de estas técnicas tradicionales provocan, obviamente, una mayor manipulación de muestra. Esto implica

MEMORIA CIENTIFICA

pérdidas de analitos durante el procedimiento y en el caso de LLE, el empleo de grandes cantidades de disolvente.

Entre todos los procedimientos empleados para la extracción de sustancias orgánicas de alimentos, es importante destacar el método **QuEChERS** (acrónimo del inglés de: rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro) [55]. Este método fue desarrollado originalmente para la extracción de plaguicidas en frutas y verduras, pero ha sido empleado en muchas otras matrices para la extracción de diferentes compuestos [56,57]. Sin embargo, no se ha empleado en la extracción de micotoxinas en huevo hasta el momento.

Este método consiste en una extracción con ACN acidificado con ácido acético, seguido de una partición inducida mediante la adición de una mezcla de sales (sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$) y cloruro de sodio ($NaCl$)). A continuación, una alícuota del extracto se somete a una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) con amina primaria-secundaria (PSA), carbón grafitizado (GCB) y/o C_{18} [58].

3.2 Determinación de micotoxinas

Para llevar a cabo la determinación de micotoxinas en huevo, la LC-MS/MS ha sido la técnica analítica comúnmente seleccionada, debido a la escasa volatilidad de estos compuestos, así como a que no es necesaria una etapa de derivatización previa, como ocurre con la GC [59].

La LC acoplada a detectores de ultravioleta (UV), fluorescencia (FLD) o diodos en fila (DAD) ha sido empleada para la determinación de micotoxinas en huevo [27,50,52]. Sin embargo, actualmente la LC-MS(/MS) constituye una excelente herramienta de análisis en este campo [42,49] debido a sus múltiples ventajas, como son la alta selectividad y sensibilidad, reducción sustancial del tratamiento de muestra y cuantificación y confirmación segura en una sola inyección a niveles traza.

MEMORIA CIENTIFICA

3.2.1. Cromatografía de líquidos

Para garantizar una correcta cuantificación en LC es esencial una buena separación de las micotoxinas. A tal fin se han utilizado diversas fases móviles (por ejemplo ACN, MeOH, agua) conteniendo uno o más modificadores (como ácido acético o ácido fórmico), dependiendo del método de detección y la naturaleza química de la micotoxina. En LC-FLD y DAD es especialmente importante un pre-tratamiento de la muestra para eliminar o reducir el número de interferencias que puedan afectar en la determinación de los compuestos. En la práctica, la técnica LC-FLD se aplica para la detección de ocratoxina A en diversas matrices, como vino tinto, frutos secos, arroz, queso azul, etc [60]. Las aflatoxinas también pueden ser detectadas mediante esta técnica [61].

Recientes avances en la instrumentación cromatográfica han permitido la evolución de la técnica, como el desarrollo de la cromatografía de líquidos de ultra presión (UHPLC, *ultra-high pressure liquid chromatography*). La UHPLC utiliza columnas cortas rellenas de partículas con un diámetro inferior a 2 μm . Esta reducción del diámetro de la partícula permite trabajar a altas velocidades lineales de flujo dando lugar a una mayor resolución cromatográfica, una reducción del tiempo de análisis y un incremento de la señal. Sin embargo, la reducción del tamaño de las partículas en un factor de tres (de un tamaño de partícula de 5 μm en LC a < 2 μm en UHPLC) provoca un aumento en la presión en un factor de 27. Por lo tanto, para poder trabajar a estas elevadas velocidades es necesario operar a presiones más altas (10.000-15.000 psi) y utilizar instrumentos especialmente diseñados [62].

Además, después de llevar a cabo un análisis cromatográfico, los tiempos de equilibrio de las columnas de UHPLC se reducen considerablemente en comparación con las columnas de LC, lo que permite aumentar y mejorar el rendimiento del laboratorio de ensayo [63]. Este hecho, junto con las velocidades de flujo lineal que pueden alcanzarse con las

MEMORIA CIENTIFICA

columnas UHPLC, ha permitido desarrollar métodos multi-clase de micotoxinas con tiempos de análisis inferiores a 9 min [64].

3.2.2. Espectrometría de masas

Actualmente el uso de técnicas cromatográficas acopladas a sistemas de detección de MS en el análisis de contaminantes a niveles traza está ampliamente implantado, permitiendo detectar componentes individuales en mezclas complejas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa de gran calidad. La MS es una herramienta poderosa en la cuantificación-confirmación de contaminantes dada su alta sensibilidad y selectividad. El uso de detectores clásicos como FLD o UV requiere realizar un segundo análisis utilizando una columna diferente o bien, utilizando un detector diferente como el de MS para la adecuada confirmación de un positivo con el consiguiente aumento de tiempo. Sin embargo, el empleo de la MS permite la confirmación simultánea de los positivos. La MS permite la generación de iones en fase gaseosa, además de su separación y detección, proporcionando información de la masa molecular del compuesto analizado, así como información estructural del mismo, comprendiendo básicamente tres etapas:

- Ionización de la muestra.
- Separación y análisis de los iones y fragmentos cargados según su relación masa/carga (m/z).
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

El mayor avance en el análisis de micotoxinas en los últimos años ha sido el acoplamiento de LC con MS, utilizando ionización a presión atmosférica, ya sea por electronebulización (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI). La ionización ESI muestra una mayor sensibilidad, por lo que es la

MEMORIA CIENTIFICA

técnica más utilizada. El desarrollo de la MS en varias etapas (MS^n) y LC acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS) ha permitido el desarrollo de métodos multi-analito de micotoxinas pertenecientes a familias diferentes y en distintas matrices, lo que posibilita una detección cuantitativa eficiente sin necesidad de derivatización [59,65].

Los estudios mediante LC-MS/MS permiten un aumento de la sensibilidad utilizando el modo de trabajo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM, *single reaction monitoring*), para la determinación e identificación de estos compuestos.

Entre los analizadores de masas empleados en la determinación de micotoxinas en huevo destaca el de triple cuadrupolo, QqQ [42,49]. El modo de trabajo SRM es el que más se usa con fines cuantitativos y para el análisis de trazas con QqQ. Además, este modo ha sido el seleccionado en este trabajo para llevar a cabo la detección de micotoxinas en huevo.

En SRM, el primer filtro de masas (Q1) se configura para dejar pasar los iones precursores seleccionados aproximadamente el tiempo de retención previsto para cada componente. Cuando el compuesto eluye del sistema cromatográfico, los iones precursores seleccionados pasan a través del filtro de masas mientras que los iones de los otros compuestos no lo harán.

A continuación, estos iones precursores pasan a una celda de colisión (q), en la cual se introduce un gas que choca con ellos. Si a los iones se les proporciona una energía suficiente durante la colisión se producen fragmentos característicos de cada uno de ellos, los cuales pasan al tercer filtro de masas (Q3). En este filtro de masas se va a establecer un campo constante para seleccionar sólo un fragmento específico del ion precursor [66]. De esta forma el compuesto sólo se detectará si el ion seleccionado en Q1 produce un determinado fragmento que es analizado en Q3.

En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos para analizar micotoxinas, mostrándose un especial interés en desarrollar un

MEMORIA CIENTIFICA

método multi-micotoxina que permita realizar análisis de rutina de un elevado número de estos compuestos [6,67,70] pertenecientes a diferentes familias.

En este trabajo se ha aplicado UHPLC-QqQ-MS/MS, empleando una fuente de ionización de electronebulización en modo positivo y negativo (ESI+, ESI-). En este sentido el acoplamiento de UHPLC a la técnica MS/MS, mejora considerablemente la detección, puesto que la reducción de la anchura de pico provoca un aumento en la eficacia de la ionización, lo que conlleva una mejora en la sensibilidad del método analítico.

EXPERIMENTAL

III. EXPERIMENTAL**4. Reactivos y materiales**

Los patrones de beauvericina, citrinina y aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los patrones de las enniatinas A, A1 y B1 fueron suministradas por Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EE.UU.). La disolución de ocratoxina A en acetonitrilo (10 mg L^{-1}) fue obtenida de Riedel de Hæen (Seelze, Alemania).

Se prepararon disoluciones primarias de cada compuesto mediante peso exacto de los patrones sólidos y disolución en 10, 25 ó 50 mL de acetonitrilo (grado HPLC, Sigma). Las concentraciones de estas disoluciones variaron entre 50 y 200 mg L^{-1} . A partir de ellas se preparó una disolución secundaria (2 mg L^{-1}) en acetonitrilo. Todas estas disoluciones se almacenaron a 4° C , siendo la secundaria renovada semanalmente.

El ácido acético (pureza $>97\%$), ácido fórmico (pureza $>98\%$), formiato amónico y sulfato sódico anhidro fueron obtenidos de Panreac (Barcelona, España). El acetato sódico anhidro fue suministrado por J. T. Baker (Deventer, Holanda). El metanol (grado HPLC) fue adquirido en Sigma. Agua ultrapura fue obtenida a partir de un sistema de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Los cartuchos Oasis HLB para SPE (200 mg/6cc) y cartuchos C_{18} Sep-Pak (200 mg/3cc) fueron suministrados por Waters (Milford, MA, EE.UU.).

5. Instrumentación

Para el tratamiento de muestras se empleó un mezclador Vortex (modelo Reax 2000) y un agitador rotatorio (modelo Reax-2) de Heidolph, una balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo, Greinfesee, Suiza) y una centrifuga CENTRONIC-BL II de JP Selecta. Para el filtrado de las muestras se usaron filtros de $0.20 \text{ }\mu\text{m}$ de nylon Millex-GN (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Se

EXPERIMENTAL

utilizó un sistema colector proporcionado por Waters conectado a un sistema de vacío (modelo Büchi Vac V-500) (Flawil, Suiza) para llevar a cabo la etapa de limpieza.

6. Análisis por UHPLC-MS/MS

El análisis cromatográfico se realizó con un sistema ACQUITY UPLC™ (Waters, Milford, MA, EE.UU.), utilizando una columna Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm x 2.1 mm), con 1.7 µm de tamaño de partícula de Waters. La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante elución en modo gradiente empleando una fase móvil constituida por metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de formiato amónico 5 mM (eluyente B) a un flujo de 0.30 mL min⁻¹. La temperatura de la columna se fijó a 30 °C. El análisis se inició con el 25 % del eluyente A, que se aumentó de forma lineal hasta el 100 % en 3.75 minutos. Esta composición se mantuvo durante 1.25 minutos, antes de volver a las condiciones iniciales en 0.50 minutos, seguido de un tiempo de equilibrado de 1 minuto, resultando un tiempo total de análisis de 6.5 minutos. El volumen de inyección fue de 5 µL.

La detección de los compuestos se realizó empleando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, Acquity TQD (Waters, Manchester, Reino Unido). Para la ionización de los compuestos se utilizó una fuente de electronebulización (ESI) en modo positivo y negativo. Los parámetros de la fuente de ionización en modo positivo fueron los siguientes: 3.5 kV de voltaje de capilar, 4 V de voltaje del extractor, 120 °C de temperatura de la fuente, 350 °C de temperatura de desolvatación, 80 L h⁻¹ de flujo del gas de cono y 550 L h⁻¹ de flujo del gas de desolvatación (ambos gases fueron nitrógeno). Los parámetros de la fuente de ionización en modo negativo fueron los mismos excepto el voltaje de capilar, el cual fue fijado a 2.5 kV. La disociación inducida por colisión fue realizada utilizando argón como gas de colisión, a una presión de 4x10⁻³ mbar en la celda de colisión. Las condiciones óptimas para la

EXPERIMENTAL

detección de micotoxinas mediante MS/MS se obtuvieron mediante inyección en columna de 500 µg L⁻¹ de cada disolución individual. Se adquirió en modo “full scan” o barrido completo y en modo “product ion scan” o barrido de iones producto para obtener al menos un ión precursor y dos iones producto para cada compuesto, con la finalidad de identificar y cuantificar las micotoxinas objeto de estudio. Se seleccionó el ión producto más abundante para cuantificación y el segundo para confirmación. La adquisición de datos se realizó mediante el software MassLynk 4.0 en conjunto con el software QuanLynx (Waters).

7. Preparación de las muestras

Para la extracción de micotoxinas, se homogeneizaron diez huevos frescos (yema y clara) a temperatura ambiente, agitándose continuamente durante cinco minutos, mostrándose un esquema del proceso en la Figura 6. Después se aplicó un procedimiento de extracción que consistió en pesar en un tubo de propileno (40 mL) 2 gramos de muestra homogeneizada de huevo fresco, añadir 10 mL de una disolución de metanol/agua (80:20 v/v) con un 1% de ácido acético. A continuación, adicionar 4 gramos de sulfato sódico anhidro y 1 gramo de acetato sódico anhidro. Agitar la mezcla en un vortex durante 2 minutos. Después, colocar el tubo en un agitador rotatorio y agitarlo durante 30 minutos a 60 rpm. Una vez finalizada la agitación, centrifugar a 4500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, tomar 1 mL de sobrenadante y filtrar a través de un filtro de Nylon Millex-GN de 0.20 µm e inyectar en el sistema UHPLC-MS/MS.

EXPERIMENTAL

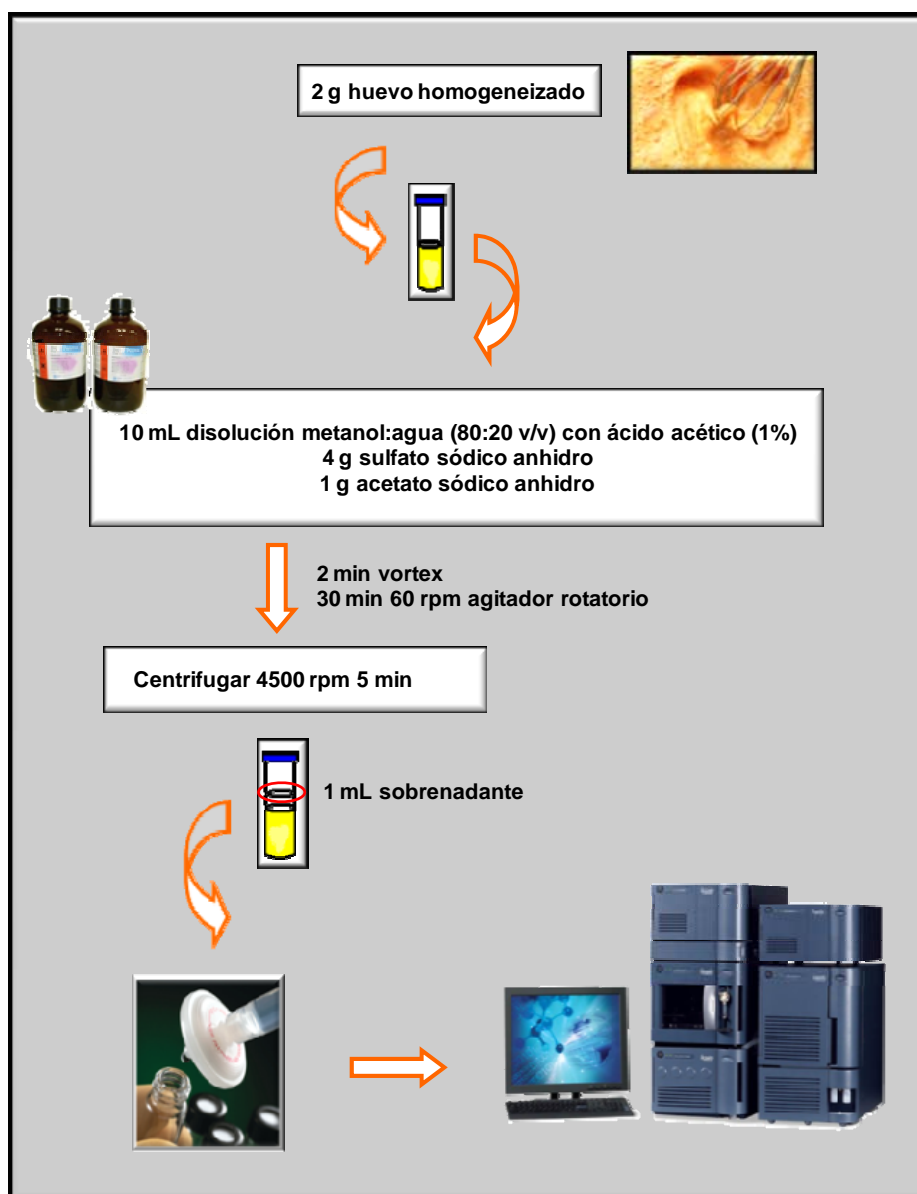


Figura 6. Esquema del procedimiento de extracción utilizado.

8. Procedimiento de validación

La linealidad del método se evaluó mediante el uso de calibración en matriz. Para ello se fortificaron blancos de huevo a cinco niveles de concentración comprendidos entre 1 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para las aflatoxinas G1, B2 y B1, entre 2 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la aflatoxina G2 y la beauvericina, entre 5 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la enniatina B1 y A1 y entre 10 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la citrinina,

EXPERIMENTAL

ocratoxina A y enniatina A. La repetibilidad del método se estudió a cuatro niveles de concentración (10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), realizando cinco réplicas para cada nivel de concentración. La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de una muestra fortificada a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante un periodo de cinco días consecutivos. Con el objeto de evaluar la veracidad del método seleccionado, se llevaron a cabo estudios de recuperación a cuatro niveles de concentración (10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) mediante la fortificación de cinco blancos de huevo a cada nivel.

La especificidad del método se estudió mediante el análisis y comparación de las señales de un blanco de huevo y un blanco fortificado a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Finalmente, los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron calculados analizando estándares en matriz a concentraciones 0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Se determinaron como la concentración de analito más baja que proporcionaba una señal/ruido (S/N) de 3 y 10 para LOD y LOQ, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9. Optimización del método cromatográfico

El método cromatográfico utilizado en este trabajo se ha basado en un método para determinar micotoxinas en leche [31] previamente desarrollado en el grupo de investigación *Química Analítica de Contaminantes*, perteneciente a la Universidad de Almería. Este método fue ligeramente modificado para nuestro estudio, incluyendo nuevas micotoxinas como citrinina, beauvericina y enniatinas B1, A1 y A, debido a que pueden encontrarse en huevo, como ya se ha explicado anteriormente.

Para la determinación en modo MS/MS, se empleó una fuente de ionización ESI y se evaluó el modo positivo y negativo. Se observó que todos los compuestos se detectaban en modo positivo (ESI +) excepto la citrinina que, de manera inesperada, presentó mayor sensibilidad en modo negativo (ESI -), a pesar de que, según bibliografía [68], el ESI+ es el más utilizado para su detección. En la Tabla 1 se muestran las distintas transiciones MS/MS, así como los voltajes de cono y las energías de colisión optimizadas para cada compuesto. Bajo las condiciones experimentales indicadas en la Sección 6, se observaron las moléculas protonadas, $[M+H]^+$, (molécula desprotonada en el caso de la citrinina, $[M-H]^-$) para todos los compuestos, excepto para la enniatina A, la cual formó un aducto con el sodio $[M+Na]^+$. Todos ellos se seleccionaron como iones precursores. En cuanto a los iones producto, los más intensos para la beauvericina, enniatina A1 y enniatina A fueron 244.1, 210.4 y 232.4 respectivamente, los cuales corresponden a [monómero con un residuo metilfenilo + H - H₂O]⁺ para la beauvericina, [monómero con un residuo *sec*-butilo + H - H₂O]⁺ para la enniatina A1 [69] y [monómero con un residuo *sec*-butilo + Na - H₂O]⁻ para la enniatina A. Para la enniatina B1, el ion más intenso fue el 196.1, el cual corresponde a [monómero con un *iso*-propilo + H - H₂O]⁺, el cual ya había sido observado previamente [70]. También se optimizaron otros

RESULTADOS Y DISCUSION

parámetros como los flujos del gas de desolvatación y gas de cono, temperatura de desolvatación y de la fuente y los voltajes de capilar, seleccionándose las condiciones óptimas para cada uno de ellos. A continuación se muestra un espectro de masas de la enniatina A, donde aparecen el ion precursor y los iones producto seleccionados (Figura 7).

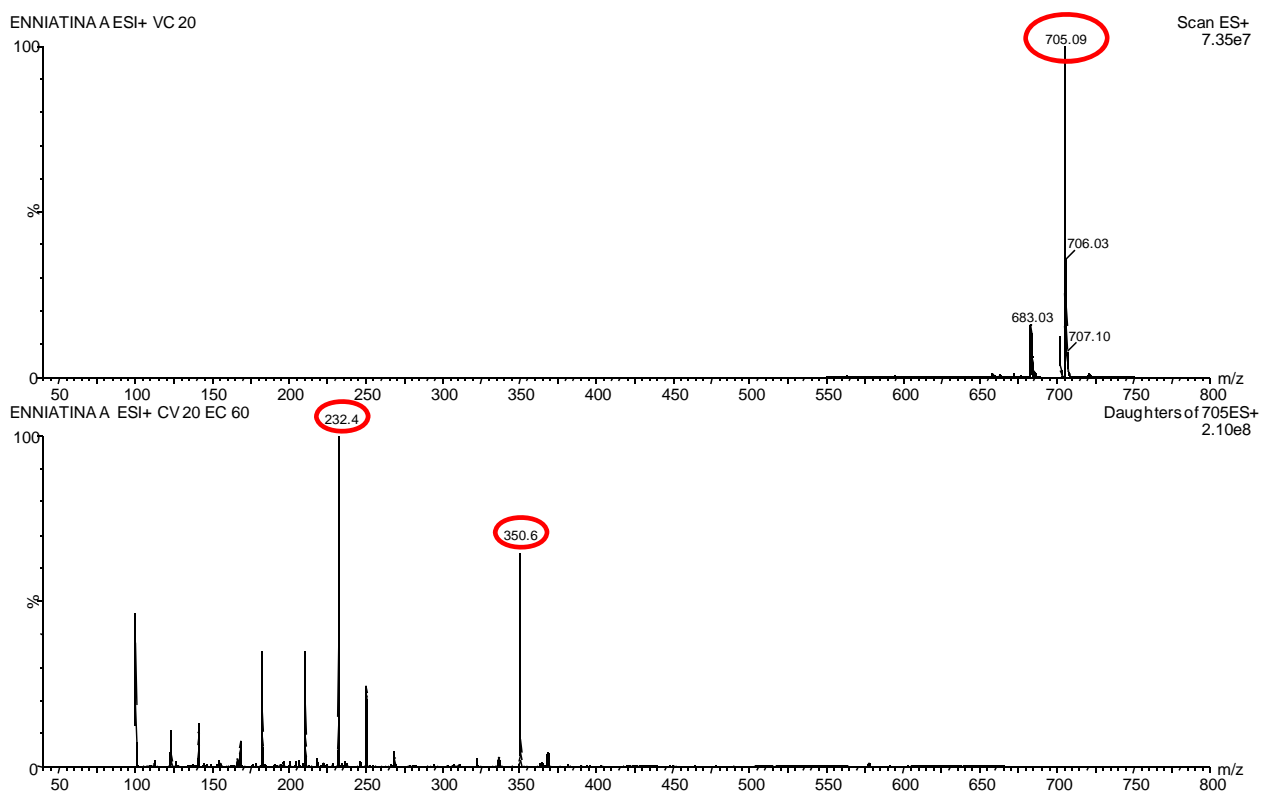


Figura 7. Espectro de masas de la enniatina A.

Todas las micotoxinas eluyeron con elevada selectividad en menos de 6,5 minutos, incluyendo la etapa de limpieza y re-equilibrado. También se obtuvo una buena sensibilidad en MS. Se evaluaron diferentes valores de *dwell time* para cada función, a fin de obtener unos buenos picos cromatográficos. El valor seleccionado fue 25 ms para todos los compuestos. Uno de los problemas a solventar fue la coelución de la citrinina y las aflatoxinas B1 y B2. Como la citrinina mostraba un ion precursor más intenso en modo negativo y las

RESULTADOS Y DISCUSION

aflatoxinas en modo positivo, se tenía que realizar un cambio de polaridad, lo cual disminuía la sensibilidad. Para este caso se redujo el *dwell time* a 15 ms, consiguiéndose, al menos, 10 puntos por pico. También coelúan la beauvericina y la enniatina B1 y la enniatina A1 y A. Aquí el uso de MS/MS nos proporcionó un análisis selectivo de estos compuestos, seleccionándose iones precursores diferentes. Finalmente, los analitos se distribuyeron en 4 funciones de adquisición solapadas, usando un máximo de cuatro compuestos en cada función.

Tabla.1. Ventanas del tiempo de retención (VTR) y parámetros específicos MS/MS para las micotoxinas analizadas.

Compuesto	ESI	Función	VTR (min)	Voltaje de cono (V)	Transición de cuantificación (m/z) ^a	Transición de confirmación (m/z) ^a
Aflatoxina G2	+	1	2.45-2.63	60	331.4>313.5 (25)	331.4>245.3 (30)
Aflatoxina G1	+	1	2.62-2.67	50	329.2>243.1 (25)	329.2>311.4 (25)
Aflatoxina B2	+	1	2.70-2.85	50	315.2>259.2 (30)	315.2>243.3 (35)
Citrinina	-	2	2.80-2.96	60	249.1>205.4 (20)	249.1>177.3 (25)
Aflatoxina B1	+	3	2.85-3.02	30	313.3>285.5 (25)	313.3>241.3 (30)
Ocratoxina A	+	3	3.04-3.19	25	404.2>239.2 (20)	404.2>358.2 (15)
Beauvericina	+	4	4.57-4.72	45	784.4>244.1 (20)	784.4>262.6 (30)
Enniatina B1	+	4	4.62-4.76	40	655.0>196.1 (20)	655.0>210.2 (25)
Enniatina A1	+	4	4.70-4.89	30	668.9>210.4 (35)	668.9>228.3 (30)
Enniatina A	+	4	4.76-4.84	20	705.1>232.4 (55)	705.1>350.6 (60)

^a Energía de colisión (eV)

RESULTADOS Y DISCUSION

La Figura 8 muestra un cromatograma de las micotoxinas obtenidas tras analizar una disolución intermedia de todos los compuestos en disolvente a una concentración de $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

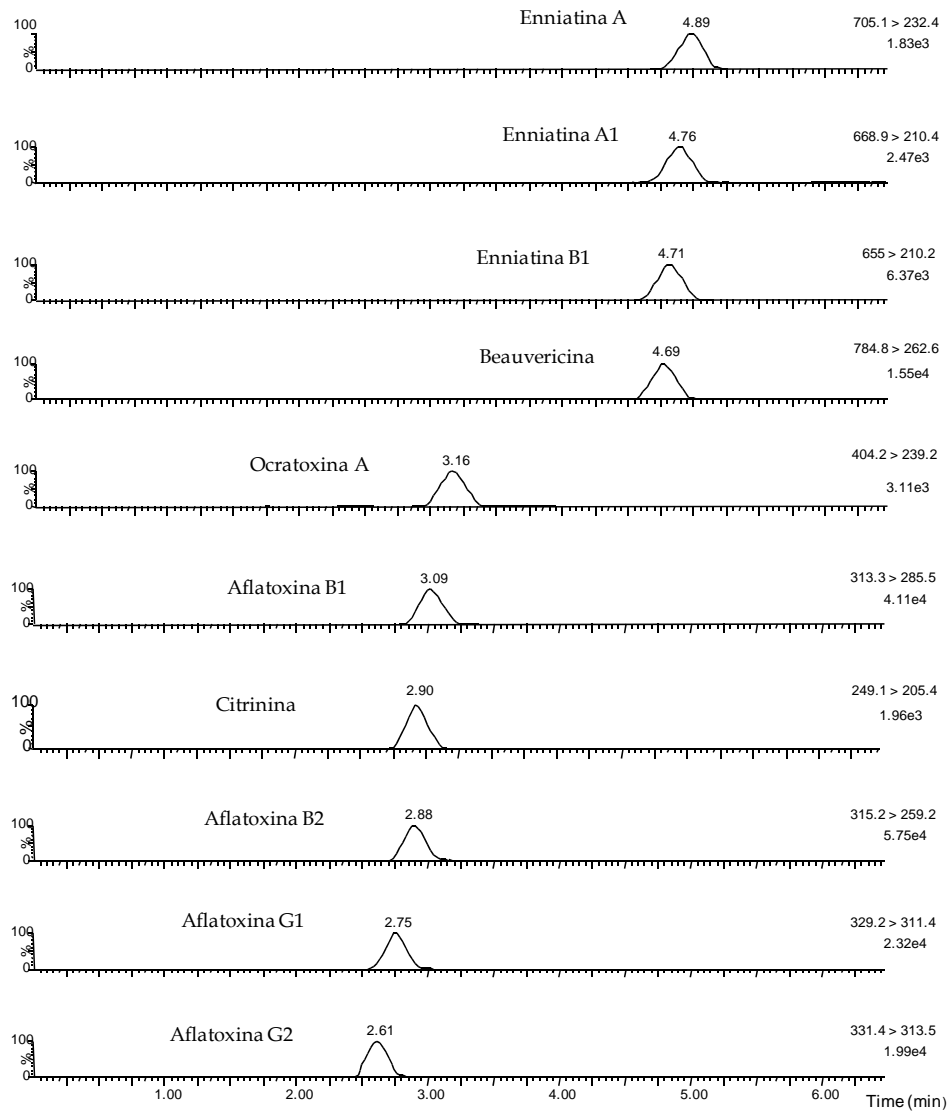


Figura 8. Cromatograma UHPLC-MS/MS obtenido tras fortificar un blanco de disolvente a $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

10. Optimización del método de extracción

En métodos multiclase, el paso crítico es la extracción y la etapa de limpieza, especialmente en una matriz compleja, como es el huevo. Para reducir el tratamiento de muestra y aumentar el rendimiento, antes del análisis cromatográfico se realizó una extracción simple basada en el procedimiento QuEChERS. Además, se evaluaron diferentes parámetros de extracción, fortificando blancos de huevo a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ y teniendo en cuenta el número de compuestos extraídos y los valores de recuperación.

10.1. Evaluación del disolvente de extracción

A pesar de que en el procedimiento QuEChERS se utiliza acetonitrilo acidificado con ácido acético y, teniendo en cuenta que en los procedimientos de extracción de micotoxinas de distintas matrices se utilizan mezclas de acetonitrilo/agua o metanol/agua [50], lo primero que se evaluó fue el disolvente de extracción, utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

Se estudiaron distintas mezclas, como acetonitrilo/agua (80:20 v/v), acetonitrilo/agua (80:20 v/v) con un 1% (v/v) de ácido acético y metanol/agua (80:20 v/v) con un 1% (v/v) de ácido acético. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9, donde se observa que la mezcla formada por acetonitrilo/agua sin ácido es la que proporciona peores resultados (bajas recuperaciones). Cuando esta mezcla se acidifica los resultados mejoran, pero, aún así, los mejores resultados se obtienen empleando la mezcla formada por metanol/agua (80:20 v/v) acidificada con un 1% de ácido acético, por lo que fue la elegida para el proceso de extracción, debido a los excelentes valores de recuperaciones que se obtuvieron.

RESULTADOS Y DISCUSION

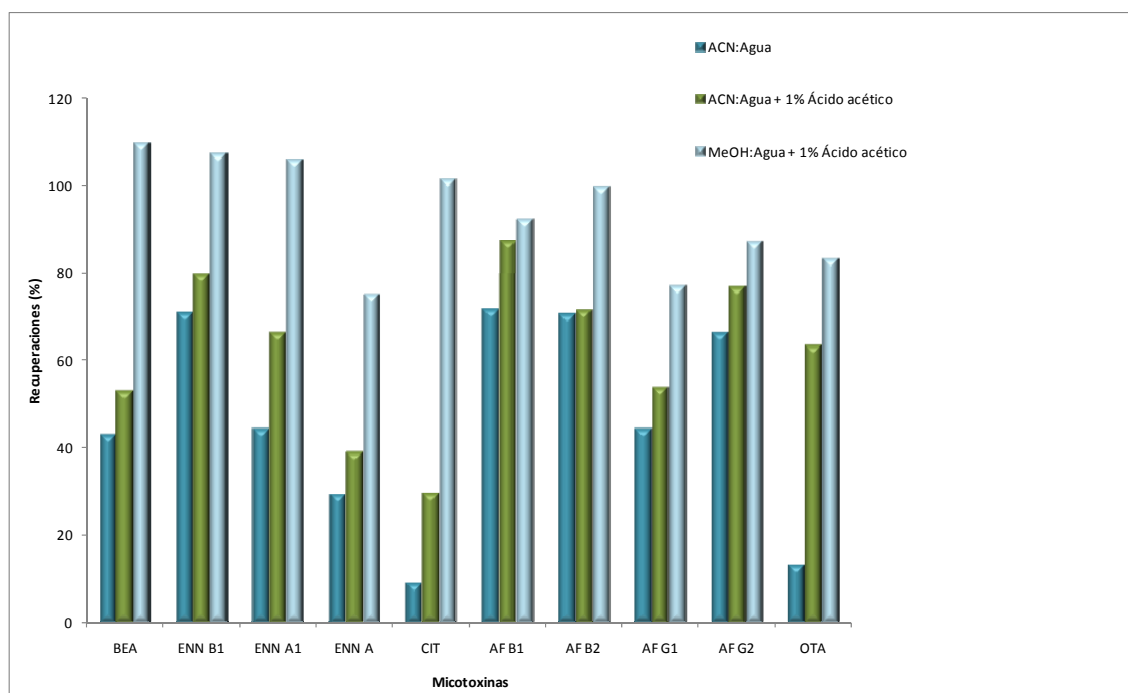


Figura 9. Efecto del tipo de disolvente en la extracción de micotoxinas en huevo.
 Abreviaturas: ACN: Acetonitrilo; AFB1: Aflatoxina B1; AFB2: Aflatoxina B2; AFG1: Aflatoxina G1; AFG2: Aflatoxina G2; BEA: Beauvericina; CIT: Citrinina; ENNA: Enniatina A; ENNA1: Enniatina A1; ENNB1: Enniatina B1; MEOH: Metanol; OTA: Ocratoxina A.

10.2. Evaluación de la adición de sales

Una característica importante del procedimiento QuEChERS es la adición de sales con la finalidad de separar el agua presente en la muestra del disolvente de extracción [55]. Teniendo en cuenta que el contenido de agua del huevo es mayor del 70% y que además se añade agua durante el procedimiento de extracción, es necesaria la adición de sales para inducir la separación de fases (acuosa y orgánica) y evitar la necesidad posterior de evaporar. Además, la influencia de las sales (en este caso sulfato sódico anhidro y acetato sódico anhidro) fue evaluada teniendo en cuenta el contenido en agua del huevo. La Figura 10 muestra los resultados obtenidos cuando la extracción fue llevada a cabo con sales y sin sales. Se observa que la adición de sales aumenta la

RESULTADOS Y DISCUSION

recuperación de los compuestos seleccionados y facilita la separación del agua y el disolvente orgánico. Por tanto, la adición de sales se aplicó en experimentos posteriores.

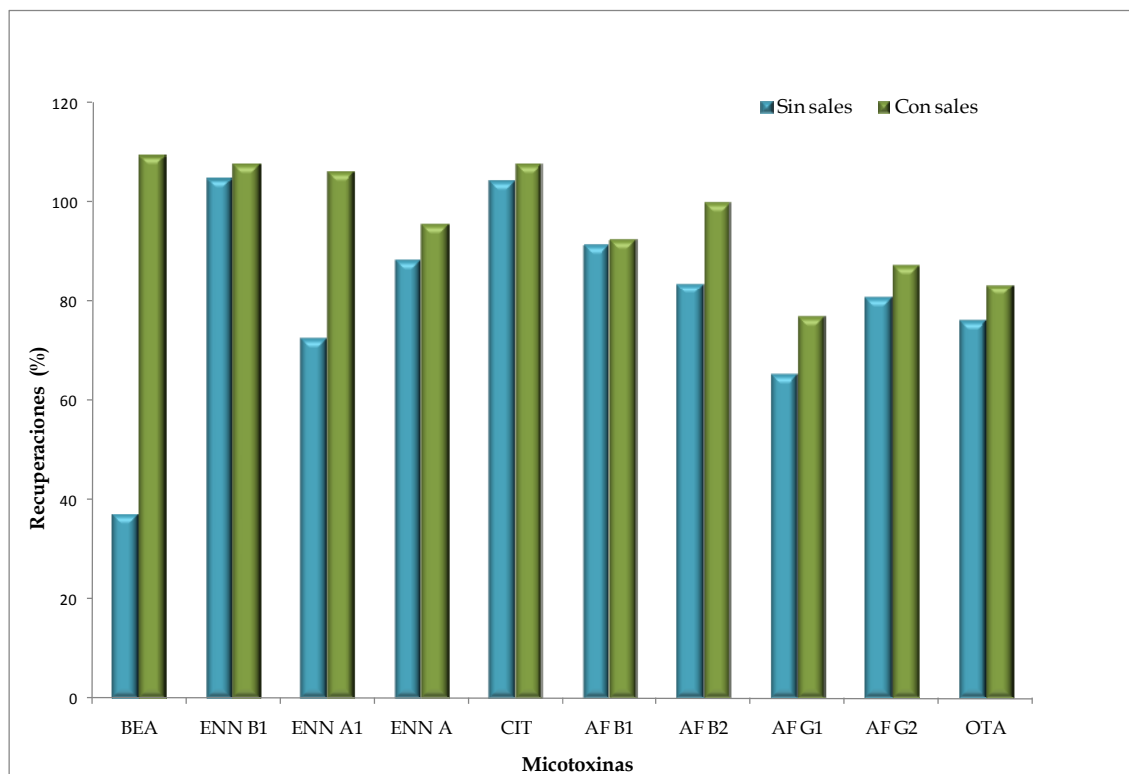


Figura 10. Efecto de la adición de sales en la extracción de micotoxinas en huevo.
 Abreviaturas: AFB1: Aflatoxina B1; AFB2: Aflatoxina B2; AFG1: Aflatoxina G1; AFG2: Aflatoxina G2; BEA: Beauvericina; CIT: Citrinina; ENNA: Enniatina A; ENNA1: Enniatina A1; ENNB1: Enniatina B1; OTA: Ocratoxina A.

10.3. Evaluación del tiempo de extracción

A continuación se evaluó el tiempo de extracción, estudiándose 5, 30 y 60 minutos, mostrándose los resultados obtenidos en la Figura 11. Cabe destacar que la recuperación de los compuestos aumenta de 5 a 30 minutos para después disminuir o permanecer constante. Por tanto, se seleccionó como tiempo óptimo de extracción 30 minutos. Hay que indicar que, aunque el tiempo de extracción puede considerarse demasiado largo, un elevado número

RESULTADOS Y DISCUSION

de muestras pueden extraerse simultáneamente, aumentando el rendimiento del proceso (Figura 11).

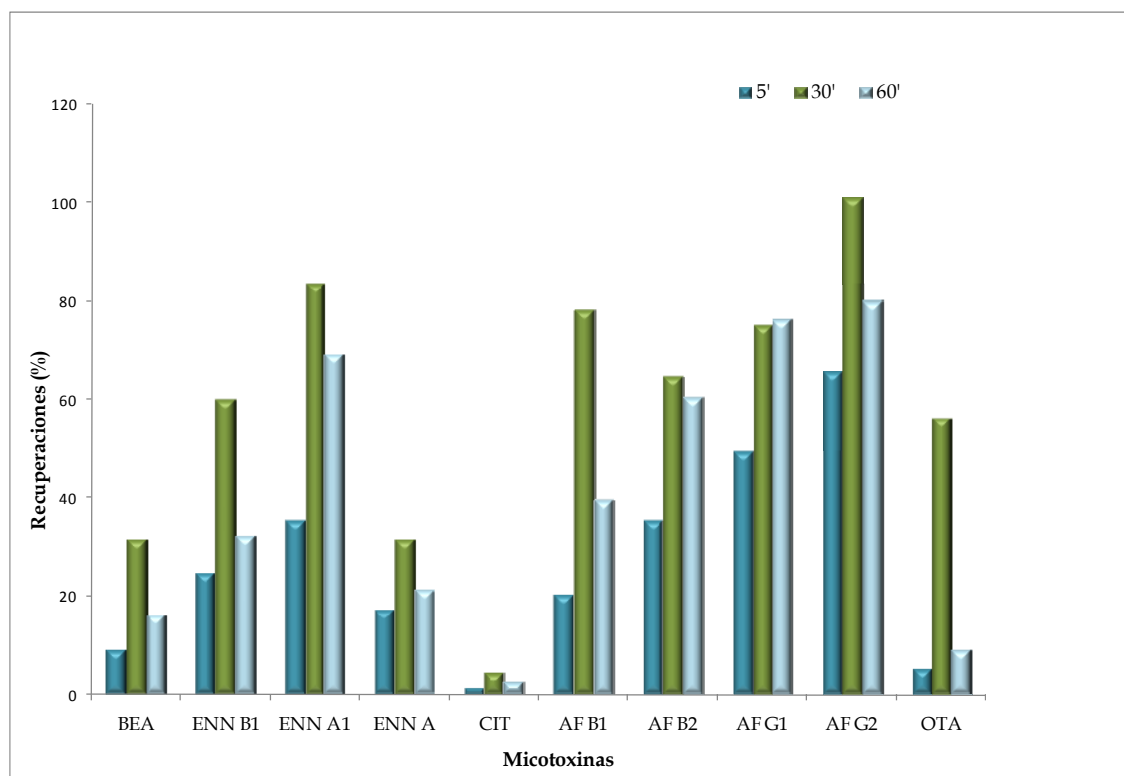


Figura 11. Evaluación del tiempo de extracción.

Abreviaturas: AFB1: Aflatoxina B1; AFB2: Aflatoxina B2; AFG1: Aflatoxina G1; AFG2: Aflatoxina G2; BEA: Beauvericina; CIT: Citrinina; ENNA: Enniatina A; ENNA1: Enniatina A1; ENNB1: Enniatina B1; OTA: Ocratoxina A.

10.4. Evaluación de una etapa de limpieza

Finalmente se evaluó la realización de una etapa de limpieza posterior a la extracción, considerando que algunos compuestos interferentes pueden co-extraerse, interfiriendo en la detección de las micotoxinas y reduciendo la vida útil de la columna. Se utilizaron cartuchos convencionales para SPE, comparando los sorbentes OASIS HLB y C₁₈. Utilizando el procedimiento inicial de extracción, parte del sobrenadante se hizo pasar a través del cartucho. El

RESULTADOS Y DISCUSION

extracto que se obtuvo se filtró con un filtro de Nylon Millex-GN de 0.20 μm y se inyectó en el sistema UHPLC-MS/MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, donde se puede observar que los peores resultados se obtuvieron cuando se aplicó la etapa de limpieza. Por tanto, dicha etapa no se aplicó en los experimentos posteriores, observándose que la vida útil de la columna no se vio afectada por la inyección directa del extracto.

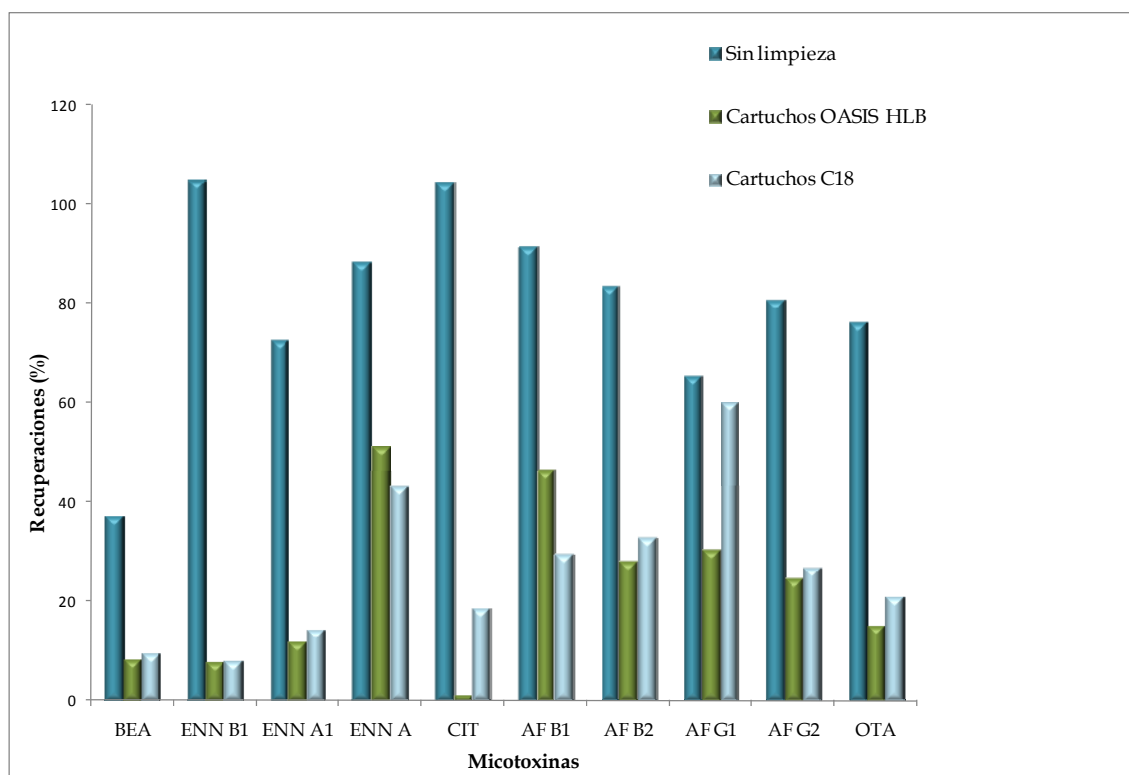


Figura 12. Efecto de una etapa de limpieza en la extracción de micotoxinas en huevo. Abreviaturas: AFB1: Aflatoxina B1; AFB2: Aflatoxina B2; AFG1: Aflatoxina G1; AFG2: Aflatoxina G2; BEA: Beauvericina; CIT: Citrinina; ENNA: Enniatina A; ENNA1: Enniatina A1; ENNB1: Enniatina B1; OTA: Ocratoxina A.

A continuación (Figura 13) se muestra un cromatograma obtenido tras la fortificación de una muestra de huevo con 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y sometida al proceso de extracción. Como puede observarse, el procedimiento de extracción optimizado acoplado a UHPLC-MS/MS proporcionó un cromatograma limpio, sin interferencias. También se observa que no se obtuvo una resolución completa

RESULTADOS Y DISCUSION

para todos los compuestos, sin embargo ello no supone un inconveniente mayor debido a la elevada selectividad del método de detección MS/MS.

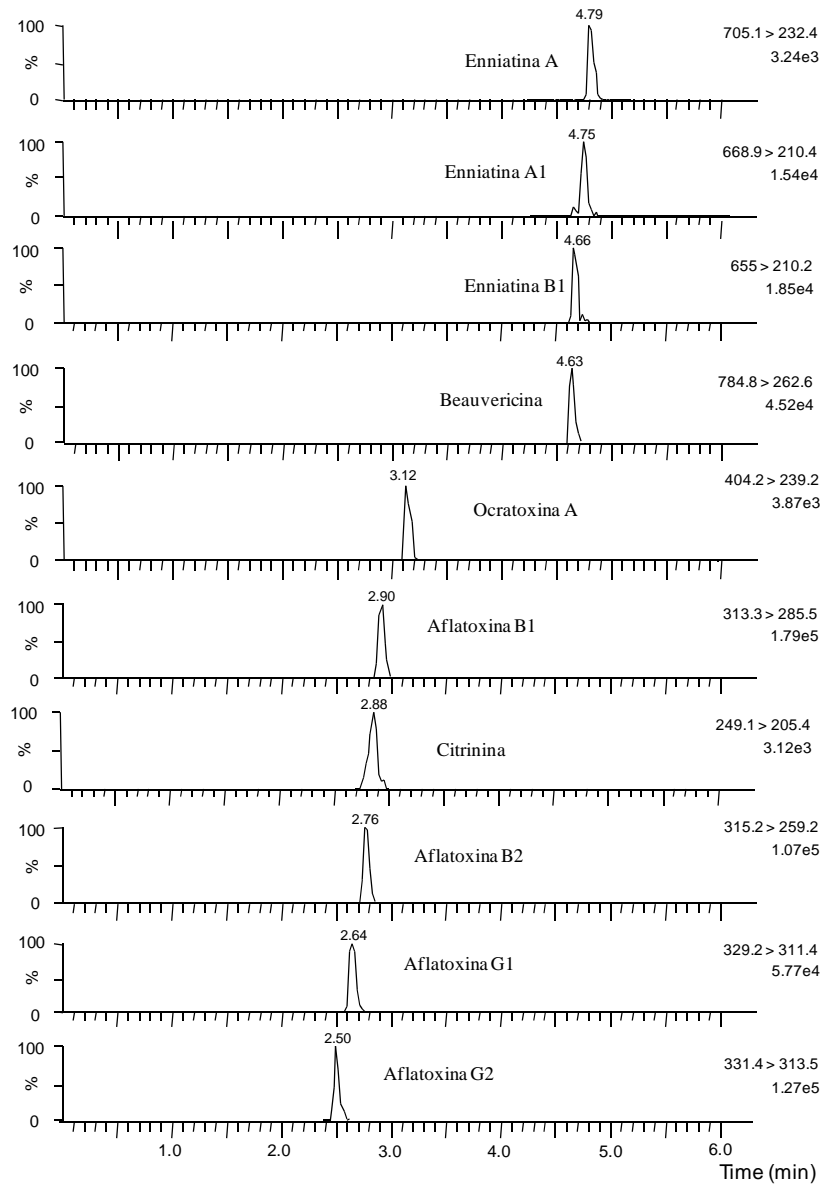


Figura 13. Cromatograma UHPLC-MS/MS obtenido tras fortificar un blanco de huevo a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

11. Validación del método analítico

La metodología analítica desarrollada fue validada mediante la estimación de los siguientes parámetros: efecto matriz, linealidad, veracidad, repetibilidad, precisión intermedia, selectividad y límites inferiores (LOD y LOQ).

El principal problema del análisis por LC-MS o LC-MS/MS cuando se emplea una fuente de ESI es que la ionización de los analitos puede verse afectada, en mayor o menor medida, por efectos de competencia debido a la presencia de componentes procedentes de la matriz. El resultado es una reducción o un aumento de la señal de los analitos en matriz en comparación con la señal producida por los mismos en disolvente.

La mejor forma de compensar el efecto matriz es mediante el uso de estándares internos marcados isotópicamente. Este modo permite corregir la intensidad de la señal de iones, ya que tanto los compuestos marcados como los analitos se verán afectados en la misma medida por el efecto de la matriz. Sin embargo, a pesar de la existencia de compuestos de interés marcados isotópicamente, no los hay para la gran mayoría de los contaminantes y además debido a su elevado precio puede resultar inviable en el caso de métodos multiresiduo. Otra forma ampliamente aceptada para minimizar el efecto matriz es el uso de calibración en matriz, denominada en inglés *matrix-matched standard calibration*.

Para evaluar la presencia de este efecto en nuestras muestras, se analizaron diferentes concentraciones de los analitos ($5\text{-}200\ \mu\text{g L}^{-1}$) en disolvente y en extractos de blancos de huevo. La Figura 14 muestra la comparación entre las pendientes obtenidas para cada compuesto tras analizar un calibrado en disolvente y un calibrado en matriz. Se considera un efecto matriz no significativo si la relación entre las pendientes obtenidas de la calibración en matriz y la calibración en disolvente se encuentra entre 0.8 y 1.2. Si el valor es menor de 0.8 o mayor de 1.2 se considerará que se produce una supresión o un

RESULTADOS Y DISCUSION

incremento de la señal analítica, respectivamente. Se observa que existe un elevado efecto matriz para la mayoría de los compuestos evaluados, excepto para la enniatina A1 y la aflatoxina B1. Este efecto matriz produce una disminución de la señal para todos los compuestos, excepto para la beauvericina, enniatina A y aflatoxina G2, para los cuales aumenta.

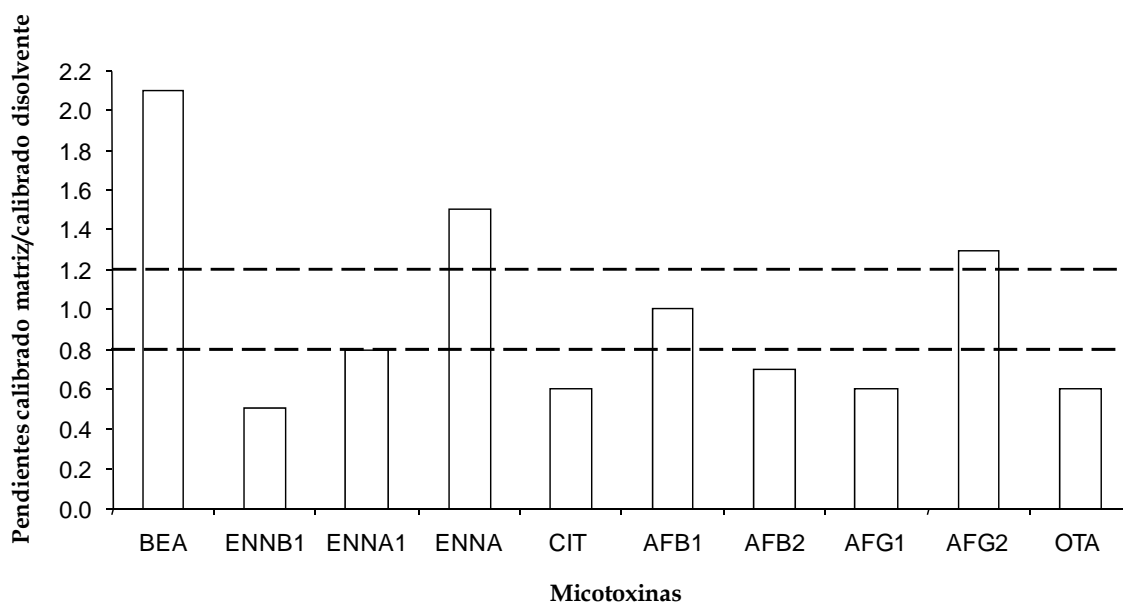


Figura 14. Relación entre las pendientes de las rectas de calibrado en extracto de huevo y en disolvente para las micotoxinas estudiadas.

Abreviaturas: AFB1: Aflatoxina B1; AFB2: Aflatoxina B2; AFG1: Aflatoxina G1; AFG2: Aflatoxina G2; BEA: Beauvericina; CIT: Citrinina; ENNA: Enniatina A; ENNA1: Enniatina A1; ENNB1: Enniatina B1; OTA: Ocratoxina A.

Una vez demostrada la existencia de efecto matriz, la linealidad del método se evaluó empleando rectas de calibrado en matriz. El rango de alineación varió entre 1 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para las aflatoxinas G1, B2 y B1, entre 2 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la aflatoxina G2 y la beauvericina, entre 5 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la enniatina B1 y A1 y entre 10 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la citrinina, ocratoxina A y enniatina A. Los coeficientes de determinación (R^2) fueron superiores a 0.99 para todos los compuestos.

RESULTADOS Y DISCUSION

La veracidad se evaluó a partir de las recuperaciones obtenidas a partir de muestras de huevo fortificadas a cuatro niveles de concentración: 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (cinco réplicas por nivel). Las recuperaciones que se obtuvieron para el método optimizado (Tabla 2) estaban comprendidas entre 70 y 110 % para todas las micotoxinas estudiadas y niveles evaluados, excepto para la ocratoxina A a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para la que se obtuvo un valor de recuperación del 63.3%, aflatoxina G1 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, con un valor de recuperación del 65.1% y aflatoxina G2 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, con un valor de recuperación del 114.2%. Por tanto, se obtuvieron buenas recuperaciones con el método desarrollado, lo que indica que el método de extracción propuesto es idóneo para la extracción simultánea de varios tipos de micotoxinas en huevo.

La repetibilidad se estudió a los mismos niveles que los estudios de recuperación, mostrando los resultados obtenidos como valores de desviación estándar relativa (RSD). El método mostró buena repetibilidad ($\text{RSD} < 20\%$) para todos los analitos analizados a excepción de la ocratoxina A a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (20.2%), enniatina A1 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (21.4 y 20.1% respectivamente) y citrinina a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (24.5%) (Tabla 2).

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de cinco muestras de huevo fortificadas a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los valores de RSD fueron inferiores al 25 % para todos los compuestos (Tabla 2), indicando la estabilidad del método propuesto.

Los LODs y LOQs se evaluaron como se ha indicado previamente (Sección 8). Los valores de LOD oscilaron entre 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (aflatoxina G1, B2 y B1) y 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (citrinina, ocratoxina A y enniatina A). Los valores de LOQ oscilaron entre 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (aflatoxina G1, B2 y B1) y 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (citrinina, ocratoxina A y enniatina A) (Tabla 2).

Por último, la selectividad del método se evaluó mediante el análisis de blancos de control de muestras. La ausencia de señales al mismo tiempo de retención que los compuestos seleccionados indicaron que no había interferencias de la matriz que pudieran dar un falso positivo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para comprobar la viabilidad del método propuesto, se compararon los parámetros de validación con los obtenidos por otras metodologías [42,50], observándose que éstos últimos muestran valores de LOQ ligeramente superiores, aunque los valores de recuperación fueron similares o, en algún caso, mejores. Esto puede ser debido a que los otros métodos se centraban en el análisis de una sola clase de micotoxina, como la beauvericina y enniatinas [42] o utilizaban procedimientos de extracción más largos, donde se requería una etapa de limpieza [50].

Tabla 2. Resultados de la validación del método propuesto.

Compuesto	Recuperación ^a				Precisión intermedia ^b	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$			
Aflatoxina G2	80.5 (14.7)	89.3 (11.4)	114.2 (9.3)	84.6 (6.2)	24.7	1.0	2.0
Aflatoxina G1	65.1 (18.4)	77.2 (15.0)	77.0 (10.9)	72.9 (8.5)	20.2	0.5	1.0
Aflatoxina B2	79.2 (15.1)	70.3 (10.6)	74.7 (9.4)	73.1 (7.8)	12.3	0.5	1.0
Citrinina	85.6 (24.5)	94.0 (16.3)	70.0 (14.9)	83.2 (12.5)	22.5	5.0	10.0
Aflatoxina B1	76.5 (18.6)	78.9 (16.8)	78.2 (11.1)	99.7 (9.3)	15.8	0.5	1.0
Ocratoxina A	63.3 (20.2)	102.8 (11.6)	109.8 (10.4)	93.4 (5.3)	15.6	5.0	10.0
Beauvericina	79.6 (18.6)	90.9 (9.6)	109.7 (7.5)	101.7 (7.1)	17.2	1.0	2.0
Enniatina B1	83.0 (18.7)	73.2 (15.4)	72.5 (11.1)	78.3 (10.3)	12.9	2.0	5.0
Enniatina A1	103.4 (21.4)	87.9 (20.1)	75.1 (15.1)	74.4 (13.1)	22.4	2.0	5.0
Enniatina A	101.2 (17.1)	93.4 (14.9)	75.4 (9.0)	101.6 (11.3)	20.9	5.0	10.0

^a Repetibilidad, expresada en valores de RSD, entre paréntesis (n = 5).

^b Valores de RSD obtenidos a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n = 5)

RESULTADOS Y DISCUSION

12. Análisis de muestras reales

El método validado fue aplicado al análisis de 7 muestras reales adquiridas en diferentes supermercados locales. Todas las muestras fueron extraídas mediante el método de extracción optimizado. En el análisis de muestras se aplicó un control de calidad interno (CCI) con el fin de evitar errores y asegurar la calidad de los resultados. Este CCI consistió en el análisis de: un blanco del extracto de huevo, para eliminar falsos positivos debidos a una contaminación en el proceso de extracción o para detectar posibles interferencias, un blanco reactivo (obtenido tras realizar el proceso de extracción completo sin muestra) para eliminar falsos positivos debidos a la contaminación de los instrumentos o los reactivos utilizados, un blanco de huevo fortificado a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para evaluar la eficiencia de la extracción y una recta de calibrado en matriz, para verificar la linealidad y la sensibilidad del método. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos tras analizar las muestras de huevo.

Tabla 3. Micotoxinas detectadas en las muestras de huevo.

Micotoxina	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
AFG2					$< 2 \mu\text{g kg}^{-1}$
AFG1	$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$		
AFB2			$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	
AFB1				$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	
BEA	$< 2 \mu\text{g kg}^{-1}$				

RESULTADOS Y DISCUSION

Se puede indicar que no se detectaron micotoxinas en dos muestras, mientras que en cinco de ellas se detectaron a niveles traza (<LOQ). La aflatoxina G1 fue detectada en tres muestras, la aflatoxina B2 en dos muestras y la aflatoxina G2, la aflatoxina B1 y la beauvericina fueron detectadas en una muestra (Tabla 3). La detección de la beauvericina y las aflatoxinas en una misma muestra indica que el método utilizado es adecuado para la determinación de micotoxinas pertenecientes a distintas familias.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

A continuación se destacan las principales conclusiones derivadas del presente Trabajo Fin de Máster:

1. Se ha desarrollado un método multi-micotoxina y multi-clase de 6.5 minutos simple y sensible para la determinación simultánea de 10 micotoxinas en huevo mediante UHPLC-MS/MS.
2. El método QuEChERS tamponado con ácido acético resultó el óptimo para la extracción de micotoxinas en huevo.
3. El uso de UHPLC-QqQ-MS/MS mejora la sensibilidad y resolución, detectando y cuantificando satisfactoriamente diferentes clases de micotoxinas a bajos niveles de concentración.
4. El método propuesto mostró buenos parámetros de validación, incluida la veracidad, repetibilidad, precisión intermedia, LOD y LOQ.
5. El método optimizado ha sido aplicado al análisis de 7 muestras reales con resultados satisfactorios.
6. La simplicidad de la etapa de tratamiento de muestra, la rapidez en la determinación y la elevada sensibilidad proporcionada por el método propuesto hacen que dicha metodología pueda ser usada en análisis de rutina para la detección y cuantificación de micotoxinas en muestras de huevo.

PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

VI. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Una vez concluido el trabajo, las ideas para la continuación del mismo son:

- ❖ Ampliar el número de muestras para así obtener unos resultados más representativos.
- ❖ Incluir la zearalenona y el deoxinivalenol, ya que son otras micotoxinas que presentan cierta potencialidad de ser transferidas al huevo.
- ❖ Trabajar en la mejora del método de extracción con el fin de aumentar el número de compuestos que pueden ser determinados en un mismo análisis.
- ❖ Aplicar el método desarrollado a otras matrices alimentarias de origen animal, como son carne de pollo y de cerdo y queso.

REFERENCIAS

VII. REFERENCIAS

-
- [1] L. Decastelli, J. Lai, M. Gramaglia, A. Monaco, C. Nachtmann, F. Oldano, M. Ruffier, *Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004-2005*, Food Control 18 (2007) 1263-1266.
- [2] M.L. Abarca, M. R. Bragulat, G. Castellá, F. Accensi, F. J. Cabañes, *Hongos productores de micotoxinas emergentes*, Revista Iberoamericana de Micología 17 (2000) 63-68.
- [3] M. J. Sweeney, A. D. W. Dobson, *Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species (Review)*, International Journal of Food Microbiology 43 (1998) 141-158.
- [4] D. Herebian, S. Zühike, M. Lamshöft, M. Spiteller, *Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap*, Journal of Separation Science 32 (2009) 939-948.
- [5] P. Zöllner, B. J. Mayer-Helm, *Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1136 (2006) 123-169.
- [6] Y. Ren, Y. Zhang, S. Shao, Z. Cai, L. Feng, H. Pan, Z. Wang, *Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1143 (2007) 48-64.
- [7] L. Carrillo. *Micotoxinas*. 2003. Microbiología Agrícola. Capítulo 6. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf> (Último acceso: 20-05-2011)
- [8] A. Yannikuoris, J.P. Jouany, *Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review*, Animal Research 51 (2002) 81-99.

REFERENCIAS

- [9] M. Mukanga, J. Derera, P. Tongoona, M. D. Laing, *A survey of pre-harvest ear rot diseases of maize and associated mycotoxins in south and central Zambia*, *International Journal of Food Microbiology* 141 (2010) 213-221.
- [10] Estudio FAO sobre alimentación y nutrición. 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.
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y1390S/y1390S00.pdf> (Último acceso 30-05-2011)
- [11] C. Lanier, E. Richard, N. Heutte, R. Picquet, V. Bouchart, D. Garon, *Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oilseeds cakes in agricultural environment*, *Atmospheric Environment* 44 (2010) 1980-1986.
- [12] J. P. Jouany, *Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds*, *Animal Feed Science and Technology* 137 (2007) 342-362.
- [13] V. Sanchís, S. Marín, A. J. Ramos, *Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual*, *Revista Iberoamericana de Micología* 17 (2000) 69-75.
- [14] N. W. Turner, S. Subrahmanyam, S. A. Piletsky, *Analytical methods for determination of mycotoxins: A review*, *Analytica Chimica Acta* 632 (2009) 168-180.
- [15] <http://www.foodtech-international.com/papers/mycotoxins.htm> (Último acceso 16-05-2011)
- [16] S. Hussein-Hussein, M. Jeffrey-Brasel, *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*, *Toxicology* 167 (2001) 101-134.
- [17] J. Gilbert, *Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs*, *Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 468-486.
- [18] K. H. Kilburn, *Towards healthy homes*, *Toxicology and Industrial Health* 25 (2009) 737-740.
- [19] C. Cavaliere, P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi, A. Laganà, *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry confirmatory method for determination aflatoxina M1 in cow milk. Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources*, *Journal of Chromatography A* 1101 (2006) 69-78.

REFERENCIAS

- [20] D. Nilufer, and D. Boyacioglu, *Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini*, Journal Agricultural and Food Chemistry 50 (2002) 3375-3379.
- [21] A. M. Cheraghali, H. Yazdanpanah, N. Doraki, G. Abouhossain, M. Hassibi, S. Ali-abadi, M. Aliakbarpoor, M. Amirahmadi, A. Askarian, N. Fallah, T. Hashemi, M. Jalali, N. Kalantari, E. Khodadadi, B. Maddah, R. Mohit, M. Mohseny, Z. Phaghihy, A. Rahmani, L. Setoodeh, E. Soleimany and F. Zamanian, *Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts*, Food Chemistry Toxicology 45 (2007) 812-816.
- [22] M. O. Moss, *Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs*, International Biodeterioration & Biodegradation 50 (2002) 137-142.
- [23] N. H.S. Ammidaa, L. Micheli and G. Palleschi, *Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley*, Analytica Chimica Acta 520 (2004) 159-164.
- [24] M. Sharma, C. Márquez, *Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC*, Animal Feed Science and Technology 93 (2001) 109-114.
- [25] E. El Golli-Bennour, B. Kouidhi, A. Bouslimi, S. Abid-Essefi, W. Hassen, H. Bacha, *Cytotoxicity and genotoxicity induced by aflatoxin B1, ochratoxin A and their combination in cultured vero cells*, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 24 (2010) 42-50.
- [26] E. M. Binder, *Managing the risk of mycotoxins in modern feed production*, Animal Feed Science and Technology 133 (2007) 149-166.
- [27] S. M. Herzallah, *Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors*, Food Chemistry 114 (2009) 1141-1146.
- [28] International Agency for Research on Cancer, IARC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some naturally occurring substances:*

REFERENCIAS

Food Items and constituents, Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC Scientific Publications 56 (1993) 397-444.

[29] P. Krogh, *Role of ochratoxin in disease causation*, Food and Chemical Toxicology 30 (1992) 213-224.

[30] A. Mally, G. C. Hard, W. Decant, *Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats*, Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2254-2260.

[31] R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, M. M. Aguilera Luiz, *Determination of ochratoxin A and T-2 toxin in alcoholic beverages by hollow fiber liquid phase microextraction and ultra high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, Talanta 82 (2010) 171-176.

[32] A. E. Pohland, *Mycotoxins in review*, Food Additives and Contaminants 10 (1993) 17-28.

[33] T. Kuiper-Goodman, P. M. Scott, *Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A*, Biomedical and Environmental Science 2 (1989) 179-248.

[34] J. Varga, E. Kevei, E. Rinyu, J. Teren, Z. Kozakiewicz, *Ochratoxin A production by Aspergillus species*, Applied and Environmental Microbiology 62 (1996) 4461-4464.

[35] B. Xu, X. Jia, L. Gu, Ch. Sung, *Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin*, Food Control 17 (2006) 271-285.

[36] T. Vrabcheva, E. Usleber, R. Dietrich, E. Martlbauer, *Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (2000) 2483-2488.

[37] E. K. Tangni, L. Pussemier, *Ochratoxin A and citrinin loads in stored wheat grains: Impact of grain dust and possible prediction using ergosterol measurement*, Food Additives and Contaminants 23 (2006) 181-189.

[38] M. Yegani, S. R. Chowdhury, N. Oinas, E. J. MacDonald, T. K. Smith, *Effects of feeding grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on brain regional*

REFERENCIAS

- neurochemistry of laying hens, turkey poults, and broiler breeder hens*, Poultry Science 85 (2006) 2117-2123.
- [39] I. Kralj Cigic, H. Prosen, *An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins*, International Journal of Molecular Sciences 10 (2009) 62-115.
- [40] A. Logrieco, A. Rizzo, R. Ferracane, A. Ritieni, *Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by Fusarium avenaceum head blight*, Applied and Environmental Microbiology 68 (2002) 82-85.
- [41] U. Thrane, A. Adler, P. Clasen, F. Galvano, W. Langseth, H. Lew, *Diversity in metabolite production by Fusarium langsethiae, Fusarium poae and Fusarium sporotrichioides*, International Journal of Food Microbiology 62 (2004) 257-266.
- [42] M. Jestoi, M. Rokka, E. Jävenpää, K. Peltonen, *Determination of Fusarium mycotoxins beauvericin and enniatins (A, A1, B, B1) in eggs of laying hens using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*, Food Chemistry 115 (2009) 1120-1127.
- [43] M. Jestoi, *Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins and moniliformin. A review*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48 (2008) 21-49.
- [44] L. Mortier, A. C. Huet, E. Daeseleire, G. Huyghebaert, T. Fodey, C. Elliott, *Deposition and depletion of five anticoccidials in eggs*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 7142-7149.
- [45] M. Rokka, S. Eerola, U. Perttilä, L. Rossow, E. Venäläinen, E. Valkonen, *The residue levels of narasin in eggs of laying hens fed with unmedicated and medicated feed*, Molecular Nutrition and Food Research 49 (2005) 38-42.
- [46] J. C. H. van Eijkeren, M. J. Zeilmaker, C. A. Kan, W. A. traag, L. A. P. Hoogenboom, *A toxicokinetic model for the carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs*, Food Additives and Contaminants 23 (2006) 509-517.
- [47] Real Decreto 475/1988, de 13 de mayo, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para el consumo humano. (BOE núm 121). (Disponible en:

REFERENCIAS

http://www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos/doc.php?id=BOE-A-1988-12368)

[48] Reglamento de la Comisión (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, Diario Oficial de la Unión Europea (DO L 364/5 20.12.2006, p.5) (Versión Consolidada disponible en:

<http://eurlex.europa.eu/Notice.do?val=400559:cs&lang=es&list=400226:cs,400559:cs&pos=2&page=1&nbl=2&pgs=10&hwords=>)

[49] Z. Sypecka, M. Kelly, P. Brereton, *Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: Effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 5463-5471.

[50] E. K. Tangni, N. Waegeneers, I. van Overmeire, L. Goeyens, L. Pussemier, *Mycotoxin analyses in some home produced eggs in Belgium reveal small contribution to the total daily intake*, Science of Total Environment 407 (2009) 4411-4418.

[51] http://www.foodcomp.dk/v7/fcdb_default.asp (Último acceso 17-05-2011)

[52] H. Valenta, S. Dänicke, *Study on the transmission of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol into eggs of laying hens using a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity columns*, Molecular Nutrition & Food Research 49 (2005) 779-785.

[53] K. Ridgway, S. P.D. Lalljie, R. M. Smith, *Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods (review)*, Journal of Chromatography A 1153 (2007) 36-53.

[54] R. Cela, R. A. Lorenzo, M. del Carmen Casais, *Técnicas de adsorción y absorción en la preparación de muestras. Extracción y microextracción en fase sólida, Capítulo 16, Técnicas de separación en Química analítica*, Editorial SINTESIS 2002.

[55] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive*

REFERENCIAS

solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, Journal of AOAC International 86 (2003) 412-431.

[56] I. Sospedra, J. Blesa, J.M. Soriano, J. Mañes, *Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour*, Journal of Chromatography A 1217 (2010) 1437-1440.

[57] R. R. Rasmussen, I. M. L. D. Storm, P. H. Rasmussen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, *Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 397 (2010) 765-776.

[58] T. Dong Nguyen, M. Young Yun, G.-Ho Lee, *A multiresidue method for the determination of 118 pesticides in vegetable juice by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Journal Agricultural Food Chemistry 57 (2009) 10095-10101.

[59] A. Garrido-Frenich, J. L. Martínez Vidal, R. Romero-Gonzalez, M. M. Aguilera Luiz, *Simple and high-throughput method for the multimycotoxins analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Food Chemistry 117 (2009) 705-712.

[60] A. Aresta, R. Vatinno, F. Palmisano, C. G. Zambonin, *Determination of Ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection*, Journal of Chromatography A 1115 (2006) 196-201.

[61] C. M Maragos, M. Appell, V. Lippolis, A. Visconti, L. Catucci, M. Pascale, *Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins*, Food Additives and Contaminants, 25 (2008) 164-171.

[62] M. Petrovic, M. Gros, D. Barceló, *Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1124 (2006) 68-81.

[63] K. Zhang, J. W. Wong, D. G. Hayward, P. Sheladia, A. J. Krynitsky, F. J. Schenck, M. G. Webster, J. A. Ammann, S. E. Ebeler, *Multiresidue Pesticide Analysis of Wines by Dispersive Solid-Phase Extraction and Ultrahigh-Performance*

REFERENCIAS

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (2009) 4019-4029.

[64] E. Beltrán, M. Ibáñez, J. Vicente Sancho, F. Hernández, *Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 23 (2009) 1801-1809.

[65] R. Köppen, M. Koch, D. Siegel, S. Merkel, R. Maul, I. Nehls, *Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations*, Applied Microbiology and Biotechnology 86 (2010) 1595-1612.

[66] F. G. Kitson, B. S. Larsen, C. N. McEwen, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, Elsevier 1996, ACADEMIC.

[67] M. Sulyok, R. Krska, R. Schuhmacher, *Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds*, Food Chemistry 119 (2010) 408-416.

[68] R. R. Rasmussen, I. M. L. D. Storm, P. H. Rasmussen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, *Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 397 (2010) 765-776.

[69] J. L. Sorensen, K. F. Nielsen, P. H. Rasmussen, U. Thrane, *Development of a LC-MS/MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (2008) 10439-10443.

[70] M. Sulyok, R. Krska, R. Schuhmacher, *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 (2007) 1505-15023.