

# Trabajo Fin de Grado

## Facultad de Ciencias Experimentales



Grado en Química

**Determinación de aflatoxinas en pimentón mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem.**

**Determination of aflatoxins in paprika by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.**

Antonio Jesús Maldonado Reina  
*Curso académico 2018-2019*  
*Septiembre de 2019*

*Tutor/es*  
*Dr. Roberto Romero González*  
*Departamento de Química y Física*  
*D<sup>a</sup>. Rosalía López Ruiz*  
*Departamento de Química y Física*



**Determinación de aflatoxinas en pimentón mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem**

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por  
Antonio Jesús Maldonado Reina

Almería, 9 de septiembre de 2019

Fdo: Antonio Jesús Maldonado Reina



Fdo: Roberto Romero González

Fdo: Rosalía López Ruiz



*El tiempo es el mejor evaluador del trabajo científico, y soy consciente de que un descubrimiento industrial rara vez produce todos sus frutos en manos de su primer inventor.*

Louis Pasteur

### **Agradecimientos**

Quisiera agradecer en primer lugar a mis tutores, Roberto y Rosalía, por su amabilidad, profesionalidad y por la ayuda que me han brindado en la realización de este trabajo, así como al grupo de investigación “Química Analítica de Contaminantes” y a la Universidad de Almería por mi formación académica.

Dar las gracias especialmente a mi madre, mi hermano y mis abuelos Carmen y Luis, ya que sin su inestimable apoyo no podría haber llegado hasta aquí.

Gracias por tanto.



**MEMORIA**





## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	3
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN .....	5
3.1. MICOTOXINAS .....	5
3.1.1. Aflatoxinas.....	6
3.1.2. Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas .....	7
3.1.3. Legislación aplicable .....	10
3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	11
3.2.1. Método de extracción.....	11
3.2.2. Técnicas cromatográficas .....	12
3.2.3. Espectrometría de masas.....	14
4. OBJETIVOS .....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
5.1. PATRONES, REACTIVOS Y MATERIALES .....	17
5.2. EQUIPOS.....	17
5.3. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS .....	18
5.3.1. Método de extracción.....	18
5.3.2. Análisis mediante LC-MS .....	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	20
6.1.1 Estudio de la influencia de la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) y de la extracción en fase sólida (SPE).....	21
6.1.2 Estudio de la influencia de la dilución.....	22
6.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO A OTRAS ESPECIAS: CÚRCUMA.....	25
6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	27
6.3.1 Linealidad .....	27
6.3.2 Efecto matriz.....	29
6.3.3 Veracidad .....	29
6.3.4 Precisión.....	30
6.3.5 Límite de detección y cuantificación.....	31
6.3.6 Análisis de muestras reales .....	32
7. CONCLUSIONES .....	32
8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS .....	34
9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	37



## **1. RESUMEN**

En el presente trabajo se ha desarrollado y validado un método analítico para el análisis de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en pimentón mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS). La extracción se llevó a cabo aplicando la metodología QuEChERS, y una posterior dilución del extracto (1:4 v/v). La determinación analítica se realizó empleando una fuente de ionización de tipo electronebulización que opera en modo positivo. El coeficiente de determinación fue siempre superior a 0,99. El efecto matriz varió desde -2 % a +17 % para los analitos objeto de estudio. Las recuperaciones intradía e interdía variaron desde 74 % a 88 %. La precisión, tanto intradía como interdía, abarcó valores desde 7 % a 19 %. Los resultados demostraron que este método podría ser válido para la determinación en rutina de aflatoxinas en muestras de pimentón.

**Palabras clave:** *UHPLC, pimentón, aflatoxinas, MS/MS, QuEChERS.*

## **2. ABSTRACT**

In this study, an analytical method has been developed to analyse aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in paprika by ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry (UHPLC-QqQ-MS/MS). Extraction was carried out using QuEChERS methodology and then, the extract was diluted (1:4 v/v). Analytical determination was performed using an electrospray ionization source operating in positive mode. The coefficient of determination was always higher than 0.99 for all the analytes studied. Matrix effects ranged from -2 % to +17 %. Intraday and interday recoveries varied from 74 % to 88 %. Precision, both intraday and interday, ranged from 7 % to 19%. The results demonstrated that this method could be suitable for routine determination of aflatoxins in paprika samples.

**Keywords:** *UHPLC, paprika, aflatoxins, MS/MS, QuEChERS.*



### 3. INTRODUCCIÓN

Durante siglos, las hierbas aromáticas y especias han sido utilizadas como aditivos y conservantes en alimentos, debido a sus potentes propiedades organolépticas, como su olor, sabor, o color. Estas han tenido un papel fundamental en las relaciones políticas y económicas entre las diferentes sociedades a lo largo de la historia. En este sentido destaca el papel de los pueblos orientales como principales proveedores de especias a través de relaciones comerciales con comerciantes occidentales. Buen ejemplo de la importancia de las especias a nivel geopolítico es la batalla por el control de éstas. Este fue un factor clave en la expansión del colonialismo europeo en Asia, y desencadenó el desarrollo de tecnologías marítimas.<sup>1</sup>

En la actualidad, las especias siguen teniendo gran relevancia, y no solo se emplean en la industria alimentaria, sino también en cosmética y herbología, debido a sus propiedades antioxidantes y microbianas.<sup>2</sup> Gracias a éstas, su consumo en la Unión Europea (EU, *European Union*) ha aumentado un 1,7 % cada año en el periodo comprendido entre 2010 y 2013. Se ha registrado un consumo total de 385.000 toneladas solo en el año 2012, procediendo la mayoría de las importaciones de China.<sup>3</sup>

Una de las especias más típicas de la gastronomía española es el pimentón, un polvo rojizo obtenido del secado y molienda de ciertos tipos de pimientos rojos. Este es la base de la economía de diversas regiones, siendo muy demandado por los consumidores españoles.

Sin embargo, al igual que el resto de alimentos, y como consecuencia de su procesado, las especias no están exentas de presentar contaminantes o sustancias tóxicas que pueden representar un peligro para la salud de los consumidores.

Entre dichos contaminantes y sustancias tóxicas podemos encontrar no solo metales pesados tales como cadmio y plomo,<sup>4</sup> sino compuestos orgánicos procedentes de la actividad microbiológica, tales como las micotoxinas, sobre las que nos centraremos en este trabajo.<sup>5</sup>

#### 3.1. MICOTOXINAS

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*) las micotoxinas se definen como metabolitos fúngicos secundarios tóxicos pertenecientes esencialmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.<sup>6</sup> Los efectos perjudiciales de las micotoxinas en el ser humano se conocen desde hace siglos. Los primeros casos de micotoxicosis en ser documentados datan de la Edad Media, en la que ocurrían con frecuencia brotes de ergotismo causados por el hongo *Claviceps purpurea*, que provocaron la muerte y mutilación de extremidades de miles de personas en Europa. El contacto con dichas micotoxinas tenía lugar a través de la ingesta de pan preparado con granos de trigo y centeno contaminados. Las víctimas de ergotismo se vieron expuestas a dietilamida de ácido lisérgico (LSD, *lysergic acid diethylamide*) que les provocaba alucinaciones.<sup>7</sup>

A pesar del avance en materia de seguridad alimentaria, actualmente se siguen describiendo casos de micotoxicosis alrededor del mundo,<sup>8</sup> principalmente en zonas subdesarrolladas, en las que no hay establecido un estricto control sanitario de cultivos.

Se pueden distinguir diferentes tipos de micotoxinas, resumidas en la **Tabla 1**.<sup>9</sup>

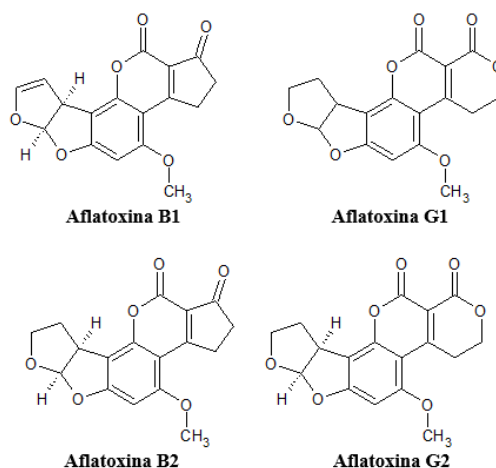
**Tabla 1.** Tipos de micotoxinas y hongos productores.

Micotoxina	Hongos productores
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i>
Ocratoxinas	<i>Aspergillus, Fusarium</i>
Tricotecenos	<i>Fusarium</i>
Zearalenona	<i>Fusarium</i>
Fumonisinias	<i>Fusarium</i>
Moniliformina	<i>Fusarium</i>
Patulina	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
Alcaloides ergóticos	<i>C. purpurea, Penicillium</i>

### 3.1.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AFs, *aflatoxins*) son un tipo muy común de micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, tales como *A. flavus* y *A. Parasiticus*. Las aflatoxinas se originan principalmente en alimentos almacenados, tales como arroz, cacahuets o pistachos, en regiones tropicales con alta humedad y temperatura, que dan lugar a la proliferación de dichos hongos.<sup>10</sup> Como consecuencia de su estabilidad y resistencia a altas temperaturas, son difíciles de eliminar durante la preparación de los alimentos. Williams *et al.*<sup>11</sup> han estimado que 4,5 billones de personas se hallan expuestas a las aflatoxinas. Las aflatoxinas presentes naturalmente son las AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, representadas en la **Figura 1**. Otros tipos de aflatoxinas se producen por modificación química de estas, tales como las AFM1 y AFM2, generadas por la hidroxilación de AFB1 y AFB2 respectivamente, y que se hallan en productos lácteos.<sup>12</sup>

Debido a su frecuente presencia y a su toxicidad, este tipo de micotoxinas han sido muy estudiadas desde el punto de vista médico, demostrando ser potentes agentes cancerígenos. La aflatoxina más tóxica es la AFB1, con una elevada teratogenicidad y capacidad inmunosupresora. Del mismo modo, ciertos estudios han relacionado la ingesta de AFB1 por portadores del virus de la Hepatitis B (HBV, *Hepatitis B virus*) con una mayor tasa de incidencia de desarrollar carcinoma hepatocelular. De acuerdo con estos estudios, se produce una interacción sinérgica entre la aflatoxina B1 y el VHB que proporciona un efecto carcinogénico mayor que los dos agentes por separado.<sup>13</sup>

**Figura 1.** Estructuras de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

En términos económicos, las aflatoxinas suponen un elevado coste, ya que se calcula que un 25% de las cosechas mundiales son destruidas cada año debido a la presencia de aflatoxinas.<sup>14</sup>

El pimentón, debido a su elaboración, que implica un proceso de secado, es más propenso a presentar contaminación por aflatoxinas que otras especias que no requieren dicho proceso.<sup>15</sup> Sin embargo, dicha contaminación no solo se produce en la etapa de secado, sino que también puede ocurrir en cualquier otra etapa tal como la precosecha o el almacenamiento.<sup>16</sup> El crecimiento fúngico, y por tanto la contaminación, dependerá de diversos parámetros como la humedad, secado, temperatura y otras condiciones de procesado.<sup>17</sup>

### **3.1.2. Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas**

En las **Tablas 2 y 3** se recogen algunas propiedades físicas y químicas de las aflatoxinas estudiadas.<sup>18</sup>

Se puede comprobar que la mayoría de las propiedades físico-químicas de las aflatoxinas son muy similares entre sí, debido a su similitud estructural. Así, por ejemplo, la temperatura de fusión de las AFs B1, B2, G1 y G2 es de 268,0; 287,5; 245,0 y 238,5 °C respectivamente.

Las aflatoxinas no son estables en agua, por lo que para su almacenamiento se deben de preparar en un disolvente orgánico, como por ejemplo metanol, en el que sí son estables. Sin embargo, son estables en agua a corto plazo. La solubilidad de dichas aflatoxinas en agua a 25 °C es muy diversa.

Así, para las AFs B1 y B2, la solubilidad es de 16,14 y 24,9 mg/L respectivamente mientras que para las G1 y G2, esta es de 477 y 3730 mg/L respectivamente, siendo estos valores de solubilidad muy dispersos entre sí como puede observarse.

En estado sólido, todas las aflatoxinas se presentan como cristales incoloros, o bien amarillo pálido que emiten olor acre y humos, y poseen una presión de vapor muy reducida, del orden de los  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  mm Hg a 25 °C.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas B1 y B2.

Propiedad	AFB1	AFB2
<b>Nombre IUPAC</b>	(3 <i>S</i> ,7 <i>R</i> )-11-metoxi-6,8,19-trioxapentaciclo[10.7.0.0 <sup>2,9</sup> .0 <sup>3,7</sup> .0 <sup>13,17</sup> ]nonadeca-1,4,9,11,13(17)-penter-16,18-diona	(3 <i>S</i> ,7 <i>R</i> )-11-metoxi-6,8,19-trioxapentaciclo[10.7.0.0 <sup>2,9</sup> .0 <sup>3,7</sup> .0 <sup>13,17</sup> ]nonadeca-1,9,11,13(17)-tetraen-16,18-diona
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
<b>N.º CAS</b>	1162-65-8	7220-81-7
<b>Masa molecular</b>	312,27 g/mol	314,29 g/mol
<b>Masa exacta</b>	312,063388 g/mol	314,079038 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	268,0 °C	287,5 °C
<b>Aspecto</b>	Cristales incoloros o amarillo pálido en estado sólido	Cristales incoloros o amarillo pálido en estado sólido
<b>Presión de vapor</b>	2,65 x 10 <sup>-10</sup> mm Hg a 25 °C En agua, 16,14 mg/L a 25 °C	1,65 x 10 <sup>-10</sup> mm Hg a 25 °C En agua, 24,9 mg/L a 25 °C
<b>Solubilidad</b>		
<b>Descomposición</b>	Cuando se calienta a descomposición emite olor acre	Cuando se calienta a descomposición emite olor acre y humo
<b>Estabilidad</b>	No estable en agua. Estable en MeOH	No estable en agua. Estable en MeOH



**Tabla 3.** Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas G1 y G2.

<b>Propiedad</b>	<b>AFG1</b>	<b>AFG2</b>
<b>Nombre IUPAC</b>	11-metoxi-6,8,16,20-tetraoxapentaciclo[10.8.0.0 <sup>2,9</sup> .0 <sup>3,7</sup> .0 <sup>13,18</sup> ]icosa-1,4,9,11,13(18)-penten-17,19-diona	(3S,7R)-11-metoxi-6,8,16,20-tetraoxapentaciclo[10.8.0.0 <sup>2,9</sup> .0 <sup>3,7</sup> .0 <sup>13,18</sup> ]icosa-1,9,11,13(18)-tetraen-17,19-diona
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
<b>N.º CAS</b>	1402-68-2	7241-98-7
<b>Masa molecular</b>	328,27 g/mol	330,29 g/mol
<b>Masa exacta</b>	328,058303 g/mol	330,073953 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	245,0 °C	238,5 °C
<b>Aspecto</b>	Cristales incoloros o amarillo pálido en estado sólido	Cristales incoloros o amarillo pálido en estado sólido
<b>Presión de vapor</b>	5,86 x 10 <sup>-11</sup> mm Hg a 25 °C	7,68 x 10 <sup>-11</sup> mm Hg a 25 °C
<b>Solubilidad</b>	En agua, 477 mg/L a 25 °C	En agua, 3,73 x 10 <sup>3</sup> mg/L a 25 °C
<b>Descomposición</b>	Cuando se calienta a descomposición emite olor acre y humos irritantes	Cuando se calienta a descomposición emite olor acre y humos irritantes
<b>Estabilidad</b>	No estable en agua. Estable en MeOH	No estable en agua. Estable en MeOH

### 3.1.3. Legislación aplicable

Al igual que para el resto de contaminantes, la Comisión Europea (EC, *European Commission*) establece una concentración límite aplicable en el Espacio Económico Europeo (EEA, *European Economic Area*). La legislación europea (*REGLAMENTO (EC) 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)<sup>19</sup> prevé que la cuantificación de aflatoxinas se exprese de dos formas, y siempre en µg/kg. En primer lugar, como AFB1, y en segundo lugar, como suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. Para que un producto sea considerado como apto para el consumo, es necesario que éste cumpla con ambos límites excepto para el caso de los productos lácteos, en los que también se debe de indicar la concentración de AFM1.

Así, por ejemplo, para almendras, pistachos y huesos de albaricoque destinados al consumo humano directo o si se utilizan como ingredientes de productos alimenticios, se establece un máximo de 8,0 µg/kg de AFB1, y de 10,0 µg/kg para la suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. Para las especias del género pimiento (*Capsicum spp.*), entre las que se encuentra el pimentón, género Piper (*Piper spp.*), Nuez Moscada (*Myristica fragrans*), Jengibre (*Zingiber officinale*), Cúrcuma (*Curcuma longa*) y mezclas de especias que contengan una o varias de estas especias, el límite es de 5,0 µg/kg de AFB1 y 10,0 µg/kg suma de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.<sup>19</sup>

Los métodos de muestreo y análisis de micotoxinas se hallan recogidos en el *REGLAMENTO (EC) No 401/2006 DE LA COMISIÓN de 23 de febrero de 2006* por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.<sup>20</sup> Dicho reglamento permite emplear cualquier método analítico a elección del laboratorio, en tanto que éste se adecue a ciertos requisitos, tanto generales como específicos. De este modo, para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se establecen unos valores recomendados de recuperación en función del intervalo de concentración de la muestra. Así, para una concentración inferior a 1 µg/kg, es aconsejable que la recuperación se halle entre 50 y 120 %, entre 1 µg/kg y 10 µg/kg ésta debe de estar comprendida entre 70 y 110 %, y para niveles de concentración superiores a 10 µg/kg, los valores de recuperación deben de hallarse en el intervalo de 80 a 120 %.

De acuerdo con este reglamento, la precisión se expresa en función de la ecuación de Horwitz (ecuación 1), estableciéndose el máximo de desviación estándar relativa ( $RSD_R$ , *relative standard deviation*) a 2 veces el valor derivado de dicha ecuación. Es decir, la precisión experimental calculada debe de ser inferior a dos veces el valor obtenido mediante la ecuación de Horwitz.

$$RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)} \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde  $RSD_R$  es la desviación estándar relativa hallada a partir de resultados experimentales en condiciones de reproducibilidad, esto es,  $RSD_R (\%) = [(s_R/X)*100]$  y C es un cociente en función de la concentración de analito, e independiente de su naturaleza (a saber, 1 = 10g/10g, 0,0001 = 100 mg/kg), mientras que  $s_R$  es la desviación estándar y X el valor promedio de las medidas.

## 3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

### 3.2.1. Método de extracción

El primer paso para llevar a cabo cualquier método analítico es la extracción. Este proceso implica la transferencia del analito en estudio desde la muestra hasta el disolvente. El resto de la muestra, sin interés analítico se denomina matriz, de modo que se debe procurar que la extracción del analito sea lo más selectiva posible, intentando eliminar el mayor número de componentes de la matriz posibles. La extracción se debe llevar a cabo en disolventes en los que el analito en estudio sea soluble a la temperatura de trabajo, para asegurar una adecuada transferencia. Otros factores que definen la adecuación del disolvente al objetivo analítico son su coste, su toxicidad y su disponibilidad, entre otros. Sin embargo, como ya se ha comentado con anterioridad, las aflatoxinas no son estables en agua, por lo que hay que evitar que el disolvente de almacenamiento sea el agua, o mezclas de disolvente orgánico con agua. Sin embargo, es posible preparar muestras con un cierto porcentaje de agua para analizar en un corto período de tiempo, siempre que contengan un mínimo de un 20 % de disolvente orgánico.<sup>20</sup>

La mayoría de autores consultados, proponen la extracción de micotoxinas en especias a través del método QuEChERS, acrónimo inglés de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* (rápido, simple, barato, efectivo, robusto y seguro), debido a su simplicidad, bajo coste, rapidez y a los buenos resultados que proporciona.<sup>21,22</sup> Este método de extracción fue desarrollado por el químico germano-chipriota Michelangelo Anastassiades en el año 2003.<sup>23</sup> Aunque inicialmente fue concebido para análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas, su uso se ha extendido a otros muchos analitos, tales como las micotoxinas. El método QuEChERS ha supuesto por tanto una revolución en el campo de la Química Analítica, realizándose a día de hoy una gran cantidad de extracciones, no solo a nivel de investigación, sino a nivel de análisis de rutina. Esto ha permitido la extracción de un mayor número de analitos en menor tiempo, resultando todo ello en un menor coste económico de los análisis realizados.

En términos generales, el método QuEChERS consiste en la adición de 10 mL de acetonitrilo a 10 g de muestra. Tras agitar enérgicamente para producir la extracción, se adiciona 1 g de NaCl, 4 g MgSO<sub>4</sub>, o bien otras sales como citrato de trisodio dihidrato e hidrogenocitrato de sodio sesquihidrato, o bien acetato de amonio. Estas sales se emplean para regular el pH. La función del cloruro de sodio es aumentar la fuerza iónica del medio, lo que permite una extracción más eficiente. El sulfato de magnesio se emplea debido a su característica de agente higroscópico, que elimina el agua presente en el extracto. Posteriormente, tras una agitación enérgica, el extracto con las sales se centrifuga, y se recoge el sobrenadante. A este se le puede aplicar una etapa opcional de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (dSPE, *dispersive solid phase extraction*), con sorbentes como amina primaria secundaria (PSA, *primary secondary amine*) que retienen las interferencias de la matriz selectivamente. Se centrifuga de nuevo, y el extracto se puede inyectar directamente en los equipos de cromatografía.

Desde su desarrollo en 2003 se han implementado diferentes modificaciones para adecuar el método a los diferentes tipos de analitos y matrices de estudio. De este modo, cada autor presenta su propia versión del método QuEChERS, que ha sido validado para la determinación de una gran variedad de analitos. La EU ha adoptado una versión modificada del método QuEChERS que emplea como sales sulfato de magnesio, cloruro de sodio, citrato de trisodio dihidrato e hidrogenocitrato de sodio sesquihidrato, tras extracción con acetonitrilo y limpieza mediante dSPE. Esta es considerada como la

versión oficial, y de aplicación para la determinación de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*) y cromatografía de líquidos (LC, *liquid chromatography*). Esta metodología se encuentra reflejada en la norma UNE-EN 15662:2019.<sup>24</sup>

Para la extracción de micotoxinas en especias, entre las que se encuentra la AFB1, Reinholds *et al.*<sup>25</sup> proponen pesar  $2,0 \pm 0,1$  g de pimentón molido en un tubo de centrífuga de 50 mL, y adicionar 10 mL de agua desionizada, así como 10 mL de acetonitrilo. A continuación, se adiciona una mezcla de sales compuesta por 4 g de sulfato de magnesio, 1 g de cloruro de sodio, 0,5 g de citrato de trisodio dihidrato, y 1 g de hidrogenocitrato de sodio sesquihidrato. Tras agitación en vortex y agitador automático, se centrifuga 5 min a 4500 rpm. Se toman 8 mL de sobrenadante y se congelan a  $-80$  °C durante 30 min, seguido de una centrifugación de 5 min a 4500 rpm. Después, 3 mL del extracto se evaporan a sequedad y se reconstituyen en 500  $\mu$ L de agua/metanol (50:50 v/v). Finalmente, los extractos se filtran a través de filtros de polifluoruro de vinilideno (PVDF, *polyvinylidene fluoride*) de 0,22  $\mu$ m, y se llevan a un vial para su análisis. Con este método se obtuvo una recuperación del 95 % y una precisión, expresada como RSD (%), del 8 % para la AFB1, empleando cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS, *ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*).

Otro método de extracción de micotoxinas en pimentón, así como en otras especias, fue propuesto por Yogendrarajah *et al.*<sup>26</sup> En él se pesa  $1,00 \pm 0,05$  g de muestra molida en un tubo de extracción de 50 mL, y se adicionan 5 mL de agua, agitándose en vortex durante un minuto. La muestra hidratada se deja reposar durante 30 minutos. Posteriormente, se añaden 5 mL de acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1 % v/v), llevándose a cabo la extracción en un agitador vertical durante 20 minutos. Se adicionan 2 g de sulfato de magnesio y 0,50 g de cloruro de sodio, agitando manualmente para evitar la aglomeración de las sales. Los tubos se agitan en vortex durante un minuto, y se centrifugan a 5200 rpm durante 7 minutos. Finalmente, una alícuota del sobrenadante de acetonitrilo se centrifuga a 8300 rpm durante 3 minutos. Tras la filtración, una alícuota se transfiere a un vial para su posterior análisis LC-MS/MS. Los valores de recuperación abarcaron desde 79 % para AFB1, hasta 117 % para AFB2, mientras que la precisión, expresada como RSD (%), varió desde 7 % para AFB1 hasta 16 % para AFB2.

### 3.2.2. Técnicas cromatográficas

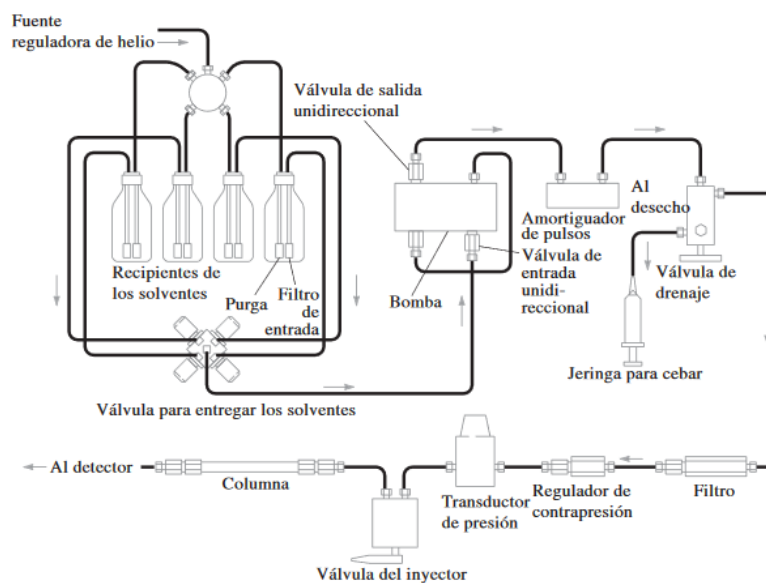
La cromatografía es, de acuerdo con de Blasio<sup>27</sup> un método físico de separación en el que los componentes que se desean separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria), mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida. Cuando la fase móvil se halla en estado líquido, se habla de LC, mientras que cuando ésta es un gas, se denomina GC.

Existen diversos tipos de técnicas cromatográficas, desde cromatografía en papel hasta cromatografía en columna, pasando por cromatografía en capa fina. Todas ellas se basan en el mismo principio de absorción-desorción de los compuestos de la muestra en la fase estacionaria, llevándose a cabo su separación debido a las diferencias entre las constantes de distribución entre la fase móvil y la estacionaria.<sup>28</sup> De este modo, las diferentes afinidades condicionan la velocidad de los compuestos a través de la columna; los más afines por la fase estacionaria (de polaridad similar) serán retenidos por ésta en mayor grado, por lo que serán los últimos en eluir, presentando un mayor

tiempo de retención. Por otro lado, los menos afines por la fase estacionaria eluirán antes, y se les atribuirá un tiempo de retención menor.

Con el paso de los años, la importancia de las técnicas LC ha aumentado considerablemente, hasta el punto de poder ser consideradas indispensables para el análisis de multitud de compuestos.<sup>29</sup> En la actualidad se ha extendido el uso de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) y UHPLC, representadas en la **Figura 2**, debido entre otras causas, a su versatilidad y capacidad de realizar separaciones satisfactorias de matrices complejas. La diferencia entre HPLC y UHPLC radica en el tamaño de partícula de la columna cromatográfica (inferior a 2  $\mu\text{m}$  para UHPLC).<sup>30</sup> En el caso de una columna UHPLC, dicho tamaño de partícula es menor que en una columna HPLC, por lo que se producirá una separación más eficaz y en menor tiempo de análisis, requiriéndose para ello un aumento de la presión que debe de ser compensado con bombas más potentes. En columnas UHPLC se trabaja por encima de 6000 psi, el límite de presión estándar para las columnas HPLC. Se pueden diferenciar dos modos de trabajo en LC:

- **Fase normal:** La fase estacionaria es polar (grupos ciano, diol, amino o dimetilamino). Está indicada para el análisis de compuestos polares, como los fosfolípidos.<sup>31</sup> Debido al carácter apolar de la fase móvil, los compuestos polares serán los últimos en eluir. Se encuentra en desuso debido a la baja reproducibilidad de los tiempos de retención como consecuencia de la hidratación de la fase estacionaria por los disolventes próticos.
- **Fase reversa:**<sup>32</sup> Es la más utilizada actualmente. La fase estacionaria es apolar (grupos C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub>), produciéndose interacciones hidrofóbicas entre las moléculas y la fase estacionaria. Los compuestos más polares eluyen primero debido a que relativamente son los más solubles en la fase móvil de carácter polar. Las columnas con grupos C<sub>18</sub> son las más usadas en varias aplicaciones. Esta modalidad está indicada para el análisis de compuestos apolares.



**Figura 2.** Esquema de un equipo HPLC o UHPLC<sup>33</sup>

En cuanto al modo de elución, e puede trabajar en modo isocrático, esto es, con una composición constante de la fase móvil, o en modo gradiente, con una variación de la composición de la fase móvil a lo largo tiempo de análisis.

### 3.2.3. Espectrometría de masas

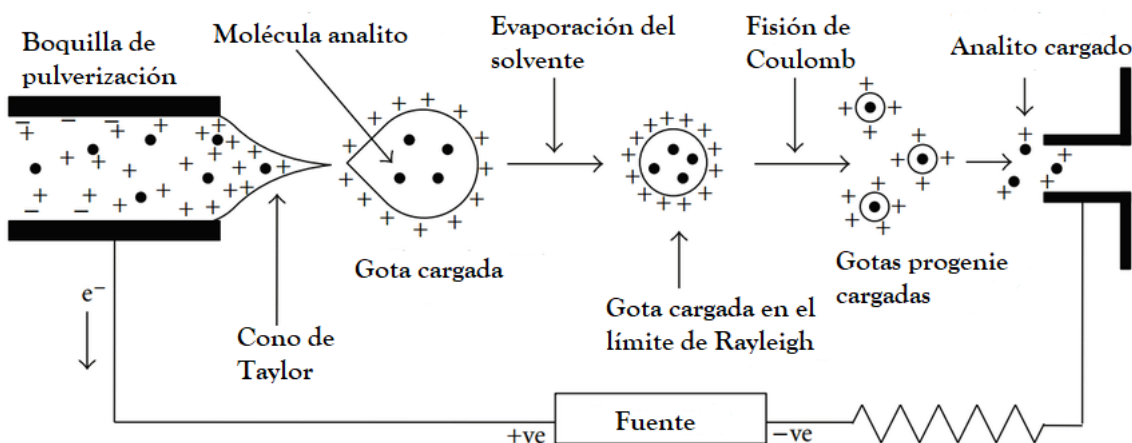
A pesar de que la LC proporciona separaciones excelentes, es necesario acoplar esta técnica de separación a otra técnica de detección que nos permita determinar los analitos. Una de las técnicas de detección por excelencia es la espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*).

En MS, las moléculas que entran se ionizan, adquiriendo cada ion formado una relación masa/carga ( $m/z$ ) característica, que permitirá distinguirlo de otros iones. Cada ion tiene asociada una abundancia, que queda registrada como un espectro de masas.

Los más comunes son el triple cuadrupolo (QqQ, *triple quadrupole*), y el tiempo de vuelo (ToF, *time of flight*). También se emplea cuadrupolo simple (Q, *single quadrupole*), que posee menor selectividad, estando todos ellos encuadrados en la espectrometría de masas de baja resolución (LRMS, *low resolution mass spectrometry*).

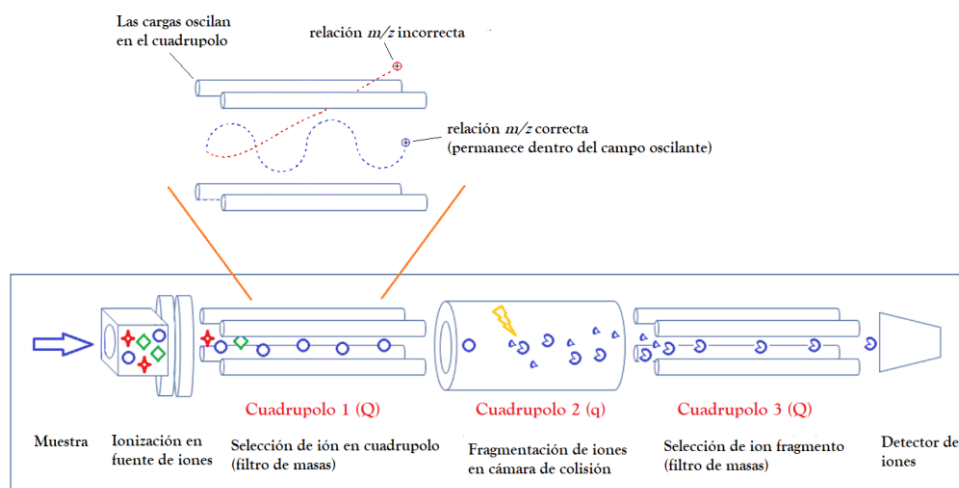
En un espectrómetro de masas podemos distinguir cuatro etapas: la primera de ellas consiste en la entrada de la muestra en el equipo, en la segunda se produce la ionización de los compuestos aplicando un voltaje, en la tercera se lleva a cabo la selección de iones, y en la última la detección de dichos iones.

En la primera parte ocurre la ionización de la muestra, empleándose mayoritariamente para la determinación de los compuestos objeto de estudio en este trabajo. En el presente trabajo se ha aplicado electronebulización (ESI, *electrospray*) en modo positivo. Esta ionización se lleva a cabo a presión atmosférica. Se hace pasar la muestra, que debe estar disuelta en un solvente conveniente, por un capilar de metal al que se le aplican 3 o 4 kV en su punta, originando un spray de gotas muy pequeñas (asistido o no con un gas auxiliar como helio o nitrógeno) cargando eléctricamente la solución. Esto provoca la formación de niebla de gotas cargadas eléctricamente en el cono de Taylor (**Figura 3**), dando lugar a un incremento de la densidad de carga como consecuencia de la evaporación del disolvente. Por tanto, los iones quedan desolvatados.<sup>34</sup> Dichos iones resultantes viajan hacia el sistema de cuadrupolos.



**Figura 3.** Esquema de la formación del electro spray<sup>35</sup>

Un cuadrupolo está formado por 4 barras magnéticas paralelas entre sí, y equidistantes de un punto central. En él se produce la selección de iones. En el caso de un QqQ, representado en la **Figura 4**, previamente a la entrada de la molécula en el tercer cuadrupolo tiene lugar su fragmentación en una celda de colisión para generar iones producto. Así, el primer y el tercer cuadrupolo actúan en modo monitorización de iones seleccionados (SIM, *Selected Ion Monitoring*), mientras que el segundo (q) funciona como una cámara de colisiones activadas, que fragmenta los iones precursores. En el primer y tercer cuadrupolo se aplica un cierto voltaje de tal modo que solo los iones con  $m/z$  deseada tendrán una trayectoria estable, mientras que los demás se desestabilizarán y no llegarán al próximo cuadrupolo o detector. Esto es lo que convierte a la espectrometría de masas en una técnica altamente selectiva. En el caso de que ocurran dos o más fragmentaciones, como en el caso del QqQ, se habla de espectrometría de masas en tándem, representada como MS/MS o de forma genérica  $MS^n$ , con  $n=2$  para QqQ. Una vez que se produzcan los fragmentos, se hacen llegar a un detector de iones para su cuantificación.



**Figura 4.** Proceso de fragmentación y selección de iones en triple cuadrupolo<sup>36</sup>

En la **Tabla 4** se recogen algunos de los métodos encontrados en bibliografía para la separación cromatográfica y detección de micotoxinas en especias, que incluyen pimentón, pimienta blanca, roja y negra, chile, cominos y canela. La mayor parte de los autores consultados proponen el análisis mediante UHPLC o HPLC acoplado a un QqQ. Asimismo, la mayoría de las columnas empleadas son del tipo C18, operando por tanto en modo fase reversa, y en modo gradiente, con tamaños de partícula variados, desde los 1,7 y 1,9  $\mu\text{m}$  para UHPLC, hasta 5  $\mu\text{m}$  para HPLC.

Respecto a las fases móviles, dichos autores proponen una diversidad de opciones en cuanto a disolventes y fases. Una de estas propuestas consiste en una fase A de agua con ácido fórmico al 0,1 % (v/v) y una fase B de MeOH, mientras que otro Yogendrarajah *et al.*<sup>26</sup> proponen que sendas fases A y B estén compuestas de metanol/agua en diferente proporción (20:80 v/v y 90:10 v/v, respectivamente) así como formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico al 0,1 % (v/v). Škrbić *et al.*<sup>37</sup> proponen utilizar una fase A, que está compuesta de agua:ácido acético 99:1 (v/v) con formiato de amonio 5 mM, y una fase B de metanol:agua 90:10 (v/v) formiato de amonio 5 mM y 0,1 % ácido fórmico (v/v). Los flujos difieren entre las 4 propuestas, abarcando desde los 0,3 mL/min hasta 1,0 mL/min.

**Tabla 4.** Diferentes métodos para la determinación de aflatoxinas en especias

<b>Técnica analítica</b>	<b>Matriz</b>	<b>Columna</b>	<b>Fase móvil, flujo de fase móvil</b>	<b>Flujo</b>	<b>Referencia</b>
UHPLC-QqQ-MS/MS	Pimentón	Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: Agua 0,1 % ácido fórmico (v/v) B: Metanol	0,4 mL/min	25
HPLC-MS/MS	Pimentón	Symmetry C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm)	A: Metanol:Agua 20:80 (v/v) con formiato de amonio 5 mM y 0,1 % ácido fórmico (v/v) B: Metanol:Agua 90:10 (v/v) formiato de amonio 5 mM y 0,1 % ácido fórmico (v/v)	0,3 mL/min	26
UHPLC-QqQ-MS/MS	Pimienta blanca, pimienta negra y pimienta roja	Hypersil GOLD (50 mm x 2,1 mm, 1,9 µm)	A: Agua:Ácido acético 99:1 (v/v) con formiato de amonio 5 mM B: Metanol:Ácido acético 99:1 (v/v) con formiato de amonio 5 mM	0,5 mL/min	37
HPLC-FD	Chile en polvo, copos de chile, pimienta negra, comino, canela	InertsilODS-3 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm.)	Agua:acetónitrilo:metanol 6:2:3 (v/v/v) con KI 0,12 g/L y HNO <sub>3</sub> 4M	1,0 mL/min	38

<sup>a</sup> Abreviaturas: FD: detector de fluorescencia; HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia; MS: espectrometría de masas; QqQ: triple cuadrupolo; UHPLC: cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia.



## 4. OBJETIVOS

Debido al gran consumo de especias en la actualidad, es necesario establecer un riguroso control sobre los contaminantes y sustancias tóxicas presentes en este tipo de matrices.

El objetivo que persigue el siguiente trabajo es el desarrollo y validación de un método de análisis para determinar aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en pimentón, mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS).

Para ello, se ha llevado a cabo la optimización de un método de extracción basado en la metodología QuEChERS y posteriormente, se ha procedido a la validación del método atendiendo a diversos parámetros tales como veracidad, linealidad, límites de detección y cuantificación, efecto matriz y precisión.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. PATRONES, REACTIVOS Y MATERIALES

Los patrones sólidos de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), con una pureza superior al 99,7 %. Se prepararon disoluciones patrón individuales de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en acetonitrilo con concentraciones de 86 mg/L, 80 mg/L, 88 mg/L y 80 mg/L respectivamente. A partir de estas disoluciones se prepararon tres disoluciones de trabajo de las cuatro aflatoxinas en acetonitrilo con los que se trabajó en este proyecto, con concentraciones de 10 mg/L, 1 mg/L y 0,25 mg/L. Se conservaron a 4 ° C.

Los reactivos sólidos empleados fueron sulfato de magnesio  $\geq 96$  % (Panreac Applichem, Darmstadt, Alemania), acetato de amonio  $\geq 98$  % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), C18 (Scharlab, Barcelona, España) PSA (Scharlab), Florisil (J. T. Baker, Deventer, Holanda), Z-sep+ (Supelco, Bellefonte, EEUU) y carbón negro grafitizado (GCB, *graphitized carbon black*) 120-400 mesh (Scharlab).

Los reactivos líquidos utilizados fueron acetonitrilo LC-MS Chromasolv™  $\geq 99,9$  % (Honeywell, Charlotte, EEUU), metanol Chromasolv™ para HPLC grado gradiente  $\geq 99,9$  % (Honeywell), y ácido fórmico Optima LC/MS  $\geq 99,0$  % (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, EEUU).

El agua ultrapura se obtuvo a través de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Burlington, EEUU).

Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE, solid phase extraction) empleados fueron del modelo Oasis® Prime HLB 3cc/150 mg (Waters, Milford, MA, EEUU)

### 5.2. EQUIPOS

Para la pesada de muestras y de sales se empleó un granatario PB602-S (Mettler Toledo, Greinfesee, Suiza). Para la pesada de sorbentes de limpieza se utilizó una balanza analítica AB54- S/FACT Classic Plus (Mettler Toledo, Greinfesee, Suiza). En las etapas de centrifugación se empleó una centrifugadora Consul 21 (Otroalresa, Madrid, España) para tubos Falcon de 50 mL, y una centrifugadora Centronic-BL II (J.P. Selecta, Barcelona, España) para tubos Eppendorf.

Respecto al análisis cromatográfico, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de Agilent serie 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), con una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8  $\mu$ m), también de Agilent Technologies.

El sistema cromatográfico se acopló a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) modelo 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies). La fuente de ionización es una sonda de tipo *Jet Stream* electrospray (ESI) (G1958-6538), en modo de trabajo positivo (ESI+). La colisión se efectuó con nitrógeno al 99,9 % obtenido a partir de un equipo NitroFlow Lab (Parker Hannifin, Cleveland, OH, EEUU).

### 5.3. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS

#### 5.3.1. Método de extracción

Previamente a la optimización del método de extracción definitivo, se estudiaron otros dos métodos de extracción basados en una modificación del método QuEChERS, denominados método 1 y método 2.

El **método 1** consiste en:

1. Se pesa 1 g de pimentón en un tubo Falcon de 50 mL.
2. Se adicionan 5 mL de agua milli-Q y 5 mL de acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1 % v/v). Se agita en vortex durante un minuto.
3. Se pesan 4 g de sulfato de magnesio, y 1 g de acetato de amonio. Se agita en vortex durante un minuto.
4. Se centrifuga a 3700 rpm durante 7 minutos.
5. Se transfieren 1,5 mL de sobrenadante a un tubo Eppendorf. Se adicionan 25 mg de PSA y 25 mg de C18.
6. Se centrifuga a 3700 rpm durante 10 minutos.
7. El sobrenadante obtenido se hace pasar por un filtro de jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$  y se introduce en un vial de cromatografía para su análisis mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.

El **método 2** presenta la eliminación de la etapa de extracción en fase sólida dispersiva indicada en el método 1. Así, el procedimiento de extracción es:

1. Se pesa 1 g de pimentón en un tubo Falcon de 50 mL
2. Se adicionan 5 mL de agua milli-Q y 5 mL de acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1 % v/v). Se agita en vortex durante un minuto.
3. Se pesan 4 g de sulfato de magnesio, y 1 g de acetato de amonio. Se agita en vortex durante un minuto.
4. Se centrifuga a 3700 rpm durante 7 minutos.
5. Se toma 1 mL de sobrenadante, se hace pasar por un filtro de jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$  y se introduce en un vial de 1 mL para su análisis cromatográfico mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.

El método de extracción final optimizado, igualmente basado en la metodología QuEChERS se denominó **método 3**.

1. Se pesan 0.5 g de pimentón en un tubo Falcon de 50 mL.
2. Se adicionan 10 mL de agua milli-Q y 10 mL de acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1 % v/v). Se agita en vortex durante un minuto.
3. Se pesan 4 g de sulfato de magnesio, y 1 g de acetato de amonio. Se agita en vortex durante un minuto.

4. Se centrifuga a 3700 rpm durante 7 min.
5. El extracto final se diluye en una proporción 1:4 (v/v) con una mezcla acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1 % v/v):agua 1:1 (v/v). Se introduce en un vial de cromatografía para su análisis mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.

### 5.3.2. Análisis mediante LC-MS

La separación cromatográfica de los analitos se realizó mediante elución en modo gradiente (**Tabla 5**) con una fase móvil compuesta de acetonitrilo como eluyente A y agua ultrapura acidificada con ácido fórmico (1 % v/v) como eluyente B. La velocidad de flujo de la fase móvil es de 0,2 mL/min, con un volumen de inyección de 5 µL y un tiempo de análisis de 8,5 minutos a 25°C.

**Tabla 5.** Gradiente de elución empleado

Tiempo (min)	% B
0,00	75
3,75	0
6,00	0
6,50	75
8,50	75

En cuanto a las condiciones de trabajo del espectrómetro de masas, se resumen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Condiciones de trabajo del espectrómetro de masas

Temperatura de gas de secado	325 °C
Temperatura de gas de cortina	400 °C
Flujo de gas de secado	5 L/min
Flujo de gas de cortina	11 L/min
Voltaje del capilar	3500 V
Presión del nebulizador	45 psi

En la **Tabla 7** se muestran los datos de adquisición UHPLC-QqQ-MS/MS:

**Tabla 7.** Parámetros de adquisición UHPLC-QqQ-MS/MS

Analito	Ventana de tiempo de retención (min) <sup>a</sup>	Ion precursor (m/z)	Voltaje del fragmentador (V)	Iones producto (m/z)	Energía de colisión (eV)	Relación de iones
AFB1	3,38 ± 0,10	313,1	130	285,1	20	
				241,1	40	93,8
				128,1	80	88,9
				115,1	80	62,7
AFB2	3,23 ± 0,12	315,2	125	287,0	30	
				259,0	30	99,2
				243,0	50	36,2
				115,0	80	75,5
AFG1	3,24 ± 0,12	329,1	125	243,0	30	
				200,0	50	84,9
				115,0	80	99,9
AFG2	3,07 ± 0,12	331,1	125	115,0	30	
				245,0	50	83,6
				189,0	80	81,2

<sup>a</sup> Expresado como  $t_R \pm 3s_d$  y con  $n=10$ , donde  $t_R$  es el valor promedio de tiempo de retención y  $s_d$  la desviación estándar.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previamente al inicio de este trabajo de investigación, las condiciones cromatográficas y espectrométricas para el análisis de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 fueron establecidas por Hidalgo-Ruiz *et al.*<sup>39</sup> de modo que se procedió a la optimización del método de extracción y a la posterior validación del mismo.

### 6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Para la determinación de aflatoxinas en pimentón, se procedió aplicando un método previamente establecido, denominado como método 1, descrito anteriormente, con fortificación previa del blanco matriz a 20 µg/kg. Este método, que aplica una dilución 1:5 y una etapa de limpieza del tipo dSPE, proporcionó unas recuperaciones aceptables, de entre 108-117 %, pero una elevada supresión iónica (efecto matriz negativo), de entre -58 y -65 %, excepto para la AFG2, con -22 % de efecto matriz como se muestra en la **Tabla 8**, calculado mediante la ecuación (2).

$$\% EM = \left( \frac{m_{matriz}}{m_{disolvente}} - 1 \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

**Tabla 8.** Valores de recuperación y efecto matriz (%)

	Recuperación (%)	Efecto matriz (%)
<b>AFB1</b>	108	-58
<b>AFB2</b>	110	-61
<b>AFG1</b>	112	-65
<b>AFG2</b>	117	-22

### 6.1.1. Estudio de la influencia de la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) y de la extracción en fase sólida (SPE)

Con objeto de reducir la supresión iónica consecuencia de las interferencias de la matriz, se decidió estudiar el efecto de diferentes sorbentes como C18, PSA, Florisil, Z-sep+ y GCB, en términos de reducción de interferencias (efecto matriz).

Para ello, se adicionan 25 mg de cada sorbente de manera individual en 10 tubos Eppendorf con 1 mL de blanco matriz; en 5 de ellos las aflatoxinas se adicionan antes de la limpieza con sorbentes y en los otros 5 después de la limpieza con sorbentes. A ambos tipos de tubos se les adicionó 25 µg/L de cada una de las aflatoxinas, que también se adicionaron a una mezcla de fase móvil (50:50 v/v). El objetivo de dicha experiencia era comprobar en primer lugar si los analitos se adsorbían en los disolventes de limpieza, y si se conseguía reducir el efecto matriz. El efecto matriz se halló comparando las áreas de pico de las AFs en las matrices a las que se le adicionó el patrón posteriormente a la limpieza, con las áreas de pico de las AFs preparadas en disolvente, de acuerdo con la ecuación (3).

$$\% EM = \left( \frac{A_{\text{matriz después de dSPE}}}{A_{\text{disolvente}}} - 1 \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

donde  $A_{\text{después de dSPE}}$  representa el área de la aflatoxina al adicionar el patrón de AFs después de realizar la dSPE, y  $A_{\text{disolvente}}$  representa el área de la aflatoxina en disolvente.

Por su parte, las recuperaciones fueron calculadas empleando la ecuación (4):

$$\% \text{ Recuperación} = \left( \frac{A_{\text{antes de dSPE}}}{A_{\text{después de dSPE}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

donde  $A_{\text{antes de dSPE}}$  representa el área de la AF al adicionar el patrón de AFs antes de realizar la dSPE, y  $A_{\text{después de dSPE}}$  representa el área de la AF al adicionar el patrón de AFs después de realizar la dSPE.

La **Tabla 9** muestra los resultados obtenidos. Los sorbentes no demostraron demasiada eficacia reduciendo el efecto matriz. Además, las recuperaciones obtenidas empleando algunos de estos sorbentes se vieron reducidas frente a la extracción sin sorbentes, como en el caso de la AFG1 en florisil, que mostró una variación de -1% de efecto matriz y una disminución del 31 % en los valores de recuperación, indicando por tanto que dicha aflatoxina era adsorbida en el florisil. Otro caso que destacar es el del GCB, que para la AFB1 y AFB2 presentó una disminución de las recuperaciones del 64 % y 60 % respectivamente, indicando también que ambas aflatoxinas eran adsorbidas por el GCB. El sorbente que proporcionó los mejores resultados de recuperación fue el C18, pero no se logró una disminución del efecto matriz, que era el principal propósito

de este estudio. Se determinó, por tanto, que no era necesario la etapa de limpieza con sorbentes ya que el efecto matriz no se vio reducido en ningún caso.

Debido a que los sorbentes estudiados no reducían eficazmente el efecto matriz del pimentón, se decidió investigar si el uso de cartuchos de SPE reducía las interferencias de la matriz, sustituyendo estos a los sorbentes anteriormente utilizados. La extracción en fase sólida se realizó por gravedad, haciendo pasar el extracto que se deseaba limpiar por un cartucho de SPE Oasis<sup>®</sup> Prime HLB 3cc/150 mg, recogiendo el extracto limpio sobre un vial de cromatografía para su posterior análisis.

Cualitativamente se apreció un cambio de coloración de las muestras desde un tono rojo anaranjado antes de SPE, hasta un color amarillo, tras la aplicación del cartucho SPE, confirmando que se produce una retención de interferencias de la matriz. En la **Tabla 9** se pueden observar los valores de recuperación y efecto matriz usando SPE como etapa de limpieza de la muestra.

En virtud de los resultados obtenidos, se puede concluir que los cartuchos de SPE empleados no ayudan a reducir el efecto de supresión iónica, sino que presentan menor eficacia que los sorbentes utilizados para dSPE; mientras que, por ejemplo, para AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 se obtuvieron valores de efecto matriz con C18 de -76 %, -82 %, -70% y -82% respectivamente, con cartuchos SPE estos valores fueron de -90 %, -92 %, -87 % y -85 % respectivamente.

**Tabla 9.** Valores de recuperación y efecto matriz en diferentes sorbentes (%).

Sorbente	Recuperación (%) 100 µg/kg				Efecto matriz (%)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
<b>C18</b>	97	101	96	92	-76	-82	-70	-82
<b>PSA</b>	86	83	88	90	-72	-78	-66	-80
<b>Z-sep+</b>	92	90	94	92	-70	-77	-65	-79
<b>GCB</b>	44	50	86	98	-67	-75	-61	-77
<b>Florisil</b>	59	59	81	94	-71	-78	-66	-81
<b>SPE</b>	63	64	69	62	-90	-92	-87	-85

### 6.1.2. Estudio de la influencia de la dilución

Teniendo en cuenta que las estrategias de limpieza mediante SPE o dSPE no proporcionaron resultados aceptables, se aplicó el método 2 con diferentes diluciones a los extractos en matriz, 1:2 y 1:4 (v/v), mediante adición de una mezcla acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1 % v/v):agua 1:1 (v/v), para estudiar el efecto matriz en función del grado de dilución. El nivel de concentración empleado fue de 25 µg/kg. Los resultados mostraron que la dilución 1:4 presentaba cierta reducción del efecto matriz, con unos valores comprendidos entre -64 y -72 %, frente a valores de entre -85 % y -92 % sin dilución, y entre -86 % y -89 % con dilución 1:2, pero dicha reducción no fue suficiente. (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Efecto matriz observado (%) tras aplicar diversas diluciones al extracto.

	<b>Efecto matriz (%).</b>			
	<b>AFB1</b>	<b>AFB2</b>	<b>AFG1</b>	<b>AFG2</b>
<b>Matriz sin dil.</b>	-90	-92	-87	-85
<b>Matriz 1:2 (v/v)</b>	-88	-89	-86	-88
<b>Matriz 1:4 (v/v)</b>	-68	-72	-64	-72

Con objeto de aumentar la dilución de la muestra en el proceso de extracción, y de este modo reducir el efecto matriz, se decidió reducir la cantidad de pimentón de 1 g a 0.5 g, y se incrementó la cantidad de acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1 % v/v) y de agua milli-Q de 5 mL a 10 mL (**método 3**). Esto se traduce en una dilución 1:20, frente a la dilución 1:5 de los métodos anteriores. Con este nuevo método, los resultados obtenidos para AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 fueron respectivamente, de 132, 103, 114 y 85 % para las recuperaciones, y de -31, -29, -37 y -33 % para el efecto matriz.

Debido a los resultados proporcionados por el método 3, se decidió estudiar la recuperación en diversas diluciones de los extractos de pimentón, 1:1, 1:2, 1:4 y 1:9 (v/v) para determinar cuál era la más adecuada en términos de recuperación (**Tabla 11**), ya que una dilución excesivamente grande, a pesar de reducir el efecto matriz, podría afectar negativamente a la sensibilidad del método. De este modo, posteriormente a la determinación de la dilución óptima en términos de recuperación, se realizó el estudio del efecto matriz a dicha dilución.

**Tabla 11.** Valores de recuperación de aflatoxinas (%) a diferentes grados de dilución (v/v) aplicando el método 3.

	<b>100 µg/kg</b>				<b>1000 µg/kg</b>			
	<b>AFB1</b>	<b>AFB2</b>	<b>AFG1</b>	<b>AFG2</b>	<b>AFB1</b>	<b>AFB2</b>	<b>AFG1</b>	<b>AFG2</b>
<b>Sin dil.</b>	100	100	106	107	71	66	68	70
<b>Dil. 1:1</b>	113	117	120	121	79	77	79	82
<b>Dil. 1:2</b>	97	99	107	127	85	85	88	81
<b>Dil. 1:4</b>	99	100	104	107	99	104	104	109
<b>Dil. 1:9</b>	95	91	117	87	110	110	120	122

Como se puede observar en la **Tabla 11**, las mejores recuperaciones se obtuvieron para un nivel de fortificación inferior de 100 µg/kg, con valores sin dilución entre 100 y 107 %, mientras que a 1000 µg/kg las recuperaciones disminuyen hasta situarse en el rango entre 66 y 71 %. Sin dilución, o con dilución baja (dil. 1:1 ó 1:2), a un nivel superior (1000 µg/kg) las recuperaciones son menores que a niveles de dilución altos. En el caso del nivel de fortificación superior, se observa una influencia de la dilución sobre las recuperaciones de las aflatoxinas, como en el caso de la AFB1 a 100 µg/kg, con valores entre 113 y 95 % para las diluciones 1:1 y 1:4 respectivamente, y de entre 82 y 122 % en diluciones 1:1 y 1:9 respectivamente, para la AFG2 a 1000 µg/kg.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decide aplicar un factor de dilución 1:4 para futuras experiencias, ya que, sin ser una dilución elevada, proporciona resultados

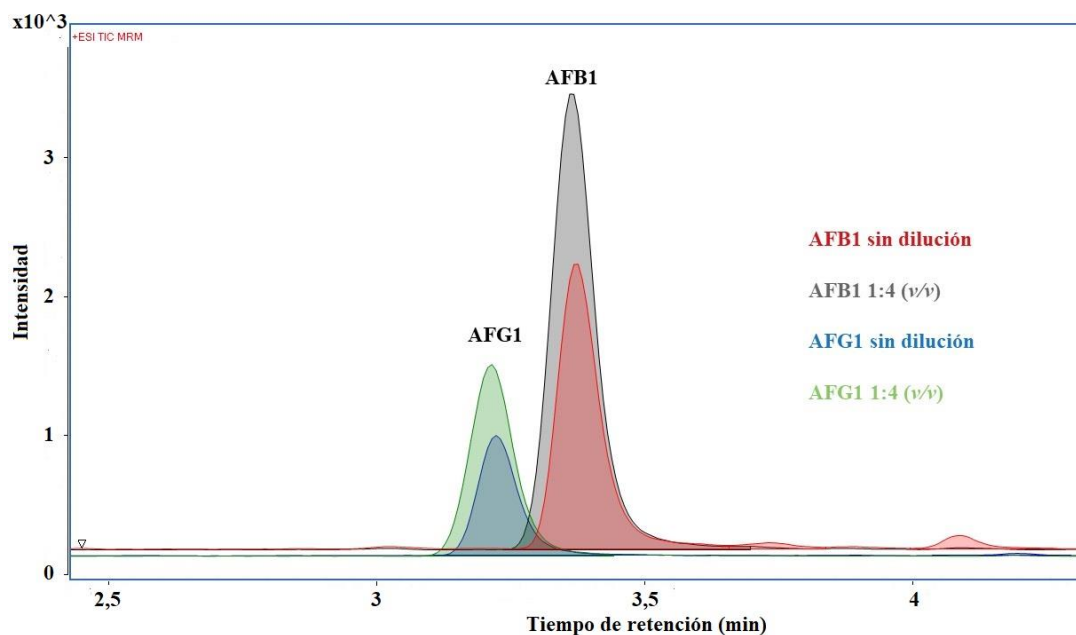
adecuados en términos de recuperación de cara a la validación, para la que se requieren valores de recuperación comprendidos entre 70 y 120 %.

Finalmente, se llevó a cabo un ensayo para estudiar el efecto matriz en un punto en matriz a 100  $\mu\text{g/L}$  con dilución 1:4 (v/v), empleando el método de extracción 3, con 0,5 g de muestra y 10 mL de acetonitrilo 1 % formico (v/v). Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Efecto matriz en aflatoxinas (%)

	Efecto matriz (%)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
<b>Punto en matriz 100 <math>\mu\text{g/L}</math> 1:4 (v/v)</b>	+1	+3	+13	+11

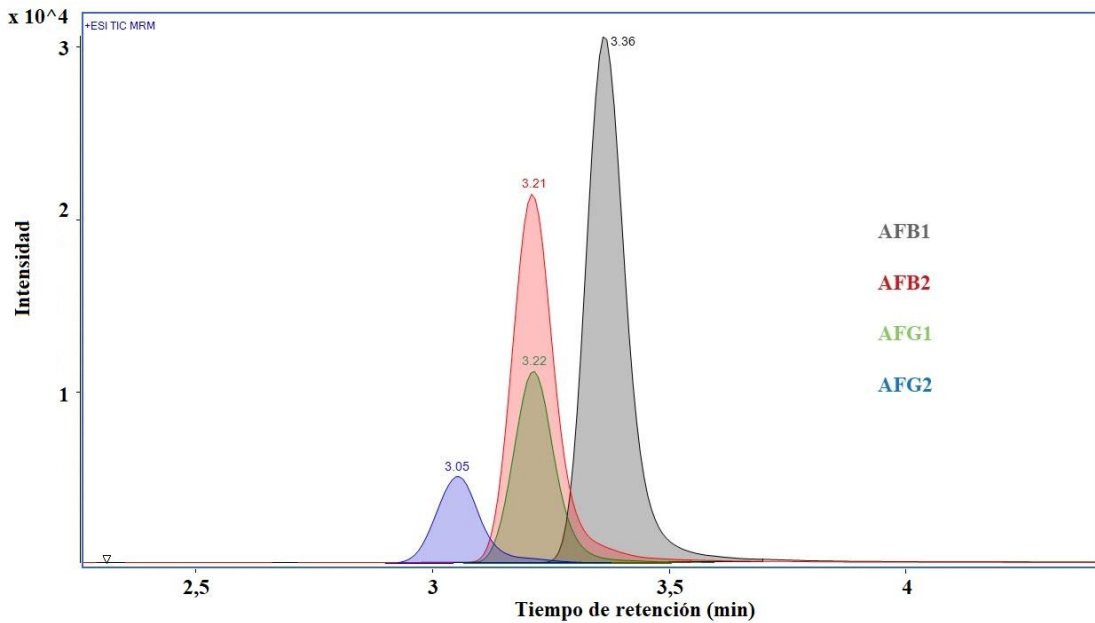
Como se puede apreciar, el efecto matriz se ha conseguido eliminar en todas las aflatoxinas, ya que presentan valores de efecto matriz inferiores a  $\pm 20$  %. En la **Figura 5** se muestra el efecto de la dilución 1:4 (v/v) en AFB1 y AFG1 en un cromatograma. Se puede observar que las aflatoxinas presentan una mayor área de pico en muestras con matriz diluida respecto a aquellas sin dilución de matriz.



**Figura 5.** Efecto de la dilución de matriz 1:4 (v/v) sobre la señal de las AFB1 y AFG1 a 100  $\mu\text{g/L}$ .

En la **Figura 6** se representa un cromatograma con las señales de las diferentes aflatoxinas en matriz a una dilución 1:4 (v/v). Se puede comprobar que cada aflatoxina presenta una respuesta diferente, y así como un tiempo de retención característico, pero muy próximas entre sí, como consecuencia de la similitud estructural de las cuatro aflatoxinas.





**Figura 6.** Cromatograma (TIC) de las aflatoxinas a 100 µg/L en matriz.

En este punto, el método de extracción se considera optimizado, ya que se han obtenido valores adecuados tanto de recuperaciones (entre 70 y 120 %) y de efecto matriz. Por tanto, se procederá a validar el método de extracción 3.

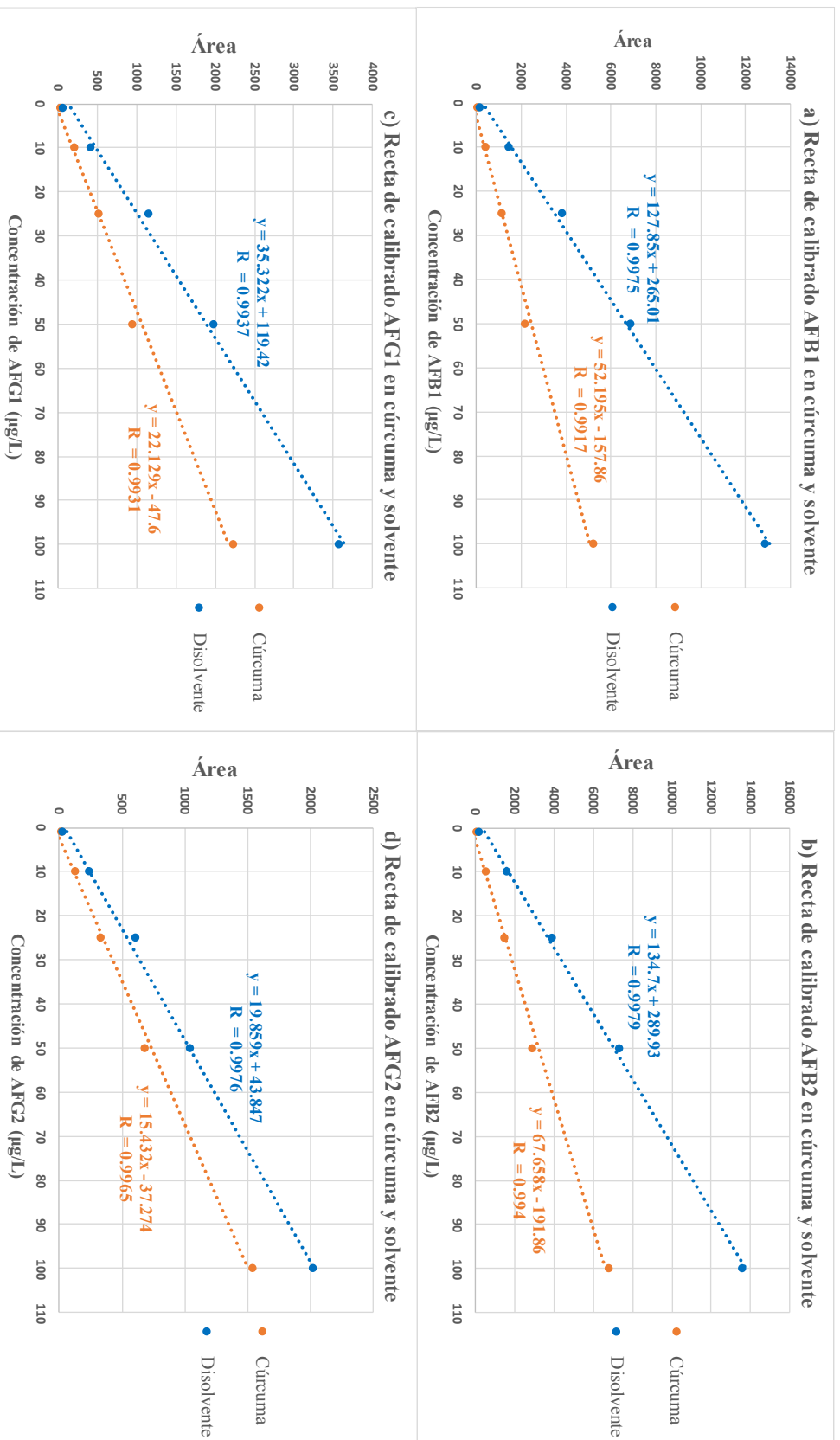
## 6.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO A OTRAS ESPECIAS: CÚRCUMA

De modo paralelo al estudio del pimentón, se evaluó el método desarrollado en cúrcuma, otra especia muy utilizada en los últimos años, determinando parámetros como el efecto matriz o las recuperaciones. Se aplicó el mismo procedimiento de análisis desarrollado en pimentón, con una dilución 1:4 (v/v), a concentraciones 1, 10, 25, 50 y 100 µg/L para las rectas de calibración (**Figura 7**), y de 100 y 1000 µg/kg para los fortificados.

El efecto matriz obtenido fue elevado para todos los analitos, abarcando desde -59 % para AFB1, hasta -22 % para AFG2. Por el contrario, en pimentón, a los mismos niveles de concentración que la cúrcuma, los valores comprendían desde +1 hasta +13 % en la dilución 1:4 (v/v). La linealidad de las rectas de calibrado fue adecuada, con un  $R^2$  mínimo de 0,9917.

Respecto a las recuperaciones mostradas en la **Tabla 13**, no se obtuvieron valores repetitivos. Para un nivel de fortificación de 100 µg/kg, se registraron valores de recuperación interdiaria que abarcaban desde 78-138 % en una sesión, hasta 58-86 % en otra sesión. La AFB1 sí proporcionó valores repetitivos (78 y 77 %), pero no ocurrió así con el resto de aflatoxinas, siendo el caso más llamativo el de AFG2, con valores de recuperación de 138 y 58 %.

Para el nivel de fortificación superior 1000 µg/kg, las recuperaciones comprendían valores interdiaria tan dispares como 83-93 % hasta 44-58 %. En este caso, ninguna de las AFs mantuvo valores repetitivos de recuperación. La AFG2 proporcionó la mayor recuperación en la primera experiencia (93 %), y la menor recuperación en la segunda experiencia (44 %), del mismo modo que ocurrió a un nivel de fortificación 100 µg/kg.



**Figura 7.** Rectas de calibrado de aflatoxinas en matriz cúrcuma y en disolvente. a) AFB1, b) AFB2, c) AFG1, d) AFG2

**Tabla 13.** Valores de recuperación de aflatoxinas en cúrcuma (%)

	100 µg/kg				1000 µg/kg			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
<b>Experiencia 1</b>	78	98	136	138	89	83	83	93
<b>Experiencia 2</b>	77	86	71	58	58	55	53	44

Por lo tanto, se concluyó que el método desarrollado en pimentón no era aplicable a muestras de cúrcuma, debido a los altos efectos matriz y a la imposibilidad de establecer un rango de recuperaciones repetitivo, como consecuencia de la mala repetitividad de este método, por lo que es necesario la realización de más estudios para esta especia.

### 6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

#### 6.3.1. Linealidad

La linealidad se define como la capacidad de un método analítico para generar una señal cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de un analito o parámetro analítico dado.<sup>40</sup>

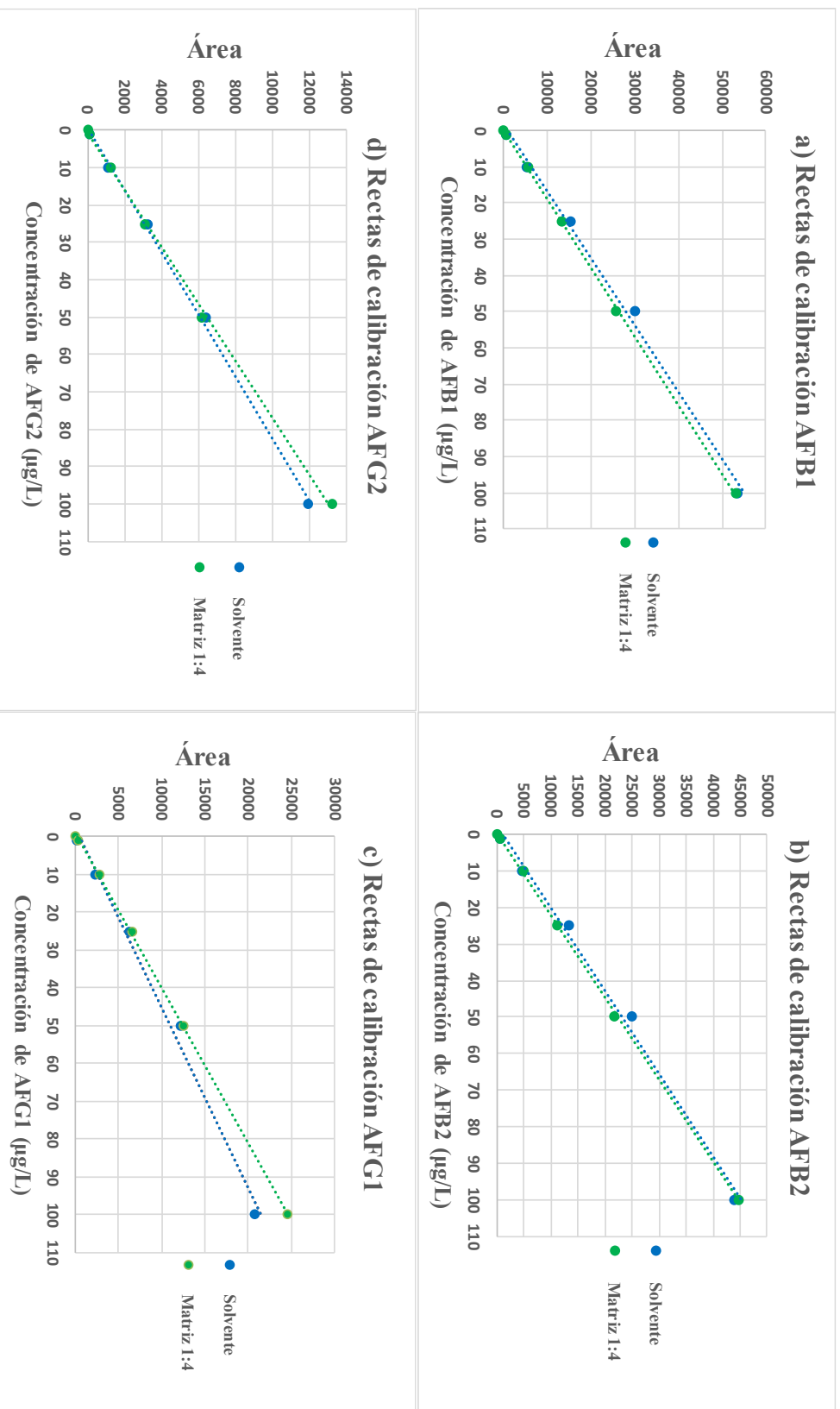
El rango en el que se verifica dicha linealidad se denomina rango de trabajo. Fuera del rango lineal, no se cumple dicha proporcionalidad. Este parámetro se evalúa mediante el análisis de una recta de calibrado con puntos a diferentes concentraciones de aflatoxinas.

El factor que determina la linealidad del método es el coeficiente de determinación,  $R^2$ . Este coeficiente mide el grado de adecuación a un modelo lineal; cuanto más cercano sea a 1, mayor relación lineal se establece entre la señal del analito y su concentración. Es recomendable un  $R^2$  mínimo de 0,98 para efectuar la validación del método.

La linealidad se puede evaluar tanto en disolvente, como en matriz. Para este trabajo se realizó un estudio de linealidad en extracto blanco de matriz y a niveles 1, 10, 25, 50, y 100 µg/L.

Todos estos estudios mostraron valores del coeficiente de determinación por encima de 0.999, lo que indica que en los rangos de concentración estudiados 1-100 µg/L se puede establecer una relación lineal entre la señal de analito y su concentración, tanto en disolvente como en matriz.

En la **Figura 8** se muestran las rectas de calibración y en la **Tabla 14** se representan los parámetros de las rectas obtenidas.



**Figura 8.** Rectas de calibrado de aflatoxinas en matriz y en disolvente. a) AFB1, b) AFB2, c) AFG1, d) AFG2

**Tabla 14.** Parámetros de recta de calibración en matriz y disolvente.

Aflatoxina	Pendiente	Ordenada en el origen	R <sup>2</sup>
<b>Disolvente</b>			
<b>AFB1</b>	539,61	934,28	0,9946
<b>AFB2</b>	439,11	1181,5	0,9937
<b>AFG1</b>	208,65	594,17	0,9907
<b>AFG2</b>	120,65	90,449	0,9978
<b>Matriz</b>			
<b>AFB1</b>	528,25	-34,317	0,9996
<b>AFB2</b>	444,29	103,88	0,9997
<b>AFG1</b>	244,19	229,6	0,9996
<b>AFG2</b>	131,65	-72,005	0,999

### 6.3.2. Efecto matriz

El efecto matriz, de acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) es el efecto combinado de todos los componentes de la muestra que no sean el analito en la medición de la cantidad. Si un componente específico se puede identificar como causante de un efecto, entonces este se refiere como interferencia.<sup>41</sup>

El efecto matriz se mide comparando las pendientes de una recta del analito en disolvente, y la recta de ese mismo analito en matriz. Una misma pendiente implica que ambas rectas se superponen, es decir, una misma concentración de analito en matriz y disolvente produce una misma señal. En el caso de que la pendiente de la recta en matriz sea mayor, para una misma concentración, se producirá mayor señal en matriz, por lo que se habla de efecto matriz positivo, o exaltación de la señal. En el caso contrario, si la pendiente de la recta en matriz es menor que en disolvente, a una misma concentración se producirá menor señal respecto al analito en disolvente, por lo que se habla de efecto matriz negativo o supresión iónica.

Para el cálculo del efecto matriz se aplica la ecuación (2) Si % EM < + 20 % se habla de exaltación de la señal, mientras que si % EM > - 20 %, se habla de supresión iónica.

En este trabajo se preparó una recta en disolvente a 1, 10, 25, 50 y 100 µg/L, y una recta de blanco de matriz siguiendo el método 3 previamente descrito. En la **Tabla 12**, comentada previamente, se muestra que el efecto matriz es apenas inapreciable, siendo todos los valores de EM (%) inferiores a 20 %.

### 6.3.3. Veracidad

De acuerdo con Cuadros *et al.*,<sup>40</sup> la veracidad, o recuperación, es la proporción de la cantidad de analito presente o añadido a la porción de ensayo, el cual es extraído y presentado para la medida. Del mismo modo, definen la recuperación aparente como el valor observado (cantidad de analito) determinado por un procedimiento analítico mediante una curva de calibración, dividido por el valor de referencia (cantidad de analito inicial adicionado).

Para el estudio de la recuperación, se adiciona una cierta cantidad de analito a una muestra a la que se le aplicará el proceso de extracción. Esta muestra se denomina

fortificado. Se aplica el factor de dilución del método, y se estima la concentración máxima de analito en el extracto final a analizar.

Una recuperación del 100 % implica que todo el analito adicionado o presente en la muestra ha sido correctamente extraído de la matriz de estudio. El procedimiento de extracción se compone de diferentes etapas en las que se pueden producir pérdidas de analito, con la consecuente reducción en los valores de recuperación. Sin embargo, el efecto matriz puede afectar a la recuperación, a través de su efecto en la cuantificación a través de la curva de calibrado.<sup>40</sup> Entonces se habla de recuperación aparente, anteriormente definida, y que es el resultado de combinar las pérdidas de analito a causa del proceso de extracción y del efecto matriz. Del mismo modo, los componentes de la matriz pueden causar recuperaciones mayores del 100 %.

La Guía SANTE, de la Comisión Europea, establece unos valores de recuperación de entre 70 y 120 % para efectuar la validación del método.<sup>42</sup>

El estudio de validación realizado se llevó a cabo a niveles de fortificación de 100 y 1000 µg/kg.

Se realizaron estudios interdía e intradía de recuperaciones. Los resultados se muestran en la **Tabla 14**. Como se puede apreciar, todos los valores de recuperación están en el rango 70-120 %. En el caso de análisis intradía, los dos niveles de fortificación proporcionan valores de recuperación muy similares. En el caso de los análisis interdía, las recuperaciones son ligeramente más cercanas al 100 % en el nivel de fortificación inferior 100 µg/kg.

**Tabla 15.** Estudio de recuperaciones intradía e interdía.

Aflatoxina	Rec (Intradía) <sup>a</sup>		Rec (Interdía) <sup>b</sup>	
	100 µg/kg	1000 µg/kg	100 µg/kg	1000 µg/kg
<b>AFB1</b>	87	84	82	77
<b>AFB2</b>	84	83	88	77
<b>AFG1</b>	77	88	86	79
<b>AFG2</b>	74	79	77	75

<sup>a</sup> n=5

<sup>b</sup> n=5

#### 6.3.4. Precisión

La precisión de un método analítico se define como la variación del resultado en un conjunto de medidas replicadas. Se puede expresar como RSD.<sup>41</sup>

De acuerdo con la Guía SANTE, la precisión se debe de expresar como % RSD, siendo el criterio de validación  $RSD (\%) \leq 20 \%$ . La precisión expresada como desviación estándar relativa se calcula de acuerdo con la ecuación (5):

$$RSD (\%) = \frac{s_d}{\bar{X}} * 100 \quad \text{Ecuación (5)}$$

donde  $s_d$  representa la desviación estándar de múltiples medidas de recuperación, y  $\bar{X}$  representa el valor promedio de las recuperaciones.

La RSD por tanto indica el grado de desviación de los resultados respecto al valor medio de las recuperaciones. Cuanto más próximo a 0 % sea el resultado, menor desviación de las recuperaciones respecto a la media, y por tanto, el método será más preciso.

Como se puede comprobar en la **Tabla 16**, tanto en los estudios de precisión intradía como interdía se obtuvieron resultados de RSD (%) inferiores al 20 % que recomienda la Guía SANTE. En el caso del análisis intradía, para un nivel de fortificación inferior, el % RSD no excedió del 19% (AFG2), mientras que el valor máximo para el nivel superior de fortificación fue de un 12% (AFG2).

Respecto a los análisis interdía, a un nivel de fortificación inferior de 100 µg/kg se obtuvieron resultados de precisión entre 9 y 18 %, (AFG2 y AFB2, respectivamente) mientras que en el nivel superior entre 7 y 11 % (AFG2 y AFB1, respectivamente).

Los valores de precisión son por tanto satisfactorios con los requisitos para la validación. (RSD (%) ≤ 20 %).

**Tabla 16.** Estudio de precisión intradía e interdía. (% RSD).

Aflatoxina	% RSD (Intradía) <sup>a</sup>		% RSD (Interdía) <sup>b</sup>	
	100 µg/kg	1000 µg/kg	100 µg/kg	1000 µg/kg
AFB1	11	10	17	11
AFB2	8	9	18	8
AFG1	8	9	17	9
AFG2	19	12	9	7

<sup>a</sup> n=5

<sup>b</sup> n=5

### 6.3.5. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD, *limit of detection*) se define como la mínima cantidad de analito que puede producir una señal distinguible de la señal del ruido. Por su parte, el límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*), se define como la mínima cantidad de analito que puede cuantificarse con repetitividad y veracidad aceptable. Para el cálculo del LOD y LOQ existen múltiples criterios. En este trabajo se ha seguido el método de la regresión lineal, aplicando las ecuaciones (6) y (7)

$$LOD = 3 * \frac{s_a}{m} \quad \text{Ecuación (6)}$$

$$LOQ = 10 * \frac{s_a}{m} \quad \text{Ecuación (7)}$$

donde *m* es la pendiente de la recta de calibración a concentraciones cercanas al LOD/LOQ, y *s<sub>a</sub>* es la desviación estándar de la respuesta en la ordenada en el origen. En el presente trabajo, ambos límites fueron determinados con rectas de calibrado a 0,5, 1, 2, 5 y 10 µg/L.

En la **Tabla 17** se muestran los valores de LOD y LOQ calculados. El valor más pequeño de LOD corresponde a 0,72 µg/L (AFG1), mientras que el valor mayor corresponde a la AFB2, con 0,91 µg/L. Respecto al LOQ, el valor menor corresponde a

AFG1, con 2,4 µg/L, mientras que el valor mayor corresponde a la AFB2, con 3,0 µg/L. Por tanto, el menor valor de concentración al que se puede cuantificar correctamente es a 2,4 µg/L.

**Tabla 17.** Valores de LOD y LOQ para las AFs.

	$m^a$	$s_a^b$	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
<b>AFB1</b>	349,9	87,11	0,75	2,5
<b>AFB2</b>	254,0	77,16	0,91	3,0
<b>AFG1</b>	166,5	39,69	0,72	2,4
<b>AFG2</b>	65,21	17,34	0,80	2,7

<sup>a</sup> Pendiente de la recta de calibración.

<sup>b</sup> Desviación estándar de la respuesta en la ordenada en el origen.

### 6.3.6. Análisis de muestras reales

Con el objetivo de aplicar el método analítico desarrollado y validado, se estudió la presencia de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en cinco muestras comerciales de pimentón, de diferente procedencia y lote.

A pesar de que el método ha sido validado, es necesario establecer un control que garantice la calidad de los resultados emitidos. Para ello, de modo rutinario en cada análisis o tanda de análisis, es necesario:

- El análisis de un blanco de matriz, para descartar la presencia de interferencias.
- Una recta de calibrado en matriz para verificar el cumplimiento de la linealidad del método.
- El estudio de recuperaciones a través de fortificados a diferentes niveles.

Todas las muestras comerciales de pimentón analizadas dieron un resultado negativo, no detectándose ningún tipo de aflatoxinas en ninguna muestra estudiada.

## 7. CONCLUSIONES

El presente trabajo nos permite extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha aplicado un método de análisis de aflatoxinas B1, B2, B1 y G2 en pimentón mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
- Se ha optimizado una variante del método de extracción QuEChERS para pimentón sin etapa de limpieza, reduciendo el coste y tiempo asociados al uso de sorbentes.
- Se ha logrado reducir eficazmente el efecto matriz que las especias producen debido a su complejidad composicional, aplicando diluciones del extracto.
- Son necesarios más estudios para aplicar una metodología similar a otras especias como la cúrcuma.



Los futuros estudios que podrían realizarse como continuación de este trabajo son:

- Aplicación del método de determinación de aflatoxinas a otras especias, tales como la pimienta o la nuez moscada.
- Modificación del método desarrollado para validación en cúrcuma
- Desarrollo de método de análisis simultáneo de aflatoxinas y otros contaminantes de origen biológico en pimentón u otras especias.
- Estudio de la degradación de las aflatoxinas en pimentón a lo largo del tiempo, tras su fortificación

## 8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS

- (1) Gilboa, A.; Namdar, D. On the Beginnings of South Asian Spice Trade with the Mediterranean Region: A Review. *Radiocarbon* **2015**, *57*, 265–283.
- (2) Liu, Q.; Meng, X.; Li, Y.; Zhao, C. N.; Tang, G. Y.; Li, H. Bin. Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (6), 1–62. <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>.
- (3) Centro de Promoción de Importaciones de Países en Desarrollo. CBI Trade Statistics: Spices and Herbs; La Haya, Países Bajos, 2015.
- (4) Molnár, H.; Kónya, É.; Zalán, Z.; Bata-Vidács, I.; Tömösközi-Farkas, R.; Székács, A.; Adányi, N. Chemical Characteristics of Spice Paprika of Different Origins. *Food Control* **2018**, *83*, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.028>.
- (5) Fogebe, B.; Granta, R.; Valciņa, O.; Bērziņš, A. Occurrence and Diversity of *Bacillus Cereus* and Moulds in Spices and Herbs. *Food Control* **2018**, *83*, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.038>.
- (6) FAO. Mycotoxins. [Online] <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/en/> (acceso julio de 2019)
- (7) Lucic, A.; Pavlovic, M.; Peraica, M.; Radic, B. Toxic Effects of Mycotoxins in Humans. *Bull. World Health Organ.* **1999**, *77* (7), 754–766.
- (8) Majeed, S.; De Boevre, M.; De Saeger, S.; Rauf, W.; Tawab, A.; Fazal-e-Habib; Rahman, M.; Iqbal, M. Multiple Mycotoxins in Rice: Occurrence and Health Risk Assessment in Children and Adults of Punjab, Pakistan. *Toxins (Basel)*. **2018**, *10* (2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/toxins10020077>.
- (9) Alonso Díez, A. ; González Montaña, J. R.; Rejas López, J. Congreso de La Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria [Cd-Rom]; Universidad de León: León, 2002; pp 66–81.
- (10) Wild, C. P.; Gong, Y. Y. Mycotoxins and Human Disease: A Largely Ignored Global Health Issue. *Carcinogenesis* **2009**, *31* (1), 71–82. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp264>.
- (11) Williams, J. H.; Aggarwal, D.; Phillips, T. D.; Jolly, P. E.; Stiles, J. K.; Jolly, C. M. Human Aflatoxicosis in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80* (5), 1106–1122. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>.
- (12) Flores-Flores, M. E.; Lizarraga, E.; López de Cerain, A.; González-Peñas, E. Presence of Mycotoxins in Animal Milk: A Review. *Food Control* **2015**, *53*, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.020>.
- (13) Kew, Michael, C. Synergistic Interaction Between Aflatoxin and Hepatitis B Virus in Hepatocarcinogenesis. *Liver Int.* **2003**, *23*, 405–409. <https://doi.org/10.5772/51396>.
- (14) WHO. Departamento de Seguridad Alimentaria y Zoonosis. Aflatoxins. [Online] [https://www.who.int/foodsafety/FSDigest\\_Aflatoxins\\_EN.pdf](https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_EN.pdf). (acceso julio de 2019).
- (15) Cho, S. H.; Lee, C. H.; Jang, M. R.; Son, Y. W.; Lee, S. M.; Choi, I. S.; Kim, S. H.; Kim, D. B. Aflatoxins Contamination in Spices and Processed Spice Products Commercialized in Korea. *Food Chem.* **2008**, *107* (3), 1283–1288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.049>.
- (16) Shundo, L.; de Almeida, A. P.; Alaburda, J.; Lamardo, L. C. A.; Navas, S. A.; Ruvieri, V.; Sabino, M. Aflatoxins and Ochratoxin A in Brazilian Paprika. *Food Control* **2009**, *20* (12), 1099–1102. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.008>.
- (17) Iqbal, S. Z.; Bhatti, I. A.; Asi, M. R.; Zuber, M.; Shahid, M.; Parveen, I. Effect of  $\gamma$  Irradiation on Fungal Load and Aflatoxins Reduction in Red Chillies. *Radiat. Phys. Chem.* **2013**, *82* (1), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.09.015>.
- (18) National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. [Online] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907#section=Computed-Properties>. (acceso julio de 2019)
- (19) Commission of the European Communities. *Commission Regulation (EC) No 118/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs*; European Commission, 2006; pp 5–24.
- (20) Diaz, G.; Cepeda, S.; Martos, P. Stability of Aflatoxins in Solution. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 1084–1088. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-017>.

- (21) Dong, X.; Zou, B.; Zhao, X.; Liu, S.; Xu, W.; Huang, T.; Zong, Q.; Wang, S. Rapid Qualitative and Quantitative Analysis of Aflatoxin B1 in Pu-Erh Tea by Liquid Chromatography-Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry Coupled with the QuEChERS Purification Method. *Anal. Methods* **2018**, *10* (39), 4776–4783. <https://doi.org/10.1039/C8AY01730A>.
- (22) Alsharif, A. M. A.; Choo, Y. M.; Tan, G. H. Detection of Five Mycotoxins in Different Food Matrices in the Malaysian Market by Using Validated Liquid Chromatography Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Toxins (Basel)*. **2019**, *11* (4). <https://doi.org/10.3390/toxins11040196>.
- (23) Anastassiades, M.; Lehotay, S.; štajnbaheer, D.; Schenck, F. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412–431.
- (24) Asociación Española de Normalización. UNE-EN 15662:2019. [Online] <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0061576> (acceso julio de 2019)
- (25) Reinholds, I.; Pugajeva, I.; Bartkevics, V. A Reliable Screening of Mycotoxins and Pesticide Residues in Paprika Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. *Food Control* **2016**, *60* (165), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.008>.
- (26) Yogendrarajah, P.; Van Poucke, C.; De Meulenaer, B.; De Saeger, S. Development and Validation of a QuEChERS Based Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Multiple Mycotoxins in Spices. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1297*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.075>.
- (27) de Blasio, C. Chromatography. *Green Energy Technol.* **2019**, *819* (Recommendations 1990), 103–125. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11599-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11599-9_8).
- (28) CSIC. Conceptos Fundamentales de Cromatografía [http://www.mcn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/principios\\_de\\_cromatografia.pdf](http://www.mcn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf). (acceso julio de 2019)
- (29) Ganzera, M.; Sturm, S. Recent Advances on HPLC/MS in Medicinal Plant Analysis—An Update Covering 2011–2016. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 211–233. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.038>.
- (30) Walter, T. H.; Andrews, R. W. Recent Innovations in UHPLC Columns and Instrumentation. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, *63*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.016>.
- (31) Wilson, I. D.; Adlard, E. R.; Cooke, M.; Poole, C. F. *Encyclopedia of Separation Science*; Academic Press: San Diego, 2000.
- (32) Chilaka, C. A.; De Boevre, M.; Atanda, O. O.; De Saeger, S. Quantification of Fusarium Mycotoxins in Nigerian Traditional Beers and Spices Using a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method. *Food Control* **2018**, *87*, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.028>.
- (33) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. *Fundamentos de Química Analítica.*, 9ª edición.; Editorial Reverté, S.A.: New York, 1988.
- (34) Fernanda Gomez, M.; Ortiz, C.; Pelosso, A.; Pili, R.; Rivero, A.; Roldán, J.; Sol Sandoval, A.; San Juan, F. Esi-Maldi-Tof. **2017**, 1–6.
- (35) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- (36) Emery Pharma. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Analysis <https://emerypharma.com/chemistry/lcms-services/>. (acceso julio de 2019)
- (37) Škrbić, B.; Koprivica, S.; Godula, M. Validation of a Method for Determination of Mycotoxins Subjected to the EU Regulations in Spices: The UHPLC-HESI-MS/MS Analysis of the Crude Extracts. *Food Control* **2013**, *31* (2), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.004>.
- (38) Ozbey, F.; Kabak, B. Natural Co-Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spices. *Food Control* **2012**, *28* (2), 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.039>.
- (39) Hidalgo-Ruiz, J. L.; Romero-González, R.; Martínez Vidal, J. L.; Garrido Frenich, A. A Rapid Method for the Determination of Mycotoxins in Edible Vegetable Oils by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2019**, *288* (November 2018), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.003>.

(40) Cuadros Rodríguez, L.; Gámiz Gracia, L.; Carrasco Pancorbo, A.; Ruiz Samblás, C. *Glosario de Términos Analíticos*, 1ª edición.; GRASEQA: Córdoba, 2013.

(41) Guilbault, G. G.; Hjelm, M. Nomenclature for Automated and Mechanised Analysis. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1991**, 29 (9), 577–585.

(42) European Commission. (2015). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. *European Commission Directorate-General for Health and Food Safety*, 11945, 1–42. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33021.77283>

## **9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

AFs: Aflatoxinas (*aflatoxins*)

CAS: Chemical Abstracts Service.

dSPE: Extracción en fase sólida dispersiva (*dispersive solid phase extraction*)

EC: Comisión Europea (*European Commission*)

EEA: Espacio Económico Europeo (*European Economic Area*)

ESI: Electronebulización (*electrospray*)

ESI+: Ionización por electronebulización en modo positivo (*Positive mode electrospray ionisation*)

EU: Unión Europea (*European Union*)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

FD: Detector de fluorescencia (*fluorescence detector*)

GCB: Carbón negro grafitizado (*graphitized carbon black*)

HBV: Virus de la Hepatitis B (*Hepatitis B virus*)

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LOD: límite de detección (*limit of detection*)

LOQ: límite de cuantificación (*limit of quantification*)

LRMS: Espectrometría de masas de baja resolución (*low resolution mass spectrometry*)

LSD: Dietilamida de ácido lisérgico (*lysergic acid diethylamide*)

MS: Espectrometría de masas (*mass spectrometry*)

PSA: Amina primaria secundaria (*primary secondary amine*)

PVDF: Polifluoruro de vinilideno (*Polyvinylidene fluoride*)

Q: Cuadrupolo simple (*single quadrupole*),

QqQ: Triple cuadrupolo (*triple quadrupole*)

RSD<sub>R</sub>: desviación estándar relativa (*relative standard deviation*)

SIM: Monitorización de iones seleccionados (*Selected Ion Monitoring*)

ToF: Tiempo de vuelo (*time of flight*)

UHPLC-QqQ-MS/MS: Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (*ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*)

WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)