



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Metodologías para la determinación de residuos de alcaloides tropánicos en alimentos

Natalia Medina Morales

Junio, 2021



Trabajo Fin de Grado

Metodologías para la determinación de residuos de alcaloides tropánicos en alimentos

Firma



Natalia Medina Morales

Jaén, Junio de 2021

INDICE

1. SEGURIDAD ALIMENTARIA. INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES.....	1
2. CONTAMINANTES QUIMICOS EN ALIMENTOS.....	2
2.1. Definición.....	3
2.2. Clasificación	3
2.2.1. De origen natural.....	3
2.2.1.1. Micotoxinas.....	3
2.2.1.2. Otras toxinas naturales.....	4
2.2.1.3. Otros contaminantes de origen natural.....	4
2.2.1.4. Nitratos	5
2.2.1.5. Contaminación radiactiva	6
2.2.2. De origen antropogénico	6
2.2.2.1. Metales pesados	6
2.2.2.2. Residuos de productos fitosanitarios	6
2.2.2.3. Contaminantes orgánicos persistentes (COPs).....	7
2.2.2.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).....	7
2.2.2.5. Acrilamida.....	7
2.2.2.6. 3-MCPD, glicidol y sus ésteres.....	7
3. TOXINAS NATURALES	9
3.1. Micotoxinas	10
3.2. Alkaloides tropánicos.....	12
3.2.1. Introducción.....	12
3.2.2. Atropina.....	13
3.2.3. Escopolamina.....	14
3.2.4. Normativa sobre alkaloides tropánicos	15
3.2.5. Antecedentes. Estudios de la presencia de alkaloides tropánicos en alimentos	16
4. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO DE ALCALOIDES TROPÁNICOS..	17
4.1. Tratamiento de muestra	18
4.1.1. Extracción sólido-líquido	18
4.1.1.1. Extracción Soxhlet.....	19
4.1.1.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	20
4.1.1.3. Extracción asistida por microondas (EAM).....	20
4.1.2. Extracción en fase sólida (SPE).....	21
4.1.3. QuEChERS.....	22
4.2. Etapa de determinación.....	23

4.2.1. Cromatografía de gases.....	24
4.2.2. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS).....	25
4.2.3. HPLC	25
4.2.4. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (HPLC-MS).....	26
4.2.5. Otros métodos	29
5. PRESENCIA DE ALCALOIDES TROPÁNICOS EN ALIMENTOS	29
6. CONCLUSIONES.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

Los alcaloides tropánicos (AT) son metabolitos secundarios producidos de forma natural en diferentes plantas como pueden ser *Brassicaceae*, *Solanaceae* y *Erythroxylaceae*. Estos compuestos han cobrado relevancia en estos últimos años debido su presencia en diferentes alimentos, tanto de procedencia animal como de procedencia vegetal. Entre los más destacados, cabe hablar de atropina y escopolamina, de gran interés, debido a que consumidos en grandes porciones pueden ocasionar graves problemas para la salud, llegando incluso a provocar la muerte. En este trabajo, se han estudiado los distintos métodos descritos para identificar y cuantificar residuos de AT en alimentos, poniendo hincapié tanto en la parte de preparación de muestra como la etapa de determinación, que suele llevarse a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

ABSTRACT

Tropane alkaloids are minor metabolites naturally produced in different plants, such as *Brassicaceae*, *Solanaceae* and *Erythroxylaceae*, among others. These toxins have recently become relevant due to their occurrence in a wide variety of food products originating both from animals and plants. Both atropine and scopolamine are two main compounds from this family of alkaloids, considering that high consumption of these alkaloids may entail serious health problems or even death. In this work, an overview of the main strategies used for the identification and quantification of tropane alkaloids in foodstuffs, paying attention to both sample treatment and determination step. Given the nature of the studied analytes, the latter step is usually accomplished using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (HPLC-MS).

1. SEGURIDAD ALIMENTARIA. INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES

La seguridad alimentaria (*Food Safety*) ha suscitado gran interés desde hace unos años. Esto ha venido acompañado del establecimiento de un marco regulatorio, tanto a nivel europeo como mundial. En 1970 se creó el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF), con el fin de mantener comunicadas y de forma actualizada las notificaciones y alertas originadas por alimentos que pudiesen llegar a causar graves problemas para la salud pública. En España, el sistema encargado de gestionar estas alertas se denomina Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI), una red establecida por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Con este fin, existe un Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA), exigido por la Unión Europea que obliga a realizar controles oficiales que garanticen el cumplimiento de la ley a lo largo de toda la cadena alimentaria en España (*Ponce de León de Lama et al., 2020*)

El concepto de Seguridad Alimentaria ha evolucionado desde su comienzo, en los años 70, hasta la actualidad. Originalmente se basó en la idea de la producción y disponibilidad de alimentos tanto a nivel mundial como nacional, pero en estos años se ha ido desarrollando hasta llegar a considerarse derecho humano. Cuando el suministro de alimentos no es seguro, las personas tienden a alimentarse de forma menos sana, es decir, ingiriendo “alimentos insalubres” los cuales contienen sustancias químicas, entre otros, provocando riesgos para la salud. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Seguridad Alimentaria (*Food Security*) se da cuando todas las personas tienen acceso, tanto físico como económico, a alimentos nutritivos que satisfagan sus necesidades físicas, garantizando así la salud. Por otra parte, se describe la seguridad alimentaria (usando el término *Food Safety*) como la garantía de que todos los alimentos estén libres de contaminantes.

La segunda Conferencia Internacional de Nutrición FAO / OMS celebrada en Roma en noviembre de 2014 hizo hincapié en la importancia de la inocuidad de los alimentos para mejorar la nutrición humana mediante dietas más saludables, seguras y nutritivas. Mejorar la seguridad alimentaria es un elemento clave para lograr los objetivos de desarrollo sostenible (*FAO, 2014*).

2. CONTAMINANTES QUIMICOS EN ALIMENTOS

La seguridad alimentaria tiene como objetivo que los alimentos sean saludables. Se ha de asegurar un sistema de control efectivo además de evaluar el cumplimiento de las normas de la Unión Europea (UE), gestionar las relaciones internacionales con países no pertenecientes a la UE, gestionar relaciones con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y garantizar una gestión de riesgos basada en la ciencia. La FAO trata el concepto de la vulnerabilidad, que puede ser tanto a nivel socioeconómico debido a que algunos habitantes tengan pocos recursos, como el desconocimiento de cuáles son realmente recursos seguros para lograr dicho fin.

Se requiere un compromiso con las instituciones públicas, el sector industrial y productivo que distribuye y transforma el producto para que de esta manera se pueda garantizar la seguridad alimentaria de todos y cada uno de los productos. Es de gran importancia el papel que desempeña el consumidor ya que este ha de informarse o incluso exigir la información necesaria sobre los productos que más tarde serán consumidos por él mismo, para que de dicha manera pueda evitar toxiinfecciones alimentarias provocadas por la mala manipulación y preparación de los alimentos.

El primer eslabón está definido desde que se produce el alimento hasta que es servido en la mesa, engloba el sector agrícola donde este ha de asegurar unas buenas condiciones higiénico-sanitarias adecuadas, un control de contaminantes o plaguicidas para tratar el propio cultivo, además de informar a las autoridades de si hay alguna presencia sospechosa de algún tipo de problema que pueda afectar a la salud humana.

El segundo eslabón se puede definir una vez tenido el producto, el cual va a ser procesado por las industrias alimentarias. En este segundo eslabón, se ha de obligar a ofrecer productos adecuados, previamente pasados por un Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico aplicado en España y en otros países de la UE. Es importante producir y transformar el producto, pero también es esencial su distribución, ya que esta ha de realizarse de forma correcta y adaptada a las condiciones de cada artículo en particular. Debido a esto, se crearon normativas europeas que establecen requisitos de higiene alimentaria que han de cumplir los distintos establecimientos y vías de transporte (AESAN, 2003)

2.1. Definición

Según AECOSAN, los contaminantes son sustancias que no se añaden de forma intencionada a los alimentos pero sí se encuentran en ellos debido a las distintas etapas a lo largo de toda la cadena alimentaria: producción, elaboración, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, envasado, transporte y almacenamiento, o de forma medioambiental, ya que la presencia de estos suelen tener un impacto negativo sobre la calidad de los alimentos pudiendo originar un riesgo para la salud humana (*Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2019*)

Esto ha llevado a establecer unos límites máximos en los que ciertos contaminantes pueden encontrarse en los productos alimenticios, a través del reglamento 1881/2006 del 19 de diciembre de 2006. En este reglamento no se consideran todos los posibles contaminantes, sino solo aquellos que en concentraciones determinadas pueden suponer un riesgo para la salud pública. (*Comisión Europea, 2006*)

La contaminación de los alimentos puede ser física, química o biológica. En este caso, la contaminación que se va a discutir a continuación es la contaminación química, producida cuando los alimentos entran en contacto con sustancias químicas tanto inorgánicas como orgánicas. (*AECOSAN, 2016a*)

2.2. Clasificación

Los contaminantes se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, uno de los criterios más relevantes es clasificarlos dependiendo de su origen, ya sea de origen natural o de origen antropogénico. Es conocido como sustancia o contaminantes de origen antropogénico, aquel que se origina mediante actividades humanas las cuales son desarrolladas de forma diaria como por ejemplo actividades mineras, industriales, domésticas, entre otras. Por lo contrario, se conoce como sustancia de origen natural como aquellas sustancias que proceden de fuentes naturales. A continuación, se detallan algunos contaminantes en función de su origen.

2.2.1. De origen natural

2.2.1.1. Micotoxinas

Son denominadas toxinas fúngicas y son compuestos químicos no antropogénicos originados por determinadas especies de mohos los cuales crecen sobre los alimentos

en determinadas condiciones de humedad y temperatura. Estas micotoxinas son un riesgo para la salud tanto en humanos como en animales.

Dentro de las micotoxinas caben destacar aquellas que son producidas por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* que tienen una producción óptima a temperaturas de entre 24 y 28 °C, temperaturas comunes de ambientes tropicales. Estas micotoxinas se introducen en la cadena alimentaria a través de cultivos de cereales destinados a alimentos y piensos. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)

2.2.1.2. Otras toxinas naturales

Dentro de este grupo hay que mencionar los alcaloides del opio, los alcaloides de pirrolizidina y los alcaloides del tropano encontrados en plantas de la familia *Brassicaceae*, *Solanaceae* y *Erythroxylaceae*. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)

2.2.1.3. Otros contaminantes de origen natural

No todos los alimentos que sean naturales implican que sean sanos ya que algunos alimentos contienen de forma natural sustancias tóxicas que pueden provocar riesgos para la salud humana. Ningún alimento está libre de facilitar sustancias tóxicas, aunque estas estén en una pequeña proporción. Entre los principales contaminantes de origen natural que nos podemos encontrar, cabe destacar los siguientes:

- Histamina

La intoxicación por este contaminante es uno de los más habituales debido al consumo de pescado el cual no ha sido refrigerado correctamente. Se encuentra de forma natural como vasodilatador y es producido por una enzima denominada descarboxilasa proveniente de algunas bacterias. Se encuentra principalmente en los pescados azules como pueden ser el atún, sardinas, bonito, entre otros. El consumo de histamina en grandes niveles provoca la denominada "intoxicación histamínica" cuyos efectos son originados relativamente a los minutos o pocas horas de ser ingerida (Elika, 2017).

- Tetrahidrocannabinol (THC)

Es un compuesto psicoactivo natural derivado de la planta de cáñamo *Cannabis sativa*, utilizado para fines industriales. Presenta cuatro esteroisómeros aunque el

principal es el $\Delta 9$ -THC. Se encuentran pocos datos disponibles de los niveles de $\Delta 9$ -THC en alimentos de procedencia animal, aunque los efectos que provocan son el aumento de la frecuencia cardíaca, y dichos efectos, son generados al poco tiempo de ser ingeridos. Se detectó que en el consumo de leche para adultos oscilaba el 0,001 y 0,03 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corporal y para niños entre el 0,006 y 0,13 $\mu\text{g/Kg}$ peso corporal y se concluyó que no resultaba un problema para la salud. Según el Reglamento (UE) N° 1307/2013, el contenido máximo de THC se encuentra limitado al 0,2% (p/p) (AESAN, 2020)

- Ácido cianhídrico

El ácido cianhídrico es un líquido incoloro proveniente de la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos los cuales son toxinas vegetales. Los glucósidos cianogénicos están presentes en alimentos como semillas de lino, almendras o yuca, y cuando estos se encuentran dañados las enzimas degradantes hacen que se libere cianuro. También se ha detectado que los huesos de albaricoques crudos pueden llegar a contener altos niveles de ácido hidrocianico, aunque el consumo de la fruta de albaricoque no resulta ser una amenaza para la salud ya que este ácido se encuentra en la semilla del interior del hueso y no tiene contacto con la pulpa del fruto. Se considera que la dosis letal de cianuro es de entre 0,5 y 3,5 mg/Kg de peso corporal. El Panel CONTAM estableció que la dosis de Referencia Aguda (ARfD) para cianuro es de 20 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corporal (AESAN, 2020).

- Furocumarina

Las Furocumarinas se encuentran presentes en muchas plantas relacionadas con la zanahoria, plantas cítricas o incluso plantas medicinales. Son originadas debido al estrés producido en dichas plantas como por ejemplo el daño físico en ellas. Pueden originar problemas gastrointestinales o incluso reacciones cutáneas debido a su ingesta y seguidamente la exposición a rayos UVA (OMS).

2.2.1.4. Nitratos

Los nitratos son compuestos que se encuentran en el medio ambiente de forma natural debido al ciclo del nitrógeno. Dentro de los alimentos, se encuentran principalmente en verduras y hortalizas. También se puede encontrar en aguas superficiales y

subterráneas. El nitrato tiene un nivel de toxicidad relativamente bajo, pero crea mayor preocupación cuando este se convierte en nitrito debido a la reducción mediante una bacteria. Los nitritos presentes en la sangre, producen una oxidación del hierro, encontrado en la hemoglobina, provocando la incapacidad de transportar el oxígeno y originando graves problemas para la salud. (*Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*)

2.2.1.5. Contaminación radiactiva

Los alimentos pueden contener de forma natural radionúclidos, que son transferidos desde el suelo hasta los cultivos los cuales ingerirán posteriormente los animales. En el caso del agua, la radiactividad es transferida a los peces de ríos, mares y lagos. Por lo general, la presencia de estas sustancias en alimentos y en aguas potables son muy bajos, pero no se debe obviar que sus concentraciones pueden ir variando dependiendo de numerosos factores como pueden ser el clima, las prácticas agrícolas o incluso la geología local. La unidad internacional de radiactividad habitual para expresar que un alimento está contaminado por radiación es el Becquerel (Bq) (*Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*)

2.2.2. De origen antropogénico

2.2.2.1. Metales pesados

Los metales pesados son los principales contaminantes químicos inorgánicos que se pueden encontrar en los alimentos. Son elementos químicos cuya densidad relativa es elevada al igual que su toxicidad hacia el ser humano. A medida que la densidad relativa de estos aumenta, no implica que su toxicidad lo haga de la misma manera ya que algunos no son especialmente tóxicos, sino esenciales para el ser humano. La peligrosidad de los contaminantes inorgánicos proviene de la actividad industrial o minera, ya que sus residuos pueden perdurar en el ambiente durante cientos de años provocando la contaminación de suelos y las aglomeraciones en plantas y tejidos orgánicos. Dentro de los metales pesados más tóxicos están el mercurio, plomo y el cadmio. (*Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*)

2.2.2.2. Residuos de productos fitosanitarios

Los productos fitosanitarios, también conocidos como plaguicidas o pesticidas, que se utilizan para proteger los productos vegetales de los organismos nocivos y a su vez mejorar la conservación de estos. El uso de pesticidas en la cosecha hará que estos

productos permanezcan en los alimentos producidos de manera que en grandes cantidades pueden perjudicar a la salud.

2.2.2.3. Contaminantes orgánicos persistentes (COPs)

Los Contaminantes orgánicos persistentes son sustancias muy resistentes debido a la degradación debido a la fortaleza del enlace carbono-cloro. Son de elevada toxicidad provocando graves problemas para la salud humana y grandes contaminaciones en el medio ambiente. Los COPs son ingeridos a través de los alimentos sobre todo de procedencia animal, ya que estos se acumulan en la grasa de los animales pudiendo ser ingeridas por el ser humano. *(Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)*

2.2.2.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

Este grupo está formado por más de 100 sustancias químicas, que se forman durante la combustión incompleta de sustancias orgánicas como el carbón, el petróleo y la gasolina. Este tipo de sustancias están presentes debido a la contaminación ambiental y a acciones como fumar e incluso secar o calentar alimentos. Los alimentos principales que contienen este tipo de contaminantes son los cereales, el pescado (ahumado) y alimentos ricos en grasas preparados, generalmente, a la parrilla. *(Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)*

2.2.2.5. Acrilamida

Es una sustancia química de origen natural proveniente del almidón que provoca problemas para la salud cuando sufre procesos de cocinado a elevadas temperaturas (>120°C) y a baja humedad. Se producen principalmente por los azúcares y aminoácidos presentes en muchos alimentos. Pueden ocasionar graves consecuencias en el ser humano, como en el aumento de probabilidad del desarrollo del cáncer. *(Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)*

2.2.2.6. 3-MCPD, glicidol y sus ésteres

El 3-monocloropropano-1,2-diol comúnmente conocido como 3-MCPD, es un contaminante formado durante el procesamiento de los alimentos, detectado en salsa de soja y en aceites refinados como aceites de palma. Su consumo en grandes cantidades provoca problemas renales, además, pueden ser causantes del desarrollo de tumores benignos. *(Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)*

A modo de resumen, la **Tabla 1** recoge los principales contaminantes químicos tanto de origen natural como de origen antropogénico.

Tabla 1. Distintos contaminantes, su procedencia y nivel de toxicidad. (*Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*).

Tipo de Contaminante	Origen	Presencia del contaminante	Nivel de toxicidad
Metales Pesados	Antropogénico/Natural	Cualquier alimento	Elevado
Productos fitosanitarios	Antropogénico	Vegetales	Elevado
Micotoxinas	Naturales	Cereales	Elevado
Nitratos	Antropogénico/Natural	Hortalizas	Bajo
COPs	Antropogénico	Alimentos de procedencia animal	Elevado
Acrilamida	Antropogénico	Alimentos con gran contenido en almidón	Elevado
PAHs	Antropogénico	Pescado	Elevado
3-MCPD, glicidol y éteres	Antropogénico	Salsa de soja, Aceite de girasol	Elevado
Toxinas Naturales	Naturales	<i>Brassicaceae</i>	Elevado
Contaminación Radiactiva	Naturales	Cualquier alimento	Bajo

Como se ha destacado en la **Tabla 1** hay contaminantes que pueden encontrarse tanto de forma natural como de forma antropogénica. En el caso de los metales pesados o los nitratos, pueden ser añadidos mediante actividades agrícolas o por el contrario pueden ser producidos de forma natural. La acrilamida es un compuesto que se produce abundantemente en los alimentos debido a etapas de procesado/calentamiento (fritura, tostado, asado,...) de los mismos. Por tanto, se trataría en este caso de un contaminante de carácter antropogénico. Un caso en particular con respecto a los metales pesados, es que algunos suelos pueden ser ricos en arsénico y este puede transferirse a lo que se cultive en dichos suelos, por lo que en este caso la contaminación por parte del arsénico es de forma natural. Esto es muy

común en el cultivo de arroces; la elevada cantidad de arsénico en arroz se atribuye a su presencia en suelos.

En Andalucía se desarrolló un Plan de control de peligros químicos (*Consejería de Salud, 2018*) modificado en el año 2018. El objeto de este plan era comprobar que los productos alimenticios en el mercado no presentaban residuos de contaminantes, plaguicidas o de aditivos a niveles mayores de los permitidos en la norma vigente. En este plan se controlan los riesgos químicos asociados a la presencia de micotoxinas, nitratos, metales pesados, dioxinas, residuos de plaguicidas, entre otros. En el periodo del 2008 al 2010 se realizó un estudio de muestras en las distintas provincias como puede observarse en la **Figura 1**. Se analizaron en laboratorios provinciales detectándose un total de 55 conformidades suponiendo el 2% del total de las muestras analizadas, distribuyéndose como indica la **Figura 2**.



Figura 1. Distribución de las muestras analizadas en Andalucía durante el periodo 2008-2010. (*Consejería de Salud, 2011*)

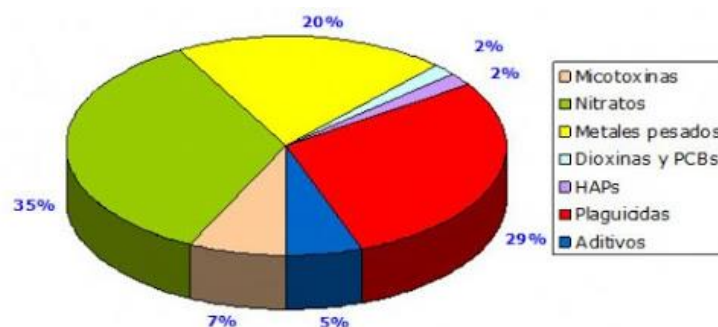


Figura 2. Distribución de los diferentes contaminantes determinados en el 2% de las muestras contaminadas. (*Consejería de Salud, 2011*).

3. TOXINAS NATURALES

Dentro de los contaminantes mencionados, este trabajo de fin de grado pone el foco en los alcaloides tropánicos que son un tipo de toxina de origen natural. Las toxinas naturales son compuestos provenientes de organismos vivos, que pueden ser tóxicos

para el ser humano. Las toxinas naturales suelen ser producidas por plantas, hongos o incluso algas que pueden llegar a ser consumidas de forma directa o indirecta. Los efectos producidos pueden ser desde intoxicaciones agudas, reacciones alérgicas hasta dolor de estómago intenso o incluso la muerte. Algunas toxinas son producidas por plantas debido a su mecanismo de defensa contra insectos, microorganismos, entre otros.

3.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos tóxicos producidos de forma natural por mohos (hongos). Estos mohos pueden crecer en cereales, frutos secos, espinacas y nueces. Se desarrollan tanto de manera previa como después de la cosecha, en el almacenamiento si se presentan las condiciones de humedad y temperaturas cálidas propicias. Se conocen cientos de micotoxinas pero entre las más comunes encontramos la patulina, fumonisinas y nivalenol, las cuales provocan problemas para la salud humana y también para el ganado.

Los síntomas de la ingesta de micotoxinas dependen del tipo de estas, ya que algunas provocan síntomas de forma más o menos inmediata al consumir productos contaminados por micotoxinas o por lo contrario, pueden desarrollarse los síntomas a largo plazo. De los cientos de micotoxinas existentes, alrededor de una docena son las que provocan efectos mayores.

Las aflatoxinas son unas de las micotoxinas más venenosas, las cuales son producidas por mohos de la familia *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* que se desarrollan en los suelos de henos y vegetación en descomposición. Un dato interesante, es que estas toxinas también se pueden encontrar en productos como la leche de animales los cuales han sido alimentados con piensos contaminados de estas toxinas. Un exceso de estas micotoxinas, producen daños en el hígado e incluso pueden llegar hasta dañar el ADN (genotoxicidad). La ocratoxina A es otra micotoxina importante proveniente de las especies *Aspergillus* y *Penicillium* que se suele encontrar en frutos secos, granos de café, cereales, vinos, regaliz, entre otros, provocando fallos renales y efectos perjudiciales sobre el desarrollo fetal. Las principales micotoxinas encontradas en alimentos se reflejan en la **Tabla 2** junto con sus efectos tóxicos (Elika, 2017)

Tabla 2. Principales micotoxinas.

Micotoxinas	Hongo productor	Efectos tóxicos	Alimentos implicados
Aflatoxinas (B1,B2,G1,G2,M1)	<i>Aspergillus</i>	Hepatotóxica, Inmunotóxica	Maíz, arroz, cacahuate, pistachos
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i>	Inmunotóxica, mutagénica, trastornos neurológicos	Maíz, trigo, cebada, cerveza, regaliz, cacao
Fumonisinias (B1 y B2)	<i>Fusarium</i>	Neurotóxica, Inmunotóxica	Maíz, trigo, soja, cebada
Tricotecenos (DON,T2 y HT-2)	<i>Fusarium</i>	Necrosis cutáneas, hemorragias, Inmunotóxica	Centeno, avena, cebada
Zearalenona	<i>Fusarium</i>	Efectos estrogénicos, problemas reproductivos	Maíz trigo, cebada, avena
Patulina	<i>Penicillium</i>	Trastornos neurológicos, nefrotóxica, mutagénica	Manzana, zumos, sidra

Para poder minimizar el riesgo de las micotoxinas es importante que los alimentos no presenten humedad y que estén bien almacenados. El grano no ha de estar dañado ni antes ni después del secado, ya que si este se encuentra dañado es más propenso invasiones de mohos, los cuales generan las micotoxinas.

La OMS junto con la FAO es la responsable de valorar los riesgos para los seres humanos, a través de la contaminación de los alimentos y de recomendar su protección. El Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) realiza evaluaciones de riesgo de micotoxinas en los alimentos. Los gobiernos y la Comisión del Codex Alimentarius utilizan esta evaluación para determinar los niveles máximos de alimentos o proporcionar otras recomendaciones de gestión para controlar o prevenir los riesgos de contaminación. Las reglas del Codex se utilizan como referencias para los suministros alimentarios nacionales y para los comercios, consiguiendo así la tranquilidad de todo el mundo para poder comprar alimentos libres de toxinas.

El JECFA está formado por un grupo de expertos que realizan revisiones científicas cuyos datos obtenidos generaron un nivel máximo de ingesta que pudiese ser tolerable y no generase preocupación para la salud.

Los niveles máximos establecidos en los alimentos son muy bajos debido a la alta toxicidad de estos. Por ejemplo, para las aflatoxinas el CODEX estableció en

diversos frutos secos, cereales y leches entre 0,5 y 15 $\mu\text{g/Kg}$. Otro límite, pero en este caso para la patulina, el Codex estableció en el jugo de manzanas un máximo de 50 $\mu\text{g/L}$.

3.2. Alcaloides tropánicos

3.2.1. Introducción

Los alcaloides del tropano son metabolitos secundarios producidos de forma natural a través de plantas de varias familias como pueden ser *Brassicaceae*, *Solanaceae* y *Erythroxylaceae*. Los extractos de algunas plantas que contiene alcaloides tropánicos como atropina, escopolamina e hiosciamina se han utilizado para fines médicos durante siglos (AECOSAN, 2016b). El grupo de alcaloides tropánicos está presente en más de 200 compuestos, caracterizados de forma general por dos anillos, uno pirrolidínico y otro piperidínico, un solo átomo de nitrógeno y dos átomos de carbono. En la **Figura 3** se muestra como ejemplos dos estructuras de alcaloides tropánicos.

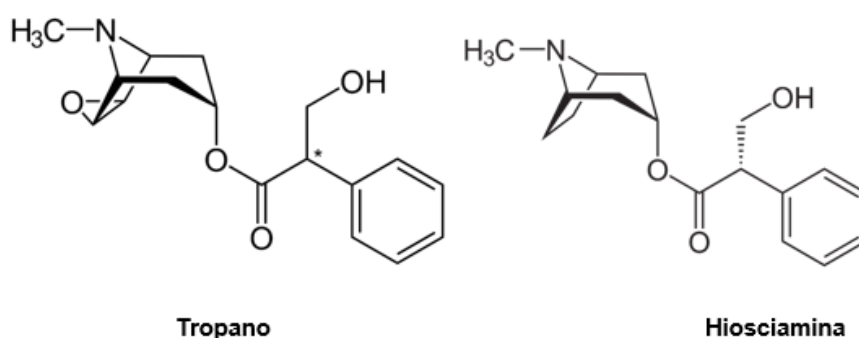


Figura 3. Estructura de los distintos alcaloides.

Los alcaloides tropánicos proceden de plantas de diferentes familias como pueden ser *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Erythroxylaceae*, *Euphorbiaceae*, *Olacaceae*, *Proteaceae*, y *Rhizophoraceae* siendo la más conocida la familia *Solanaceae*. Los géneros como *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Scopolia*, *Anisodus* entre otros, son los que presentan mayor contenido en alcaloides tropánicos. La más conocida por su contenido en alcaloides tropánicos son las del género *Datura*, en concreto la especie *Datura stramonium*, llamada estramonio, floripón, burladora, hierba del diablo, entre otros. Esta planta (**Figura 4**) proviene de la familia de las *solanáceas*, pudiéndose encontrar en zonas cálidas, cuyas semillas se pueden

encontrar en grandes cultivos agrícolas como en semillas de lino, soja y sus productos. (ELIKA, 2011)



Figura 4. *Datura Stramonium* (ELIKA, 2013).

La toxicidad de las plantas de *Solanáceas* se puede achacar a su contenido de alcaloides tropánicos, es decir a la cantidad relativa de atropina, hiosciamina y escopolamina. La ingesta de estos alcaloides se puede desarrollar de manera intencionada o de forma involuntaria. En el caso de la ingesta de forma involuntaria, se debe a la contaminación de alimentos por este tipo de plantas o por ser consumidas de forma accidental (Chan, 2017). Los alcaloides tropánicos pueden provocar graves problemas para la salud humana, pero si son suministrados en dosis bajas, pueden llegar a ser beneficiosos para tratamientos médicos. Los efectos que suelen producir en humanos son mareos, visión borrosa, vómitos, piel roja, taquicardia, o incluso puede llegar a ocasionar la muerte.

Los alcaloides tropánicos más relevantes son la (-)-escopolamina y la (-)-hiosciamina siendo ambos ésteres del tropano. La atropina es la mezcla de (-)-hiosciamina y (+)-hiosciamina, compuestos generados debido al carbono α asimétrico del ácido trópico (EFSA, 2013).

3.2.2. Atropina

La atropina está constituida por una mezcla de dos isómeros denominados L- y D-hiosciamina, aunque el isómero L es el responsable de su actividad. En la **Figura 5** se muestra su estructura, que presenta forma de una amina terciaria, soluble en lípidos, constituida por un éster de ácido trópico junto a una base orgánica (EFSA, 2013).

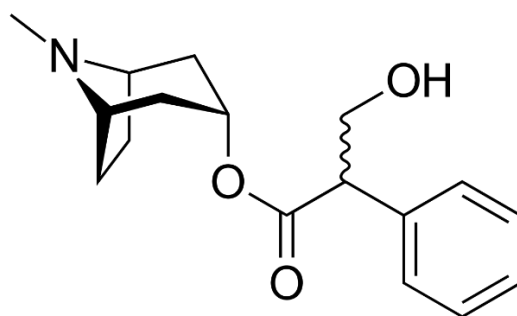


Figura 5. Estructura de la atropina.

Se emplea de manera habitual en el ámbito médico, en el caso concreto como anestésico, para cirugías, cardiologías o incluso en oftalmología. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció una dosis aguda de 0,016 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, aunque dicha dosis es 100 veces inferior a las dosis terapéuticas (ACSA, 2011).

3.2.3. Escopolamina

La escopolamina es un alcaloide obtenido de las plantas de la familia de las *solanáceas*, comúnmente se conoce como borrachero y su fruto como cacao sabanero. Presentan una treintena de semillas las cuales contienen la suficiente dosis de escopolamina como para intoxicar a un adulto (Bernal et al., 2013). Su estructura, que se puede observar en la **Figura 6**, está constituida por ésteres orgánicos de un ácido aromático y una base nitrogenada terciaria. Su estructura es muy parecida a la de la atropina, pero en este caso contiene un grupo epóxido.

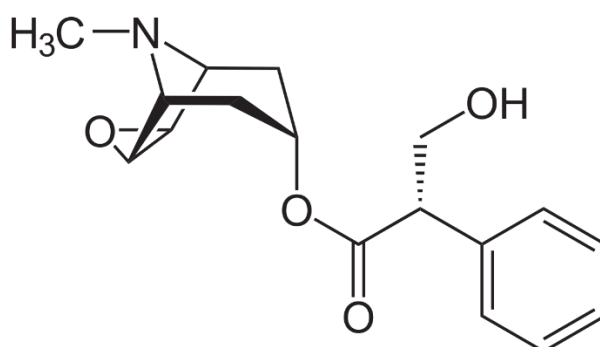


Figura 6. Estructura de la escopolamina.

Los síntomas que ocasiona la ingesta de escopolamina son sequedad de la boca, dificultad para hablar, dilatación pupilar, hipertensión, entre otras. La intoxicación por escopolamina, puede llegar a ocasionar síntomas de alucinaciones o alteraciones en

el estado de ánimo, por lo que se puede llegar a utilizar para implicaciones psiquiátricas. (Bernal et al., 2013).

Las intoxicaciones mediante escopolamina, puede ocurrir de forma involuntaria o por ingesta intencionada de vegetales. La ingesta de forma involuntaria puede originarse en alimentos como el alforfón o el maíz, o por ingesta de los frutos de la propia planta, ya que puede llegar a confusión con frutos como en el caso de los de *Atropa Belladonna* que puede llegar a confundirse con moras (Chen et al., 2016).

3.2.4. Normativa sobre alcaloides tropánicos

En el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión del 19 de diciembre de 2006, se fijó el contenido máximo de algunos contaminantes en los productos alimenticios, pero este no incluye el contenido máximo de alcaloides tropánicos en alimentos. (Comisión Europea, 2006). Sin embargo, se hizo una modificación en el año 2016 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 con respecto al contenido máximo de alcaloides tropánicos en alimentos en base de cereales para lactantes y niños. El contenido máximo fijado, tanto para escopolamina como para atropina, fue de 1 µg/kg. Se hizo una recomendación por parte de la Unión Europea, Recomendación (UE) 2015/976 de la Comisión de 19 de junio de 2015, con respecto al seguimiento de la presencia de alcaloides tropánicos en alimentos (Comisión Europea, 2016). En este se recomienda controlar la presencia de alcaloides tropánicos dándole importancia a productos sin gluten o cereales cuyo fin es producirá través de estos, alimentos para lactantes de niños con corta edad, legumbres frescas, té e infusiones.

En estos casos, el límite de cuantificación de atropina y escopolamina no ha de ser superior a 10 µg/kg y preferiblemente inferior a 5 µg/kg en el caso de infusiones o productos agrícolas. En el caso de cereales, legumbres o productos acabados, preferiblemente no ha de ser superior a 2 µg/kg.

Con el fin de proteger la salud pública, el artículo 2 del Reglamento (CEE) n° 315/9310 el Consejo acordó que cuando fuese necesario se han de implantar unas tolerancias máximas para algunos contaminantes específicos. De acuerdo con el Reglamento (UE) n° 37/2010 de La Comisión para sustancias farmacológicamente activas, define a la *Atropa belladonna* y la atropina como sustancias permitidas, aunque siempre respetando unos valores límite, como ya se ha indicado anteriormente. Con respecto a la alimentación animal, la cantidad de semillas de malezas y frutas sin moler o sin triturar, los cuales contienen alcaloides, ha de ser inferior a 3000 mg/Kg y

siendo más concretos, para semillas de *Datura* ha de ser inferior a 1000 mg/Kg. (EFSA, 2013)

3.2.5. Antecedentes. Estudios de la presencia de alcaloides tropánicos en alimentos

La detección y determinación de contaminantes orgánicos en alimentos es relativamente compleja debido a que se necesitan equipos sofisticados y además, existe un número elevado de variedades, incluyendo también, compuestos con propiedades fisicoquímicas muy variables a niveles de concentración bajos.

Una de las metodologías más utilizada para determinar contaminantes orgánicos a nivel de multi-residuo es el acoplamiento cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS). Es una técnica con una elevada selectividad y sensibilidad para análisis de compuestos apolares, volátiles y térmicamente estables. En el caso de la atropina y la escopolamina se ha de introducir una etapa de derivatización para poder determinarlos mediante GC-MS. De esta manera, es por lo que cada vez se utiliza más la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) (Ibañez, 2018). Existe el consumo accidental de hojas de *Datura innoxia* ya que esta contiene un aspecto muy parecido y pueden llegar a confundirse con hojas de espinacas (**Figura 7**). El último caso notificado fue en 2019 donde 108 personas fueron hospitalizadas en Turquía tras ingerir espinacas supuestamente contaminadas de escopolamina y atropina (Castilla et al., 2021).

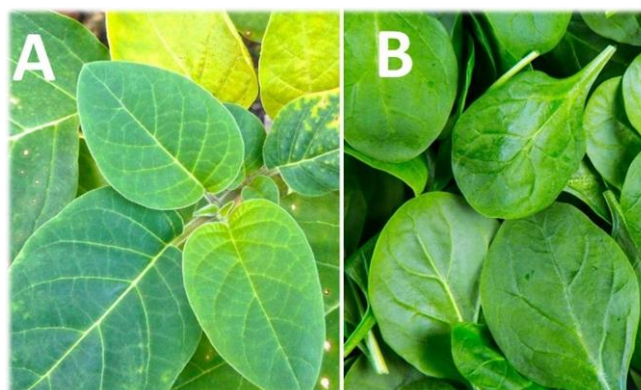


Figura 7. Hojas de *Datura innoxia* (A) y espinacas (B) (Castilla et al., 2021)

Otro caso detectado fue en Uganda en 2019, ocasionado por un producto conocido como “Súper Cereal”. Entre el 13 y 20 de marzo de 2019 se detectaron un total de 278 casos relacionados con la ingesta de este cereal con un total de cinco muertes

asociadas. Los síntomas que presentaron las personas que ingirieron este cereal fueron dolor de cabeza, dolor abdominal, boca seca, entre otros. Se hicieron varios estudios con ayuda de distintos laboratorios y todos ellos afirmaron la presencia de alcaloides tropánicos, como atropina y escopolamina en concentraciones de elevado nivel (*Haughey et al., 2020*).

Se realizó un estudio con muestras de cereales para bebés localizadas en un supermercado de Almería, en España, dando como resultado presencia de escopolamina, atropina y apoatropina aunque no se tienen datos de haber ocasionado problemas para la salud debido a estos contaminantes (*Marín et al., 2019b*).

4. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO DE ALCALOIDES TROPÁNICOS

Es esencial conocer la presencia de los alcaloides tropánicos tanto en productos alimentarios primarios como en sus derivados, para así, poder velar por la seguridad alimentaria. La autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó un artículo en 2016 donde se detallaba la presencia de alcaloides tropánicos en Europa en los últimos años (*Comisión Europea, 2016*). También se publicaron los métodos de análisis más habituales utilizados para identificarlos en los distintos alimentos. Se hace especial referencia a la cromatografía de gases (GC) y a la cromatografía de líquidos (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, HPLC-MS) como sistema de detección. Previamente se le ha de realizar una purificación para poder extraer los alcaloides tropánicos con la ayuda de disolventes, como pueden ser el metanol o el acetonitrilo. También se ha de purificar la muestra, haciéndola pasar por un filtro, para luego poder introducir el extracto en un cromatógrafo de líquidos o de gases, los cuales presentan columnas C18 (sílice adulterada con cadenas de dieciocho carbonos), para que por último se detecten en un espectrómetro de masas (*Mulder et al., 2016*).

En el caso de que existan gran variedad de analitos de interés en la misma muestra, es recomendable la HPLC con columna de fase reversa tipo C18 acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, ya que este presenta una elevada sensibilidad y precisión. En este apartado se va a desarrollar los procedimientos, descritos en la **Figura 8**, para aislar, determinar y cuantificar los alcaloides tropánicos a partir de la muestra.

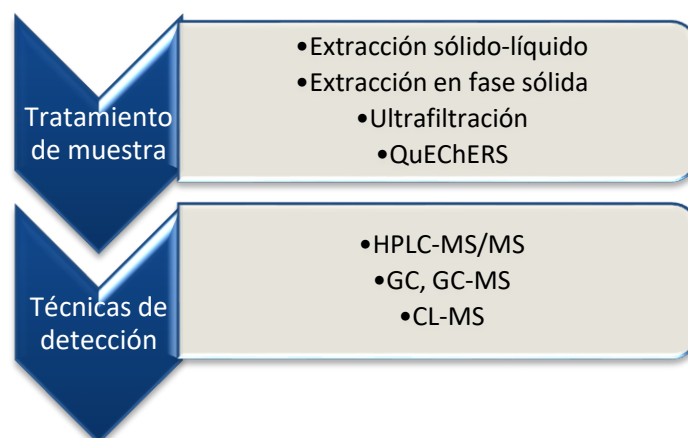


Figura 8. Etapas principales de los métodos analíticos.

4.1. Tratamiento de muestra

Como se ha descrito anteriormente en la **Figura 8**, el tratamiento de la muestra en alimentos está basado principalmente en la extracción sólido-líquido (SLE), extracción en fase sólida (SPE) y el método de QuEChERS, que es un método muy extendido basado en la combinación de los dos procedimientos anteriores.

4.1.1. Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido (SLE) es uno de los métodos de tratamiento de muestra para análisis de alimentos más común. Se utilizan disolventes moderadamente polares que mejoran la extracción de los alcaloides tropánicos en un medio acuoso/orgánico, originando condiciones ácidas que provocan la protonación de la estructura haciéndolos elevadamente polares (Gonçalves et al., 2020).

Este proceso se lleva a cabo mediante el contacto de una cantidad de muestra con el disolvente adecuado. Posteriormente, la mezcla es sometida a diversos procesos dependiendo de la fortaleza de las interacciones presentes entre analito-matriz. Siempre se ha de asegurar la extracción completa del analito, extrayendo la máxima cantidad de interferencias, ya que estas pueden llegar a causar problemas a la hora de determinar el analito de interés (Cámara, 2004). Dentro de los procesos de extracción sólido-líquido caben destacar las siguientes modalidades: extracción Soxhlet, extracción con fluidos supercríticos, y extracción asistida por microondas. A continuación, se pasan a describir los métodos más importantes.

4.1.1.1. Extracción Soxhlet

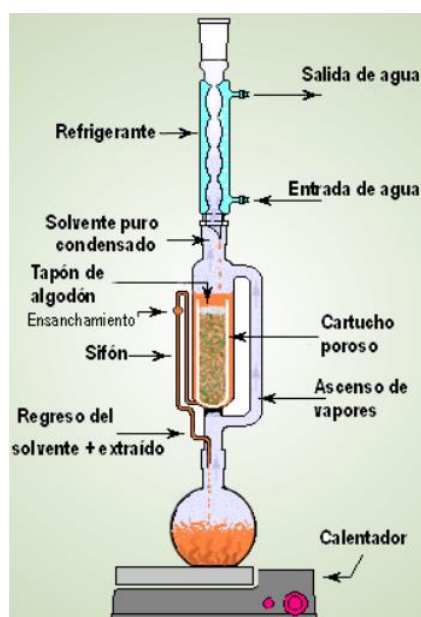


Figura 9. Esquema de una SLE tipo Soxhlet (Núñez, 2008)

En esta técnica la muestra se pone en contacto de forma continua con el disolvente condensado el cual procede de un matraz de destilación. Cuando el disolvente alcanza un nivel determinado, el disolvente que contiene el analito es devuelto al matraz de destilación mediante un sifón. Este proceso se repite sucesivamente hasta conseguir la extracción de forma completa. Debido a que se utiliza una cantidad más o menos elevada de disolvente, este se ha de evaporar posteriormente. Con esta técnica se consigue la extracción de analitos los cuales están fuertemente atraídos a la matriz. Hay que tener en cuenta que esta técnica se ha de utilizar cuando el analito que queremos determinar es resistente a la temperatura de ebullición del disolvente, de esta manera nos aseguramos que no haya pérdida por volatilización (*Rodríguez et al., 2007*). En la **Figura 9** se muestra un esquema de una extracción sólido-líquido tipo Soxhlet. Como ventaja principal, esta técnica presenta como ventaja principal el reducido coste del montaje y la eficacia de extracción para algunos casos como la determinación del contenido graso total. Sin embargo, se emplean elevadas cantidades de disolventes tóxicos y requiere tiempos de extracción muy altos. Por último, los extractos obtenidos suelen requerir etapas adicionales de purificación. Por este motivo, el uso de este método no está tan extendido para la determinación de contaminantes en alimentos.

4.1.1.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Se define un fluido supercrítico (FS) aquel que tiene la temperatura y la presión por encima de sus valores críticos. Los FS presentan propiedades adecuadas para la extracción de compuestos orgánicos en muestras sólidas, debido a que la viscosidad de los FS es entre 5 y 20 veces inferior a la de un líquido, mejorando la eficacia del proceso de extracción. El fluido supercrítico más empleado es el CO₂ ya que es químicamente inerte, no tóxico y su punto crítico puede alcanzar los 31°C y 71,8 atm.. En el caso de que los compuestos sean polares, se utilizará N₂O (Rodríguez *et al.*, 2007). En la **Figura 10**, se muestra el proceso de extracción con fluidos supercríticos.

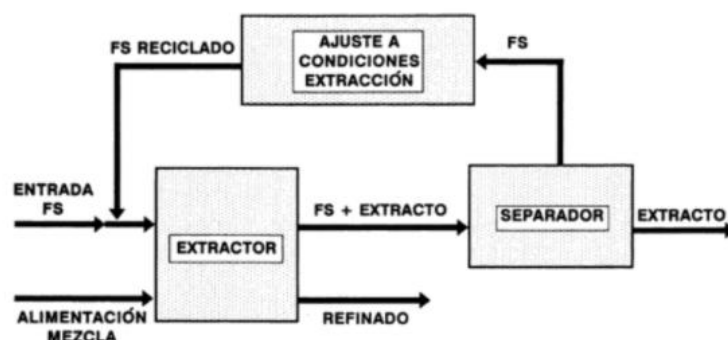


Figura 10. Proceso de extracción con fluidos supercríticos que incluye reciclado del FS (Rodríguez *et al.*, 2007).

4.1.1.3. Extracción asistida por microondas (EAM)

Diversas investigaciones han estudiado la extracción asistida por microondas para la obtención de compuestos activos y metabolitos secundarios. Algunas ventajas de dicha extracción son el uso de solventes a altas temperaturas donde estos se introducen en la matriz con mayor facilidad y a su vez extraen los compuestos de interés, se reducen los tiempos de extracción donde suelen ser inferiores a 30 min y originan altos rendimientos de extracción.

En esta extracción, representada en la **Figura 11**, la muestra se introduce en un recipiente de teflón junto con el disolvente y ambos son sometidos a microondas. De esta manera conseguimos que el disolvente se caliente produciendo una extracción eficaz en un tiempo relativamente corto (Rodríguez *et al.*, 2007).

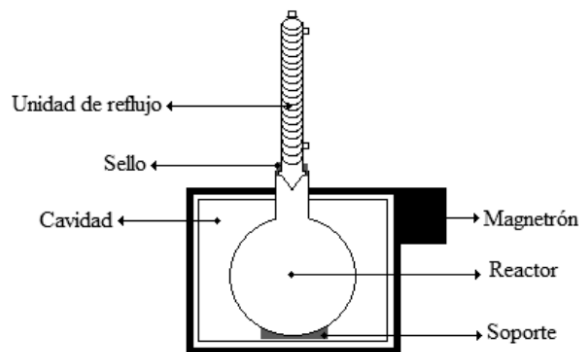


Figura 11. Diagrama de equipo EAM (Mosquera, 2012)

4.1.2. Extracción en fase sólida (SPE)

Es una de las técnicas más utilizada para muestras líquidas e incluso gaseosas. Mediante la SPE se consigue purificar y concentrar los analitos de interés mediante la retención selectiva de los mismos en una fase sólida, que suele tener unas propiedades similares a las fases estacionarias empleadas en HPLC. Presenta diversas ventajas, como la baja manipulación de la muestra, alto poder de concentración, bajo consumo de disolvente y presenta la posibilidad de poder ser automática. El adsorbente se encuentra retenido en discos, cartuchos o jeringas,

Figura 12. Los discos permiten utilizar muestras de 2 a 4 L.

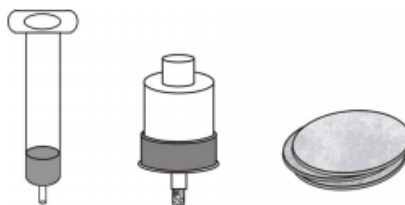


Figura 12. Formatos de SPE: jeringa, cartucho y discos (Canosa, 2008)

Para poder hacer dicho proceso se necesita una preparación de la muestra, mostrado en la **Figura 13**. La primera etapa es denominada acondicionamiento de la fase estacionaria, donde se pasa a través del cartucho un disolvente para poder eliminar así las impurezas e hidratar la fase estacionaria, ya que de esta manera se facilita la transferencia de materia. Una segunda fase denominada como el paso de la muestra a través del material adsorbente, donde el objetivo es retener los analitos de interés y conseguir cierto grado de selectividad. Una tercera etapa de lavado, donde se utilizan disolventes con gran afinidad por las interferencias que nos pueden perjudicar a la hora de determinar nuestros analitos de interés. Por último, hay una etapa de elución donde con disolventes adecuados, recuperamos el analito de la fase adsorbente. Para

ello se utiliza un volumen de disolvente pequeño. Las fases adsorbente más comunes en SPE son la de sílice enlazada, carbón grafitizado, sílica gel y óxidos de aluminio (Canosa, 2008).

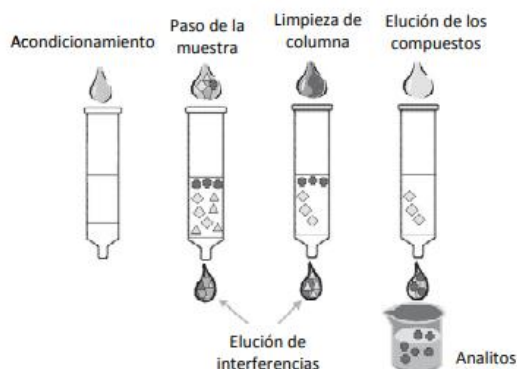


Figura 13. Esquema de preparación de muestra mediante SPE (Canosa, 2008).

4.1.3. QuEChERS

Para poder garantizar unos resultados precisos y fiables, hay etapas decisivas como son la preparación de la muestra y la extracción. Entre los procesos de extracción cabe destacar la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) debido que es uno de los métodos más rápidos y sencillos. Así fue denominado el método QuEChERS cuyo nombre viene del acrónimo inglés de “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*” que traducido al español viene a referirse como rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro.

El método QuEChERS (**Figura 14**) permite la extracción de un gran número de residuos de una forma simplificada. Consiste en una combinación de dos etapas: en la primera de ellas se produce una extracción sólido-líquido simple, típicamente con acetonitrilo, añadiendo diversas sales como sulfato de magnesio, cloruro sódico y acetato de sodio para reducir la solubilidad de los compuestos de interés en la fase original por efecto salino. En la segunda fase se lleva a cabo una extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Esta última etapa se realiza adicionando sulfato de magnesio y un sorbente, generalmente, una amina primaria y secundaria o incluso grafito, que sirve para eliminar compuestos interferentes. Cada una de las sales mencionadas anteriormente presenta diferentes funciones a la hora de realizar la fase de extracción:

- Sulfato de magnesio (MgSO_4): se utiliza para mejorar la recuperación del analito debido a que retiene el agua.

- Cloruro Sódico (NaCl): ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación entre la fase acuosa y orgánica.
- Acetato de Sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$): ayuda a la regulación del pH.

En la segunda etapa, como ya se ha mencionado anteriormente, se realiza una limpieza del extracto mediante una extracción en fase dispersiva. En esta etapa facilita la eliminación del agua y compuestos en la matriz los cuales pueden provocar interferencias a la hora de realizar el análisis. Los sorbentes y sales más empleados en esta etapa son:

- Amina primaria/secundaria: se utiliza principalmente para eliminar ácidos orgánicos o pigmentos.
- Sulfato de Magnesio: se utiliza para eliminar el exceso de agua.
- Sorbente C_{18} : elimina grasas, esteroides e interferencias no polares de la muestra
- Carbón negro grafitizado: Elimina pigmentos de la muestra como clorofilas y carotenoides.

Una vez terminada la etapa de extracción, el extracto puede analizarse mediante cromatografía de gases o cromatografía líquida (*Fuentes et al., 2010*).

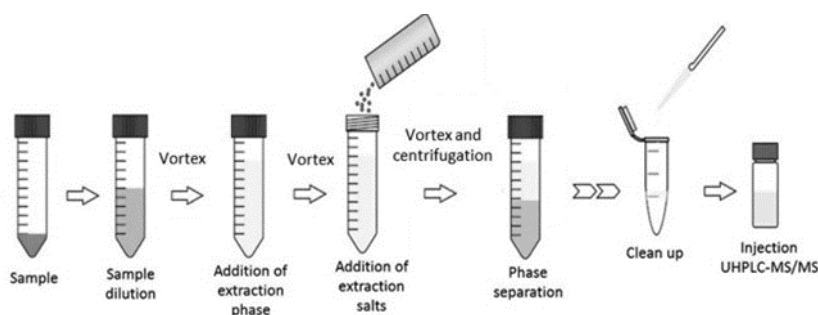


Figura 14. Procedimiento en una extracción QuEChERS (*Amaral et al., 2016*). En un Tubo Falcon con muestra sólida se adiciona el disolvente extractor el cual contiene sales, durante este procedimiento se aplica agitación en vortex. Por último, se centrifuga. Se toma la alícuota correspondiente y se introduce en un vial preparado para el análisis.

4.2. Etapa de determinación

La alta polaridad de los alcaloides tropánicos requiere el uso de mezclas de agua, metanol o acetonitrilo para su extracción tanto en matrices animales como en material vegetal. Las propiedades fisicoquímicas de estas especies hacen que el análisis por cromatografía líquida sea el método más adecuado. No obstante, también se ha utilizado la cromatografía de gases, empleando reacciones de derivatización. Con la mejora de la instrumentación, la mayoría de los métodos utilizados se basan en la LC-

MS/MS o en la cromatografía líquida-espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) (Gonçalves et al., 2020). A continuación, se pasan a desarrollar los métodos utilizados para la determinación de los alcaloides tropánicos.

4.2.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación que presenta una gran resolución para analizar muestras complejas, aunque se encuentra restringida para especies relativamente volátiles y poco polares. La **Figura 15** muestra un esquema de la configuración típica de un equipo GC. En esta técnica se inyecta una pequeña cantidad de muestra la cual será separada por una corriente de gas inerte a una temperatura elevada.

Al inyectar la muestra se ha de asegurar la completa vaporización de la misma de forma más o menos inmediata. Los componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria (dispuesta dentro de una columna), siendo las más utilizadas las columnas capilares. La columna se encuentra dentro de un horno termostatzado. El objetivo de esta técnica es la separación de los componentes que en este caso se producen por la diferente volatilidad y afinidad hacia la fase estacionaria de cada uno de los componentes a separar por la columna, y por el tiempo de retención en la columna. Gracias a las diferentes afinidades por la fase estacionaria de los componentes de la muestra, se consigue la separación de estos (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Los gases portadores en cromatografía de gases no afectan a la separación, debido a que no tienen influencia sobre los procesos de sorción-desorción, por lo que no afectan a la selectividad de esta. El control de la velocidad del gas portador a través de la columna, se realiza mediante válvulas que suministran el caudal constante.

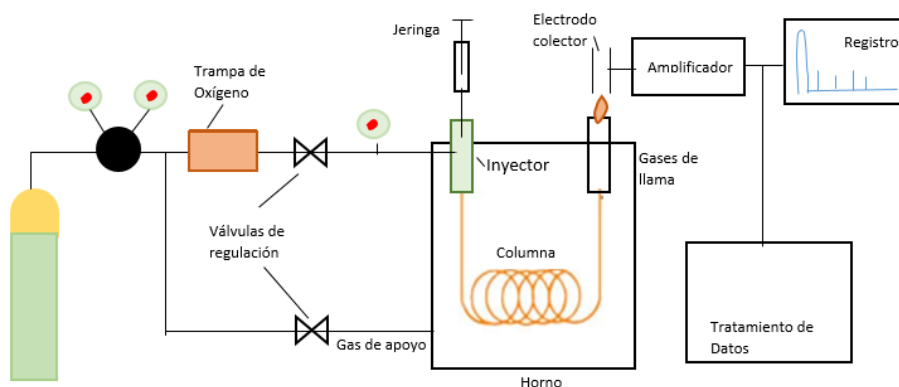


Figura 15. Esquema de un cromatógrafo de gases

4.2.2. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases, como ya se ha mencionado anteriormente, es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas complejas. Tiene como desventaja que una vez separados los componentes, detectados e incluso cuantificados, solo obtenemos como resultado los tiempos de retención de los distintos componentes. En el caso de muestras complejas, el cromatograma presenta gran cantidad de picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil su identificación de manera rápida y fiable. (*Gutiérrez y Droguet, 2002*). Cuando se analiza una muestra que contiene un elevado número de componentes, estos datos no son suficientes para realizar una identificación inequívoca.

Para poder resolver esta situación, se ha combinado la técnica de cromatografía de gases con la espectrometría de masas (GC-MS), dando origen a las llamadas técnicas híbridas, que permite realizar la separación y a su vez la identificación de muestras complejas. Ambas técnicas trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra para realizar el análisis. Al introducir una mezcla de compuestos en un cromatógrafo de gases, estos se separarán en la columna cromatográfica obteniendo la elución de los componentes que pasan de forma sucesiva al espectrómetro de masas. El espectrómetro de masas actúa a su vez como detector cromatográfico. Cada componente se registra en forma de pico cromatográfico dando lugar a un cromatograma total de iones. Por otra parte, la información del tiempo de retención es complementada con el espectro de masas respectivo.

4.2.3. HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido la técnica de separación más utilizada. Es una técnica idónea para separar compuestos polares, térmicamente inestables y pocos polares, sin tener que incluir ninguna etapa previa al análisis de derivatización. En esta técnica se pueden distinguir dos tipos de fases, una de ellas estacionaria que se encuentra en el interior de la columna y la otra es una fase móvil que pasa a través de la fase estacionaria mediante bombas de alta presión.

La composición y la polaridad de la fase móvil son conocidas y controladas, ya que se puede trabajar con una composición constante, conocida como modo

isocrático, o por lo contrario con una variación en la composición conocida como modo de trabajo en gradiente.

En ambos casos, al inyectar los analitos, empleando una válvula rotatoria multiposición, estos son insertados a la columna. Las interacciones de los diferentes componentes de la muestra con la fase estacionaria dependen de la naturaleza de cada uno de ellos, lo que implica que unos componentes sean más retenidos en la columna y no se eluyan de forma sencilla debido a la afinidad de estos por la fase estacionaria (Gutiérrez, 2019).

4.2.4. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (HPLC-MS)

La espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida se ha extendido en las últimas décadas por su gran aplicación a campos como el control del medioambiente y la seguridad de los alimentos. La unión de una técnica separativa con gran versatilidad (HPLC) y la selectividad propia de la espectrometría de masas proporcionan gran información a nivel estructural y de composición elemental de las especies a partir de experimentos de fragmentación. Los equipos de HPLC-MS pueden tener varios tipos de interfases, aunque la ionización por electrospray (ESI) junto con la ionización química a presión atmosférica (APCI) son los principales métodos. Los iones generados en la interfase son acelerados hacia un analizador y son separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante el empleo de campos eléctricos, magnéticos o combinaciones de ambos. Algunos de los analizadores más comunes que se utilizan son los de cuadrupolo, trampa de iones, tiempo de vuelo y trampa de iones orbital (Orbitrap).

Los iones que llegan al detector producen una señal, la cual es procesada, obteniendo así un espectro de masas donde se representan las abundancias relativas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados. (Grimalt, 2009)

Cuando se trata de matrices complejas, como en este caso alimentos, es esencial una resolución de masa adecuada. En los últimos años la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) ha ganado reputación como una técnica sensible y selectiva ya que permite la adquisición de espectros en modo *full-scan* o barrido

completo, los cuales pueden almacenarse y ser utilizados a posteriori para identificar compuestos desconocidos en la muestra (Lucci et al., 2016).

Por otro lado, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite el aislamiento de un ion, su posterior fragmentación en una cámara de colisión y por último el análisis de la masa de los fragmentos obtenidos. A pesar de su alta sensibilidad y selectividad, los instrumentos LC-MS/MS a veces se ven limitados debido a efectos matriz a la hora de cuantificar a nivel de trazas. Los patrones internos marcados con isótopos estables, proporcionan una solución a estos problemas (Binder, 2008).

Como se ha dicho anteriormente, la cromatografía se utiliza para separar compuestos, pero para poder identificarlos y cuantificarlos se requiere un detector de alta sensibilidad y selectivo. Gracias al acoplamiento a detectores espectrometría de masas de alta resolución como el de tiempo de vuelo (TOF) o la espectrometría de masas en tándem como es el triple cuadrupolo (QqQ) mostrado en la **Figura 17**, es posible desarrollar métodos que cuantifiquen la presencia de los compuestos a determinar mediante su relación carga masa (m/z). Para dicho acoplamiento entre el cromatógrafo y el espectrofotómetro de masas es necesario una fuente de ionización, esto es debido a que los compuestos que salen de la columna salen en estado líquido y el equipo de masas trabaja con muestras en estado gaseoso. La ionización por electrospray (ESI), mostrada en la **Figura 16** es una de las más utilizadas, la cual se caracteriza por producir una ionización suave a presión atmosférica. Consiste en aplicar una diferencia de potencial en el terminal del capilar el cual transporta la fase móvil y la entrada al espectrómetro de masas. La diferencia de potencial junto con el gradiente de presión son los encargados de la entrada de los iones al detector.

En la cámara de desolvatación, la gota adquiere un tamaño cada vez más pequeño, de tal manera que cuando las fuerzas coulombianas de repulsión de las cargas superficiales vencen la tensión superficial de las gotas, estas “explotan” produciéndose paulatinamente una transferencia de las cargas hacia los analitos que tengan afinidad para aceptarlas (Stroobant, 2007).

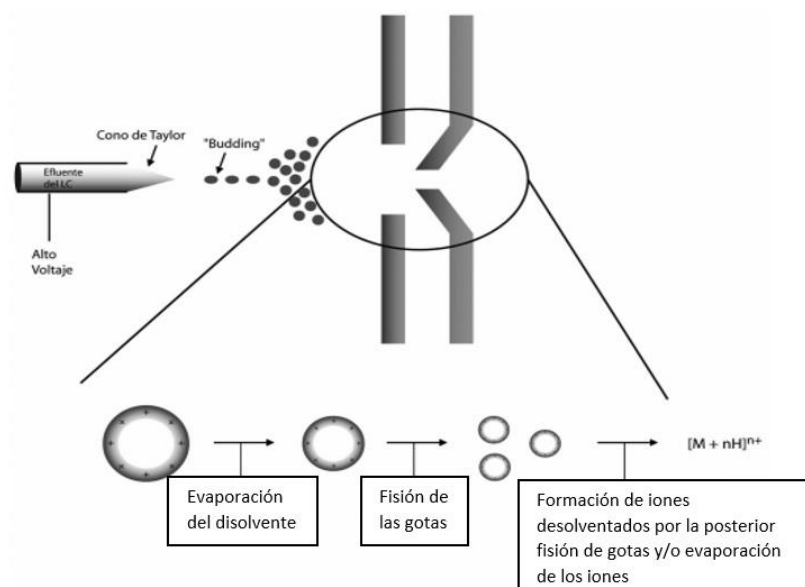


Figura 16. Mecanismo de producción de iones por electrospray (Quintela et al., 2005).

El primer paso consiste en la formación de un cono líquido en la punta del capilar que por la acción de un gas de nebulización y la diferencia de potencial, produce gotas cargadas. Seguidamente, se produce la evaporación del disolvente de la fase móvil junto con los tampones presentes en ella, aumentando de ésta manera la densidad de carga eléctrica en el interior de la gota.

Cuando las fuerzas de repulsión electrostática de las cargas, es superior a la tensión superficial que las mantiene unidas, se produce la fisión de las gotas produciendo gotas de menor tamaño. Este proceso se produce de manera sucesiva hasta producir iones cargados, los cuales entran al espectrómetro de masas.

El analizador que probablemente se emplea más para análisis de residuos de contaminantes es el analizador de triple cuadrupolo (**Figura 17**). El analizador de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos conectados en serie como puede verse en la **Figura 17**, donde el primer cuadrupolo se encarga de seleccionar la relación m/z deseada. El segundo cuadrupolo se denomina celda de colisión donde se produce la fragmentación del ion seleccionado y por último, el tercer cuadrupolo es el encargado de separar los iones formados en el cuadrupolo anterior.

Cada cuadrupolo. consta de cuatro barras metálicas (rodillo) dispuestas en paralelo dos a dos, sobre las que se aplican varios voltajes superpuestos. Los iones, introducidos en el analizador mediante una diferencia de potencial, describen diferentes trayectorias en relación de su m/z y del voltaje particular que se aplique sobre los rodillos del cuadrupolo. Los cuadrupolos pueden establecer una relación m/z determinada donde los iones que la presenten seguirán una trayectoria estable hacia

el detector y el resto presentará trayectorias no estables que saldrán del cuadrupolo chocando con las barras metálicas.

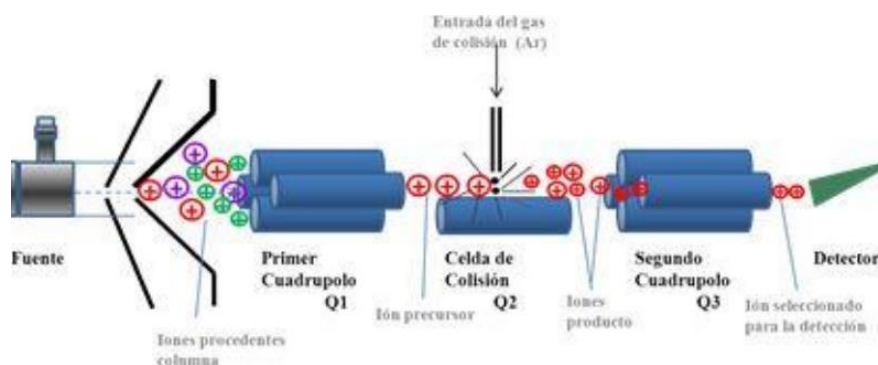


Figura 17. Analizador de triple cuadrupolo (Gargallo, 2007).

La salida de los iones que se dirigen hacia el detector, se realiza dependiendo de la masa de cada compuesto, saliendo primero los compuestos con menor masa atendiendo de esta manera a la segunda Ley de Newton ($F = m \cdot a$).

4.2.5. Otros métodos

Se han encontrado otras técnicas adecuadas para la identificación y cuantificación de alcaloides tropánicos aunque no son relativamente utilizadas (Dey *et al.*, 2020). Entre ellas destacan:

- Cromatografía en columna
- Cromatografía en capa fina
- Espectroscopia infrarroja

5. PRESENCIA DE ALCALOIDES TROPÁNICOS EN ALIMENTOS

A continuación, se detallan aspectos importantes sobre los distintos métodos e investigaciones que se han llevado a cabo para la determinación de alcaloides tropánicos en muestras de alimentos, así como las técnicas cromatográficas utilizadas para su determinación.

Un grupo de investigadores, desarrollaron una metodología para la determinación de alcaloides tropánicos en bayas (Adams *et al.*, 2006). Se trató la muestra mediante SLE, utilizando como extractantes una de amonio en metanol o hidróxido sódico al 10% en metanol. La determinación en este caso se realizó mediante HPLC-MS con un analizador de cuadrupolo, aunque con un analizador de trampa de iones.

Otro caso interesante fue el presente en Eslovenia en el año 2003 donde se produjo una intoxicación en la que estaban involucrados 73 personas donde todas ellas habían consumido harina de trigo sarraceno. Encontraron la presencia de semilla de espino (*Datura stramonium*) que contenía escopolamina y atropina entre otros alcaloides. La extracción se realizó mediante SLE con metanol como disolvente y la determinación tanto de la escopolamina como atropina se llevó a cabo mediante LC-MS/MS utilizando acetato amónico 20mM y acetonitrilo como fases móviles. Para la separación se utilizó una columna rellena de RP-C₁₈ (Perharic et al., 2013).

En otro trabajo reciente (Shimshoni et al., 2015), se ha propuesto un método para la determinación de la presencia de alcaloides tropánicos en muestras de té. La muestra fue preparada mediante una etapa de SLE con ayuda de una disolución de ácido acético en metanol en proporción 1:2. Se realizó la determinación de alcaloides mediante LC-MS/MS utilizando 0,5% de ácido fórmico y metanol: agua: ácido fórmico (94:5:5) como fases móviles. A ambas fases se les añadió 0,1 mM de ácido oxálico y 2,0 mM de acetato amónico. Como columna para su determinación se utilizó una columna Thermo Hypersil Gold C₁₈.

Otro grupo de investigadores (Mulder et al., 2015) propuso un método para la determinación de alcaloides tropánicos en muestras de cereales para niños de corta edad y para lactantes. La preparación de la muestra se realizó mediante SLE utilizando como extractante (metanol: agua: ácido fórmico, 60:40:0,4). Previamente a realizar la determinación de la muestra, esta se pasó por un ultrafiltro 30 kDa para su previa purificación. La determinación se realizó mediante HPLC-MS/MS utilizando como fases móviles una disolución acuosa 6,5 mM de hidróxido amónico e hidróxido amónico 6,5 mM en acetonitrilo: agua con una proporción de 90/10. Al igual que en casos anteriores, la columna estaba rellena de RP-C₁₈.

En otro estudio realizado por León y col. (León et al., 2015) se propuso un método para la determinación de alcaloides en muestras de pienso. Las muestras fueron preparadas mediante una extracción QuEChERS utilizando acetonitrilo con un 1% de ácido acético como disolvente extractor. El extracto obtenido se centrifugó y se filtró mediante un filtro de 0,22 µm. Para su análisis se utilizó HPLC-MS/MS utilizando como fases móviles una disolución acuosa de ácido acético al 0,1 y una mezcla de metanol: acetonitrilo (90:10) conteniendo 0,1 % de ácido acético.

Chen y col. desarrollaron una metodología en muestras de alforfón para la determinación de atropina y escopolamina (Chen et al., 2016). La muestra se preparó mediante una extracción QuEChERS con acetonitrilo y una serie de bases. El extracto obtenido fue sometido a una extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) utilizando para su purificación el empleo de una amina primaria-secundaria como sorbente. El análisis de los alcaloides se realizó mediante HPLC-MS/MS con analizador de cuadrupolo utilizando como fases móviles una disolución de ácido fórmico y acetonitrilo. La columna empleada ha sido la misma que en los ejemplos anteriores.

El centro de la Comisión Europea desarrolló un método para la determinación de alcaloides tropánicos en cereales, té e infusiones de hierbas, donde se mejoraba el método de LC-MS/MS utilizando una columna de pentafluorofenilo. Para su análisis se utilizó como fases móviles agua y acetonitrilo conteniendo ambos un 0,1 % de ácido fórmico. (Gonçalves et al., 2020)

Se estudió la degradación de alcaloides tropánicos en muestras de pan horneado las cuales estaban contaminadas con semillas de solanáceas. Para su determinación se utilizó como método una extracción sólido-líquida con metanol: agua con proporción 2:1 conteniendo un 0,5 % de ácido acético. Se utilizó una columna de Zorbax C18 (Marín et al., 2019a).

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, se realizó un estudio con muestras de semillas de cereales para bebés localizadas en un supermercado de Almería, en España, dando como resultado presencia de escopolamina, atropina y apoatropina con concentraciones de 2,8 µg/Kg 11,5 µg/Kg y 7,5 µg/Kg respectivamente. El procedimiento de extracción se llevó a cabo mediante una extracción sólido-líquido junto con un sistema de extracción en fase sólida acoplado al analizador de triple cuadrupolo, para así eliminar la etapa de separación mediante cromatografía (Marín et al., 2019b).

Se llevó a cabo un estudio de detección de atropina y escopolamina en alforfón y derivados (harinas, galletas, hojuelas, gachas y pasta) utilizando cromatografía de gases acoplada a masas. Se determinaron que los límites de detección de atropina y escopolamina eran de 0,3 µg/Kg y 1 µg/Kg respectivamente y los límites de cuantificación fueron de 1 µg/Kg y 6 µg/Kg en aproximadamente 1 semilla de datura (Caligiani et al., 2010).

Otro estudio llevado a cabo fue el de Martinello y col. (Martinello et al., 2017) donde determinó pirrolizidina y alcaloides tropánicos en muestras de miel. Las

muestras fueron preparadas mediante una extracción QuEChERS con acetonitrilo. Se purificó el extracto mediante una etapa de extracción en fase sólida dispersiva. La determinación de los analitos se llevó a cabo mediante cromatografía de líquido/espectrometría de masas de alta resolución con analizador de triple cuadrupolo/orbitrap. La columna utilizada estaba rellena de RP-C₈.

Se llevó a cabo un estudio en muestras de espinacas para el análisis de escopolamina y atropina. La determinación se llevó a cabo mediante UHPLC-MS/MS con una columna Zorbax Eclipse Plus RRHD de fase reversa C₁₈, utilizando como fases móviles agua y MeOH conteniendo un 0,1% de ácido fórmico y 5mM de formiato de amonio. La extracción se llevó a cabo mediante el método de QuEChERS. Para la purificación de la muestra se utilizó un filtro PTFE de 0,45 µm (*Castilla et al., 2021*).

Otro estudio realizado por Borbála y col. (*Borbála et al., 2017*) donde se han analizado muestras de suelo junto con mijo contaminado. La preparación de la muestra se ha realizado mediante la extracción QuEChERS con acetonitrilo y diversas sales. El extracto obtenido tras la centrifugación se ha diluido y posteriormente filtrado mediante un filtro PTFE de 0,22 µm. Para la determinación de los analitos de interés se realizó mediante HPLC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo cuyas fases móviles utilizadas son agua y acetonitrilo.

Se ha estudiado la presencia de escopolamina y atropina en muestras de alforfón. Para la preparación de la muestra se realizó una extracción sólido-líquido (SLE) utilizando como solvente de extracción MeOH y agua (3:2) acidificado con ácido fórmico y ACN. La técnica cromatográfica utilizada para la determinación de escopolamina y atropina fue UHPLC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo. Se utilizó una columna Kinetex RP-C₁₈ cuyas fases móviles eran agua y metanol (*Cirlini et al., 2017*).

A modo de resumen, las **Tabla 3** y **Tabla 4** recogen la información sobre los métodos empleados que se han llevado a cabo en las investigaciones y estudios descritos anteriormente.

Tabla 3. Estudios de determinación de alcaloides tropánicos en alimentos.

Tipo de muestra	Extracción y purificación	Técnica Cromatográfica	Límite de detección µg/Kg	RSD %	Recuperación %	Referencia
Bayas	SLE: Amonio 6M en metanol / NaOH al 10% en metanol pH=10	HPLC-MS: Analizador de cuadrupolo / trampa de iones Metanol/agua/acético (500:500:10)	5	N.A.	47	(Adams et al., 2006)
Té	SLE: Ácido acético en metanol pH=5-6	LC-MS/MS: Columna: Thermo Hypersil Gold C ₁₈ Fase A: Agua/ac.Fórmico Fase B: metanol/agua/ac. fórmico	10	N.A.	70-110	(Shimshoni et al., 2015)
Suelo, mijo	QuEChERS Acetonitrilo y sales pH= 7,6	HPLC-MS/MS Disolvente A: Agua Disolvente B: metanol Columna: Zorbax Eclipse Plus C ₁₈	N.A.	N.A.	75-115	(Borbála et al., 2017)
Alforfón	SLE: Soxhlet con hexano	GC-MS	Atropina 0,3 Escopolamina 1	1,99-7,1	N.A.	(Caligiani et al., 2010)
Espinacas Congeladas	QuEChERS SPE	UHPLC-MS/MS Columna: Zorbax Eclipse Plus RRHD C ₁₈ Fase móvil A: Agua Fase móvil B: Metanol	N.A.	2,8-3,8	92,2-102,5	(Castilla et al., 2021)
Alforfón	SLE MeOH:Agua (3:2) pH= 3,2	UHPLC-MS/MS Columna : Kinetex RP-C ₁₈ Fase A: agua Fase B: metanol	Atropina 0,03 Escopolamina 0,09	2,4-10,5	78-103	(Cirlini et al., 2017)
Alforfón	QuEChERS d-SPE: Carbón y amina secundaria (PSA)	HPLC-MS/MS Columna: Zorbax plus C ₁₈ Fase A: Acetonitrilo Fase B: Ácido fórmico	Escopolamina 0,2 Atropina 0,04	4,5-5,25	50-66	(Chen et al., 2016)

Cereales	QuEChERS Metanol/agua/ac.f órmico (39:60:1)	LC-MS/MS Columna: Ascentis Express F5 Fase A: Agua Fase B: Acetonitrilo	Atropina 0,4 Escopolamina 1,2	9,8-11,4	71-96	(Gonçalves et al., 2020)
Pienso	QuEChERS Acetonitrilo con 1% de ac.acético	HPLC-MS/MS Columna: Hypersil Gold Fase A: 0,1% de ac.acético Fase B: Metanol:acetonitrilo (90:10)	N.A.	20	7195-125	(León et al., 2015)
Pan	SLE MetOH:Agua (2:1) pH>7	LC-MS Columna : Zorbax Eclipse Plus C ₁₈	N.A.	1-13	75-101	(Marín et al., 2019a)
Semillas de cereales	SLE y SPE MetOH:Agua (2:1) Filtro 0,22µm	HPLC-MS/MS Columna: ACE Super C ₁₈ Eluyentes: Metanol, agua, agua:metanol (50:50)	Atropina 0,5 Escopolamina 1	14,3	68-97	(Marín et al., 2019b)
Miel	QuEChERS Acetonitrilo Purificación SPE	HPLC-HRMS Columna: Ascentis Expres C ₈ . Fase A: Ac.fórmico en agua Fase B: Metanol/acetonitrilo (1:1)	Atropina 0,1 Escopolamina 0,2	100	96-104	(Martinello et al., 2017)
Cereales para bebés	SLE Metanol: agua: ac.fórmico (60:40:0,4)	HPLC-MS/MS Columna: Waters xBridge C ₁₈ Fase A: Hidróxido de amonio en agua Fase B: Hidróxido de amonio en acetonitrilo	0,3	6,8	88	(Mulder et al., 2016)
Alforfón	SLE metanol	HPLC-MS/MS Columna: luna C ₁₈ Fase A: acetato de amonio Fase B: Acetonitrilo	10	N.A.	N.A.	(Perharic et al., 2013)

Tabla 4. Estudios de alcaloides tropánicos en alimentos.

Tipo de Muestra (Origen)/(Nº)	Analitos	Técnica Cromatográfica	Niveles de concentración, µg/Kg	Referencia
Bayas (China y Tailandia)/(8)	Atropina	HPLC-MS	0-19	(Adams et al., 2006)
Harina de trigo sarraceno (Eslovenia)/(75)	Atropina / Escopolamina	HPLC-MS/MS	26-600/ 12-700	(Perharic et al., 2013)
Té roobios (Alemania)/(70)	Escopolamina/pirrolizidina	HPLC-MS/MS	2-180 / 80-565	(Shimshoni et al., 2015)
Cereales para lactantes (Países Bajos)/(113)	Atropina/Escopolamina/ otros alcaloides	HPLC-MS/MS	0,19-3,73 / 0,17-1,86	(Mulder et al., 2016)
Miel (Italia)/(40)	Atropina	HPLC-HRMS	2,5-10	(Martinello et al., 2017)
Espinacas (Jaén)/(66)	Atropina/Escopolamina	UHPLC-MS/MS	0,14-4,52 / 0,04-8,19	(Castilla et al., 2021)
Pienso (Valencia)/(32)	Atropina/Escopolamina/otros alcaloides	HPLC-MS/MS	5-20 / 5-20	(León et al., 2015)
Alforfón (China)/(8)	Atropina/Escopolamina	HPLC-MS/MS	0,01-5 / 0-10	(Chen et al., 2016)
Cereales (Bélgica)/(11)	Atropina/Escopolamina	LC-MS/MS	14-110 / 5,5-65	(Gonçalves et al., 2020)
Cereales (Almería)/(18)	Escopolamina	HPLC-MS/MS	0-7,9	(Marín et al., 2019b)
Trigo (Italia)	Atropina/Escopolamina	HPLC-MS/MS	Atropina 13,9-83,9 Escopolamina 5,7-10,4	(Cirilini et al., 2017)

6. CONCLUSIONES

Con respecto al desarrollo realizado en la presente memoria del Trabajo Fin de Grado, puede concluirse que los alcaloides tropánicos son una amenaza para la salud pública ya que pueden ocasionar graves problemas en el ser humano por lo que estos han de estar correctamente supervisados. De igual manera, estos se encuentran controlados existiendo un marco normativo amplio y detallado. No obstante, se ha de seguir monitorizándolos en productos de interés para grupos vulnerables como pueden ser alimentos para niños o para embarazadas.

Haciendo uso de la bibliografía existente, se concluye a su vez, que se ha producido un desarrollo amplio de los métodos de análisis siendo sus resultados que producen dichos métodos de gran precisión y fiabilidad. Estos métodos cuentan con unos límites de detección y cuantificación bajos por lo que nos permite detectar concentraciones de hasta partes por trillón (ng/Kg). Son técnicas sencillas, rápidas y eficaces siendo fácil su implementación en laboratorios. De entre todos los métodos más relevantes destaca la técnica HPLC-MS.

Son pocos los estudios que no detectan la presencia de estos metabolitos, aun así, es de gran importancia resaltar que en todos los estudios mencionados anteriormente sobre el análisis de alcaloides tropánicos en alimentos, no superan las concentraciones límites establecidas por lo que no existe riesgo alguno que pueda producir graves problemas para la salud, tanto en humanos como en animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M., Wiedenmann, M., Tittel, G., Bauer, R. (2006) : “HPLC-MS Trace Analysis of Atropina in Lycium barbarum Berries ”. Phytochemical Analysis. DOI: 10.1002/pca.915
- AECOSAN (2016a): Alcaloides del tropano, Disponible en http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/contaminantes.htm
- AECOSAN. (2016b). Alcaloides del Tropano. Disponible en web: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Alcaloides_tropano.pdf
- (AESAN, 2003): La seguridad Alimentaria en la educación secundaria obligatoria, Madrid. Disponible en

https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/seguridad_ad_alimentaria/seguridad_edu_secundaria.pdf

- (AESAN, 2019): Me preocupa que haya contaminantes químicos en los alimentos, ¿Puedo estar tranquilo?, Disponible en https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Contaminantes_general_ficha_WEB_mayo_2019.pdf
- AESAN (2020): Ácido Cianhídrico (HCN), Disponible en https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/HCN.pdf
- AESAN (2020): Tetrahidrocanabinol (THC), Disponible en https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/THCpdf.pdf
- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (2011): Alcaloides derivados del Tropano. Disponible en https://acsa.gencat.cat/web/.content/50_Actualitat/Butlletins/acsaBrief/2015/9.-Alcaloides-derivados-del-tropano_ascabrief_2015_09_.pdf
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (6 de abril, 2021). https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm
- Amaral, P., Da Silva, F.A., Corrêa, E.N., Silva, G., De Abreu, M.B., Fernandes, C. (2016) "Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS " Food Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.036>
- Bernal, A., Gómez, D., López, S., Acosta, M. (2013): "Implicaciones Neuropsicológicas, Neurológicas, Psiquiátricas en un caso de intoxicación por escopolamina ", pp 105-118 <https://doi.org/10.21500/19002386.1198>
- Binder, E.V., (2008): El nuevo método de referencia para la detección de micotoxinas. Disponible en <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/regumate-pigs-t26707.htm>
- Borbála, E., Moreno, D., García, J.F., Denovic, M. (2017). "Monitoring the degradation of atropine and scopolamine in soil after spiking with naturally contaminated organic millet " Science of the Total Environment. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.344>

- Caligiani,A., Palla, G., Banzanini, F., Bianchi,A., Bruni, R. (2010) “A validated GC–MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods ” *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.141
- Canosa,M.P. (2008): Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales, Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela
- Cámara, C. (2004). Toma y tratamiento de muestras. Editorial Síntesis.
- Castilla, D., Moreno, D., García, Juan F., Ballesteros, E., Molina, A. (2021) “Determination of atropine and scopolamine in spinach-based products contaminated with genus *Datura* by UHPLC–MS/MS ” *Food Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129020>
- Chan.Y.K.T.(2017): Worldwide Occurrence and Investigations of Contamination of Herbal Medicines by Troane Alkaloids. *MDPI*, pp 9-284
- Chen, H., Marín, J., Romero, R., Garrido, A., (2016): “Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry ”. *Food Chemistry*, pp 173-180 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.075> 0308-8146/Ó 2016
- Cirlini,M., Demuth, T., Biancardi, A., Rychlik,M., Dall Asta, C., Bruni,R.,(2017) “Are tropane alkaloids present in organic foods? Detection of scopolamine and atropine in organic buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) products by UHPLC–MS/MS” *Food Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.028>
- Comisión Europea (2006). Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de Diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en productos alimenticios, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L364, 5-24.
- Comisión Europea (2016). Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de Febrero de 2016 por lo que respecta al contenido máximo de alcaloides tropánicos en determinados alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 45/3.

- Consejería de Salud (2011): Plan de Control de Peligros Químicos. Disponible en web: <http://www.saludpublicaandalucia.es/nuestro-trabajo/proteccion-de-la-salud/seguridad-alimentaria/plan-de-control-de-peligros-quimicos>
- Consejería de Salud (2018): Plan de Control de peligros químicos en productos alimenticios. Disponible en web : https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/salud_5aeb2cc6dbc8e_plan_peligros_quimicos_2018.pdf
- Dey, P., Kund, A., Kumor, A., Gupta, M., MuLee, B., Bhakta,T., Dash,S. Sik Kim, H., (2020) “ Analysis of alkaloids (índole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids) ” DOI:10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9
- EFSA (2013): Scientific Opinion on Tropane alkaloids in Food and feed. EFSA jornal, 11 (10):3386.
- Elika (2011): Fundación Vasca para la seguridad Agroalimentaria. Alcaloides Tropánicos. Disponible en http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento44/alcoloides%20trop%C3%A1nicos.pdf
- Elika (2013): Fundación Vasca para la seguridad Agroalimentaria. Alcaloides Tropánicos-Datura spp. Disponible en <https://alimentacion-animal.elika.eus/wp-content/uploads/sites/6/2017/12/ALC-TROP%C3%81NICOS-DATURA-SPP-2012-maquetado.pdf>
- Elika (2017): Fundación Vasca para la seguridad Agroalimentaria. Tóxicos Naturales en Alimentos. Disponible en https://alimentos.elika.eus/wp-content/uploads/sites/2/2017/12/art_t%C3%B3xicos-naturales-en-alimentos_jul2017.pdf
- FAO(2014):Segunda conferencia internacional sobre Nutrición, Roma,19-21 Noviembre 2014. Disponible en <http://www.fao.org/3/ml542s/ml542s.pdf>
- Fuentes, A., García, E., Fernández, I. (2010): Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. Universidad de Valencia.
- Gargallo, S., (2007): Determinación de contaminantes orgánicos semivolátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Trabajo Fin de Master Universidad de Girona.

- Gonçalves, C., Cubero, E., Strok, J., (2020) "Determination of tropane alkaloids in cereals, tea and herbal infusions: Exploiting proficiency testing data as a basis to derive interlaboratory performance characteristics of an improved LC-MS/MS method" <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127260> R
- Grimalt, S., (2009) : Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Jaume I de Castellón.
- Gutiérrez, E., (2019): Detección de Alcaloides Tropánicos en alimentos mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de Tándem. Trabajo Fin de Grados. Universidad de Jaén
- Gutiérrez, M.C., Droguet, M. (2002): La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. U.P.C. N°122 Disponible en <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf?sequence=1>
- Haughey, S., Chevalliera, O., McVey, C., Elliot, C. (2020) "Laboratory investigations into the cause of multiple serious and fatal food poisoning incidents in Uganda during 2019 " Food Control, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107648>
- Ibañez, A. (2018): Determinación de alcaloides tropánicos en espinacas mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem. Trabajo Fin de Master. Universidad de Jaén.
- León, N., Pastor, A., Yusà, V. (2015) "Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography–high resolution mass spectrometry" Talanta. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.032>
- Lucci, P., Saurina, J., Núñez, O., (2016) "Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food" Tendencias de TrAC en química Analítica. Pp 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.006>
- Marín, J., Romero, R., Garrido, A. (2019) "Degradation of tropane alkaloids in baked bread samples contaminated with Solanaceae seeds" Food Research International. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.027>
- Marín, J., Romero, R., Garrido, A. (2019) "Reliable determination of tropane alkaloids in cereal based baby foods coupling on-line SPE to mass

spectrometry avoiding chromatographic step” Food Chemistry.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.137>

- Martinello, M., Borin, A., Stella, R., Bovo, D., Biancotto, G., Gallina, A., Mutinello, F. (2017) “Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey”. Food Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.186> FOCH
- Mosquera, D., Díaz, R., Cardona, J., Gutierrez, R., y Hernández, M. (2012): Obtención de aceites vegetales provenientes de especies amazónicas mediante la técnica de extracción asistida por microondas (EAM). Vitae-revista De La Facultad De Química Farmacéutica, 19
- Mulder, P., Nijs, M., Castellari, M., Hortos, M., MacDonald, S., Crews, C., Hajslova, J., Stranska, M., (2016) “Occurrence of tropane alkaloids in food”. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1140>
- Mulder, P., Pereboom-de Fauw, D., Hoogenboom, R., Stoppelaar, J., Nijs, M. (2015): Tropane and ergot alkaloids in grain-based products for infants and young children in the Netherlands in 2011–2014, Food Additives & Contaminants: Part B, DOI: 10.1080/19393210.2015.1089947
- Núñez, C.E., (2008): Extracciones con equipo Soxhlet. Disponible en <http://cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
- Perharič, L., Koželj, G., Družina B., Stanovnik, L. (2013) Risk assessment of buckwheat flour contaminated by thorn-apple (*Datura stramonium* L.) alkaloids: a case study from Slovenia, Food Additives & Contaminants: Part A, 30:2, 321-330, DOI: 10.1080/19440049.2012.743189
- Organización Mundial de la Salud. Natural Toxins in Food. (6 Abril, 2021) Disponible en <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/natural-toxins-in-food>
- Ponce de León de Lama, C., Torija, E., Matallana, M., Pintado, C. (2020): “Interest of sprouts and their Food Security”. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria, 40, pp. 62–73
- Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., De Castro, A., López, M., (2005): Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. Disponible en <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/hemeroteca/vol22-1/150-340-1-SM.pdf>

- Rodríguez,R., Hidalgo,M., Iglesias, M., (2007) “ Toma, conservación y tratamiento de muestras” Facultad de Ciencias. Universidad de Girona. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/263747236_Toma_conservacion_y_tratamiento_de_muestras
- Shimshoni,J., Duebecke, A., Mulder, P., Cuneah, O.,Barel , S.(2015): Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas peppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market, Food Additives & Contaminants: Part A, DOI: 10.1080/19440049.2015.1087651
- Stroobant, V., (2007): Mass Spectrometry (3rd edition) John Wiley & Sons, Ltd