



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

FUMONISINA B₁: PROBLEMÁTICA Y MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA SU DETERMINACIÓN EN MAÍZ Y DERIVADOS

Alumno/a: Natalia Valdivia Aranda

Junio, 2023



Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

FUMONISINA B₁: PROBLEMÁTICA Y MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA SU DETERMINACIÓN EN MAÍZ Y DERIVADOS

Alumno/a: Natalia Valdivia Aranda

Jaén, Junio, 2023

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Micotoxinas	2
1.1.1. <i>Concepto y origen.....</i>	<i>2</i>
1.1.2. <i>Tipos.....</i>	<i>3</i>
1.1.3. <i>Toxicidad</i>	<i>3</i>
1.1.4. <i>Medidas de reducción y control</i>	<i>5</i>
1.2. Fumonisina B₁	6
1.2.1. <i>Concepto y origen.....</i>	<i>6</i>
1.2.2. <i>Estructura química.....</i>	<i>7</i>
1.2.3. <i>Propiedades físico-químicas.....</i>	<i>8</i>
1.2.4. <i>Incidencia en alimentos</i>	<i>8</i>
1.2.5. <i>Legislación.....</i>	<i>9</i>
1.3. Toxicología de la fumonisina B₁	11
1.3.1. <i>Mecanismo de acción</i>	<i>11</i>
1.3.2. <i>Efectos tóxicos sobre el ser humano</i>	<i>12</i>
1.3.3. <i>Efectos tóxicos sobre los animales.....</i>	<i>13</i>
1.4. Análisis químico de fumonisinas en productos a base de maíz... 14	
1.4.1. <i>Técnicas de extracción y purificación</i>	<i>14</i>
1.4.2. <i>Métodos de análisis</i>	<i>17</i>
2. OBJETIVOS	22
3. METODOLOGÍA.....	22
4. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN	23
5. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE FUMONISINAS B₁ EN MAÍZ Y SUS DERIVADOS.....	24
5.1. <i>Investigación bibliográfica</i>	<i>24</i>
5.2. <i>Técnicas de extracción y purificación empleadas</i>	<i>34</i>
5.3. <i>Técnicas analíticas empleadas</i>	<i>37</i>
6. CONCLUSIONES	39
7. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Maíz contaminado por fumonisinas (Alltech, 2018)	7
Figura 1.2. Estructura química de la FB ₁ (Elaboración propia)	7
Figura 1.3. Estructura química de la esfingosina (Elaboración propia)	12
Figura 1.4. Estructura química de la esfinganina (Elaboración propia)	12
Figura 1.5. Incidencia de las fumonisinas sobre distintas especies animales (Elaboración propia)	13
Figura 1.6. Etapas de la extracción en fase sólida convencional (Elaboración propia)	15
Figura 1.7. Etapas de la extracción con columnas de inmunoafinidad (Elaboración propia)	16
Figura 1.8. Características del método QuEChERS (Elaboración propia)	16
Figura 1.9. ELISA directo (Elaboración propia)	19
Figura 1.10. ELISA indirecto (Elaboración propia)	20
Figura 1.11. ELISA competitivo (Elaboración propia)	20
Figura 1.12. Partes de una tira inmunocromatográfica (Elaboración propia) ...	21

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales tipos de micotoxinas junto con sus hongos productores (Elaboración propia)	3
Tabla 1.2. Principales micotoxinas junto con su mecanismo de acción, efectos tóxicos y alimentos afectados (Elaboración propia)	4
Tabla 1.3. Hongos productores de fumonisinas (Soriano del Castillo, 2007)	6
Tabla 1.4. Contenidos máximos de fumonisinas en alimentos establecidos por la Unión Europea (Comisión Europea, 2023)	9
Tabla 1.5. Contenidos máximos de fumonisinas en alimentos establecidos por el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1995)	10
Tabla 1.6. Niveles máximos de fumonisinas en alimentos para humanos recomendados por la FDA (FDA, 2001)	10
Tabla 1.7. Niveles máximos de fumonisinas en alimentos para animales establecidos por la FDA (FDA, 2001)	11
Tabla 4.1. Evaluación de la contaminación por fumonisinas en maíz y productos a base de maíz en España (Elaboración propia)	24
Tabla 5.1. Investigación bibliográfica sobre la determinación de FB ₁ en maíz y derivados (Elaboración propia)	25
Tabla 5.2. Investigación bibliográfica sobre la determinación de FB ₁ en maíz y derivados (Elaboración propia)	30
Tabla 6.1. Técnicas analíticas con menor límite de detección (Elaboración propia)	41

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos de forma natural por varios tipos de hongos. Estas toxinas fúngicas se incluyen dentro del grupo de contaminantes más importantes de alimentos debido a su efecto negativo sobre la salud pública, la seguridad alimentaria y la economía de muchos países. Por esta razón, es importante idear técnicas de análisis sensibles y selectivas para la detección y cuantificación de estos contaminantes en los productos alimenticios.

El presente Trabajo de Fin de Grado trata sobre una micotoxina específica, denominada Fumonisina B₁. Esta se encuentra principalmente en el maíz y en productos derivados. Por ende, este trabajo se centra en los diferentes métodos de análisis para la detección y cuantificación de Fumonisina B₁ en los productos mencionados anteriormente.

ABSTRACT

Mycotoxins are low molecular weight secondary metabolites produced naturally by several types of fungi. These fungal toxins are included in the most important food contaminants group because of their negative impact on public health, food security and the economy of many countries. For this reason, it is important to devise sensitive and selective analytical techniques for the detection and quantification of these contaminants in foodstuffs.

The present Final Degree Project deals with a specific mycotoxin, called Fumonisin B₁. It is found primarily in maize and maize products. Thereby, this project focuses on the different analytical methods for detection and quantification of Fumonisin B₁ in the products mentioned above.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Micotoxinas

1.1.1. Concepto y origen

El término “micotoxina” proviene de la palabra griega “mycos” y de la palabra latina “toxicum”, que significan hongo y tóxico/veneno respectivamente.

Las micotoxinas son toxinas fúngicas, es decir, son sustancias producidas de manera natural por algunos hongos, entre los que se encuentran las especies *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Concretamente, las micotoxinas son productos de su metabolismo secundario de bajo peso molecular.

Cada micotoxina es producida específicamente por una o más especies concretas de hongos o mohos. En algunos casos, una determinada especie de hongo puede producir más de un tipo de micotoxina (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015).

Las micotoxinas atacan a los cultivos del campo, especialmente a los de cereales, frutos secos, especias y frutos de cáscara. La producción de estas depende fundamentalmente de la humedad y de la temperatura. No obstante, la producción de micotoxinas también se ve influenciada por factores como: el pH, el agua disponible, la composición del sustrato, los daños mecánicos, los daños ocasionados por insectos, la presencia de oxígeno, el tipo de suelo y el tipo de almacenamiento, entre otros.

En general, la producción es máxima entre los 24°C y los 28°C, que corresponden a temperaturas ambiente tropicales. En refrigeración (como sucedería en el caso de los mohos que proliferaran, por ejemplo, sobre queso), no solamente el crecimiento fúngico sería menor, sino también la producción proporcional de micotoxinas (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2022).

Estas toxinas fúngicas pueden aparecer durante el cultivo, la cosecha, el transporte o el almacenamiento. Puesto que la gran mayoría son químicamente estables y resistentes, persisten en el alimento tras el tratamiento y procesado de este, entrando así en la cadena alimenticia.

1.1.2. Tipos

A día de hoy se conocen más de 400 micotoxinas, cada una de ellas con estructuras químicas diferentes y con distintos mecanismos de acción en los seres vivos.

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, las micotoxinas de mayor relevancia son: las aflatoxinas, la ocratoxina, la patulina, las fumonisinas, la zearalenona, el nivalenol y el deoxinivalenol.

En la Tabla 1.1 se muestran las micotoxinas nombradas anteriormente junto con los diferentes tipos (si los hay) y sus hongos productores.

Tabla 1.1. Principales tipos de micotoxinas junto con sus hongos productores (Elaboración propia)

Micotoxina	Tipos	Abreviatura	Hongos productores
Aflatoxina	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ , AFM ₂	<i>Aspergillus parasticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>
Ocratoxina	A	OTA	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i>
Patulina	-	-	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Byssochlamys</i>
Fumonisina	B ₁ , B ₂ , B ₃	FB ₁ , FB ₂ , FB ₃	<i>Fusarium verticilloides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Zearalenona	-	ZEN	<i>Fusarium graminearum</i>
Nivalenol	-	NIV	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F.cerealis</i> y <i>F.poe</i>
Deoxinivalenol	-	DON	<i>Fusarium graminearum</i> y <i>F. culmorum</i>

1.1.3. Toxicidad

Como ya se ha dicho previamente, las micotoxinas atacan a los cultivos del campo, entrando de esta forma en la cadena alimentaria. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), el 25% de los cultivos alimentarios mundiales se ven afectados por hongos productores de micotoxinas (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2018).

Estas toxinas fúngicas pueden entrar en la cadena alimentaria por medio de dos vías:

- Directamente a través de los alimentos de los cultivos afectados, ya sean procesados (café, cerveza, cereales de desayuno, etc) o no procesados (legumbres, hortalizas, frutos secos, etc).
- Indirectamente a través de alimentos generados por animales que han consumido piensos contaminados por micotoxinas. Algunos de estos alimentos son leche, carne y huevos.

Diferentes estudios han demostrado que las micotoxinas suponen un riesgo considerable para la salud humana y animal, siendo las más peligrosas para nosotros aquellas que se encuentran en cultivos pos-cosecha. Algunos de los efectos tóxicos que pueden provocar son: mutagenicidad, hepatotoxicidad, carcinogenicidad, genotoxicidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad.

Las enfermedades producidas por micotoxinas reciben el nombre de micotoxicosis. Concretamente, el término micotoxicosis hace referencia a un amplio grupo de intoxicaciones causadas por la inhalación, el contacto directo o la ingestión de alimentos que han sido contaminados con micotoxinas (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

En la siguiente Tabla (Tabla 1.2) se exponen algunas de las micotoxinas más peligrosas para la salud, indicando su mecanismo de acción, los efectos tóxicos y los alimentos afectados.

Tabla 1.2. Principales micotoxinas junto con su mecanismo de acción, efectos tóxicos y alimentos afectados (Elaboración propia)

Micotoxina	Mecanismo de acción	Efectos tóxicos	Alimentos afectados
AFB ₁	Inhibición de la síntesis de proteínas	Hepatotoxicidad Carcinogénesis Genotoxicidad Inmunotoxicidad Teratogenicidad	Maíz, cacahuetes, nueces de Brasil y semilla de algodón
OTA	Inhibición de la síntesis de proteínas	Nefrotoxicidad Carcinogénesis renal y hepática Inmunotoxicidad Neurotoxicidad Teratogenicidad	Trigo, maíz, cebada, centeno, avena, arroz, granos de cacao y café, especias, regaliz, frutos secos, carne, queso, uvas y derivados
FB ₁	Inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos	Trastornos gastrointestinales Neurotoxicidad Nefrotoxicidad	Maíz y derivados, sorgo, trigo y otros cereales (en menor medida)

Patulina	Inhibición de la actividad de ATPasa Na ⁺ -K ⁺ y de la biosíntesis de enzimas clave (como la ARN polimerasa)	Trastornos gastrointestinales Genotoxicidad	Manzana, zumos y derivados
ZEN	Competir con los estrógenos por los receptores citosólicos, actuando como un disruptor endocrino	Estrogenicidad Inmunotoxicidad in-vitro	Trigo, maíz, cebada, avena, centeno y productos derivados de los cereales
NIV	Inhibición de la síntesis de proteínas, ADN y ARN	Inmunotoxicidad Hematotoxicidad Genotoxicidad in-vitro	Trigo, maíz, cebada, avena y productos derivados de los cereales
DON	Inhibición de la síntesis de proteínas, ADN y ARN	Trastornos gastrointestinales Teratogenicidad Inmunotoxicidad Genotoxicidad in-vitro	Trigo, maíz, cebada, centeno, avena, productos derivados de los cereales y aceites de semillas

1.1.4. Medidas de reducción y control

Las micotoxinas presentan una elevada estabilidad y resistencia. Como consecuencia, no se pueden eliminar de los alimentos una vez que estos están contaminados. Sin embargo, sí se puede intentar prevenir o reducir su contenido en ellos.

Una de las medidas de gestión más eficaces es la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). Este programa, propuesto por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), incluye sistemas de gestión de calidad firmemente implantados, entre los que se encuentran: buenas prácticas de fabricación (BPF), buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de higiene (BPH). Las medidas preventivas y de control que proponen estos sistemas deben aplicarse tanto antes como después de la cosecha.

Otra medida de gestión muy eficaz consiste en limitar el contenido de micotoxinas en alimentos. Para ello, se han establecido límites máximos de micotoxinas. A nivel europeo, estos límites están recogidos en el Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023. A nivel internacional, están recogidos en el Codex Alimentarius.

Por otro lado, para controlar los niveles de micotoxinas en los alimentos, la UE ha establecido además una serie de criterios para realizar el muestreo y el análisis de estas sustancias. Estos criterios están recogidos en el Reglamento CE nº 401/2006, de 23 de Febrero de 2006.

1.2. Fumonisina B₁

1.2.1. Concepto y origen

Las fumonisinas son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos producidos por varios hongos del género *Fusarium*, entre los que destacan *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*. Sin embargo, estas micotoxinas también pueden ser producidas (aunque en menor medida) por el hongo *Alternaria alternata f.sp. lycopersici*. En la Tabla 1.3 se muestran los diferentes hongos productores de fumonisinas.

Los hongos del género *Fusarium* suelen encontrarse en cultivos de cereales situados en regiones templadas y son especialmente abundantes en maíz. Además, estos hongos infectan el grano antes de la cosecha. Por tanto, la producción de fumonisinas depende de factores previos a la cosecha.

Tabla 1.3. Hongos productores de fumonisinas (Soriano del Castillo, 2007)

Género	Especie
<i>Fusarium</i>	<i>F. verticillioides</i>
	<i>F. proliferatum</i>
	<i>F. nygamai</i>
	<i>F. napiforme</i>
	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. polyphialidicum</i>
	<i>F. anthropilum</i>
	<i>F. diamini</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata f.sp.lycopersici</i>

A día de hoy, se han identificado unos 18 tipos de fumonisinas. Estas se agrupan en cuatro series/grupos: A, B, C y P. Las más relevantes son las del grupo B. De entre ellas, la más abundante y más importante debido a su elevada toxicidad es la fumonisina B₁ (FB₁).

La FB₁ contamina principalmente el maíz (Figura 1.1), productos derivados del maíz y el sorgo. A niveles más bajos, también puede encontrarse en arroz,

trigo y en otros cereales y productos derivados: cerveza, tortitas, cereales de desayuno, etc.



Figura 1.1. Maíz contaminado por fumonisinas (Alltech, 2018)

La FB₁ fue descubierta por W.C. Gelderblom y sus colaboradores en el año 1988, quienes aislaron la FB₁ (junto con la FB₂) de los cultivos de *Fusarium verticillioides*.

1.2.2. Estructura química

La estructura química de las fumonisinas fue descrita por primera vez por el grupo de investigación del doctor Bezuidenhout, en el año 1988.

Las fumonisinas son aminopolioles. Su estructura principal se basa en un esqueleto lineal de 20 átomos de carbono. Presentan un grupo amino en el C-2 y diversos grupos hidroxilo, metilo y ácido tricarbónico en diversas posiciones a lo largo de la cadena carbonada. En función de los grupos presentes en la cadena, la fumonisina en cuestión pertenecerá a la serie A, B, C o P.

Las FB₁ son diésteres del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico y el 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroieicosano (Marasas y col., 2000). Su fórmula empírica es C₃₄H₅₉NO₁₅. A continuación, se muestra una imagen de su estructura química (Figura 1.2).

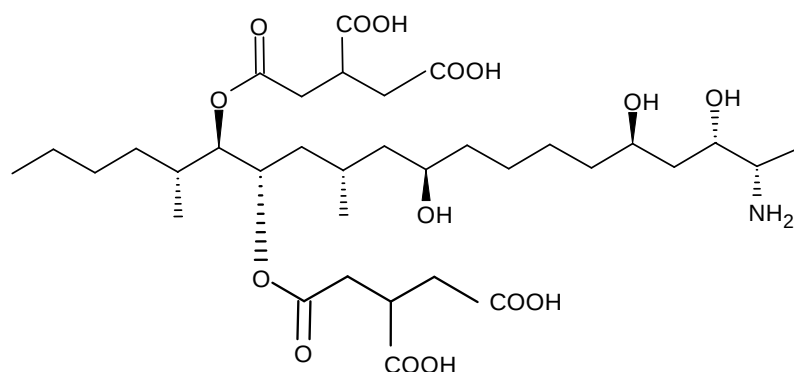


Figura 1.2. Estructura química de la FB₁ (Elaboración propia)

1.2.3. Propiedades físico-químicas

Las fumonisinas son compuestos solubles en disolventes polares e insolubles en disolventes apolares. Además, son estables a la luz y al calor. Sin embargo, a pesar de ser sustancias termoestables, su presencia se puede reducir significativamente cuando se someten a procesos térmicos en los que la temperatura aplicada es superior a 150°C.

Como sustancia pura, la FB₁ es un polvo blanco higroscópico. Es soluble en agua, metanol y acetonitrilo:agua, además de ser estable en acetonitrilo:agua (1:1) e inestable en metanol. Su peso molecular es de 721,83 g/mol.

1.2.4. Incidencia en alimentos

Como ya se ha dicho anteriormente, el cereal en el que predomina mayoritariamente la FB₁ es el maíz (y sus derivados). Entre los derivados del maíz se incluyen: harina de maíz, copos de maíz, sémola, jarabe de maíz, palomitas de maíz, aceite de maíz, piensos para aves de corral, etc.

Los dos procedimientos empleados para la elaboración de productos a base de maíz son: molienda en seco y molienda húmeda.

La molienda en seco del maíz consiste en la reducción del tamaño del grano y la separación de las diferentes fracciones: endospermo, germen y pericarpio. A partir de este procedimiento se obtienen cereales de desayuno, sémolas y harinas. Además, partiendo del germen, se puede extraer y obtener aceite.

La molienda húmeda del maíz consta de varias etapas. En primer lugar, hay que llevar a cabo una inspección y limpieza de los granos. Posteriormente, se realiza una maceración de los granos en agua a 50°C durante 30-40 horas. A continuación, los granos macerados se trituran con el objetivo de separar los elementos que los constituyen. Para ello, se efectúan procesos de tamización, centrifugación y lavado. De esta forma, se libera el aceite del germen, el almidón del endospermo y el resto de productos. El almidón puede emplearse como componente para la elaboración de alcohol o edulcorantes nutritivos, como el jarabe. Otro producto derivado del maíz que puede obtenerse a través de la molienda húmeda es el pienso para animales.

1.2.5. Legislación

En la Unión Europea se han establecido límites máximos de fumonisinas en productos alimenticios, basados en la suma de FB₁ y FB₂ (Tabla 1.4). Estos límites se encuentran recogidos en el Reglamento (UE) nº 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº. 1881/2006.

Tabla 1.4. Contenidos máximos de fumonisinas en alimentos establecidos por la Unión Europea (Comisión Europea, 2023)

Productos alimenticios	Contenido máximo de FB ₁ + FB ₂ (µg/kg)
Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda	4000
Maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo, a excepción de los productos alimenticios enumerados en las siguientes dos celdas	1000
Cereales de desayuno a base de maíz y aperitivos de maíz	800
Alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
Harina de maíz no comercializada para el consumidor final (al menos el 90 %, medido en peso, de las partículas presentes en el producto de molienda tienen un tamaño ≤ 500 µm)	2000
Otros productos de la molienda del maíz no comercializados para el consumidor final (menos del 90 %, medido en peso, de las partículas presentes en el producto de molienda tienen un tamaño ≤ 500 µm)	1400

Asimismo, la Unión Europea también ha establecido una ingesta diaria tolerable (IDT) de fumonisinas. Según el Reglamento (CE) nº 856/2005 de la Comisión de 6 de junio de 2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 en lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium*, la UE establece una IDT de 2 µg/kg de peso corporal para el total de las fumonisinas B₁, B₂ y B₃ (solas o combinadas).

A nivel internacional, también se han implantado límites máximos de fumonisinas en productos alimenticios en el Codex Alimentarius (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Contenidos máximos de fumonisinas en alimentos establecidos por el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1995)

Nombre del producto básico/producto	Nivel máximo FB ₁ + FB ₂ (µg /kg)
Maíz en grano crudo	4000
Harina de maíz y sémola de maíz	2000

Por otro lado, la FDA (U.S Food and Drug Administration) estableció en noviembre de 2001 los niveles máximos recomendados de fumonisinas en alimentos para humanos (Tabla 1.6) y animales (Tabla 1.7).

Tabla 1.6. Niveles máximos de fumonisinas en alimentos para humanos recomendados por la FDA (FDA, 2001)

Alimentos para humanos	
Producto	Fumonisinas totales (FB ₁ + FB ₂ + FB ₃) (ppm)
Productos de maíz molido en seco sin germen (p. ej., sémola en copos, sémola de maíz, harina de maíz, harina de maíz con un contenido en grasa < 2,25 %)	2
Productos de maíz molido en seco, enteros o parcialmente desgerminados (p. ej., sémola en copos, sémola de maíz, harina de maíz, harina de maíz con un contenido de grasa ≥ 2,25 %, en peso seco)	4
Salvado de maíz molido seco	4
Maíz limpio destinado a la producción de masa	4
Maíz limpio destinado a palomitas	3

Tabla 1.7. Niveles máximos de fumonisinas en alimentos para animales establecidos por la FDA (FDA, 2001)

Alimentos para animales	
Maíz y subproductos de maíz destinados a:	Fumonisinas totales (FB₁ + FB₂ + FB₃) (ppm)
Equinos y conejos	5 (no más del 20% de la dieta)
Cerdos y bagres	20 (no más del 50% de la dieta)
Cría de rumiantes, cría de aves de corral y cría de visones	30 (no más del 50% de la dieta)
Rumiantes de más de 3 meses de edad destinados al matadero y visones destinados a la producción de pieles	60 (no más del 50 % de la dieta)
Aves de corral criadas para el matadero	100 (no más del 50% de la dieta)
Todas las demás especies o clases de ganado y animales de compañía	10 (no más del 50 % de la dieta)

1.3. Toxicología de la fumonisina B₁

1.3.1. Mecanismo de acción

El mecanismo de toxicidad de la FB₁ aún no se conoce con certeza. La hipótesis más estudiada y aceptada a día de hoy sugiere que su mecanismo consiste en la alteración del metabolismo de los esfingolípidos, que son componentes activos de la membrana plasmática de células eucariotas encargados de regular el crecimiento y reconocimiento celular.

La FB₁ tiene una estructura muy similar a los intermediarios del metabolismo de los esfingolípidos, que se conocen como esfingosina (Figura 1.3) y esfinganina (Figura 1.4). Como consecuencia, la FB₁ compite con estos por la ceramida sintasa, una enzima que cataliza la síntesis de ceramida a partir de las bases de esfingosina. Por tanto, la FB₁ actúa como un inhibidor competitivo de la ceramida sintasa, alterando así el metabolismo de los esginfo lípidos. Esta interrupción provoca una disminución de la concentración de ceramida, un

aumento de los niveles de esfingosina y esfinganina libres, y un incremento de esfingosina 1-fosfato; lo que puede desencadenar en estrés oxidativo.

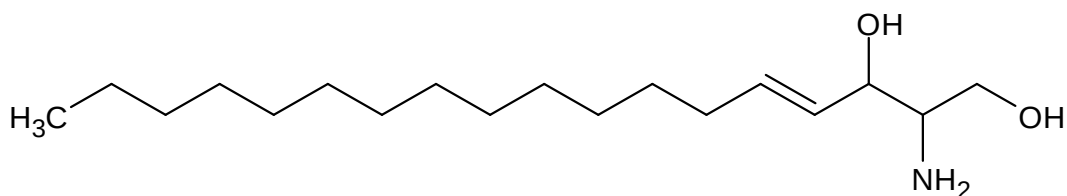


Figura 1.3. Estructura química de la esfingosina (Elaboración propia)

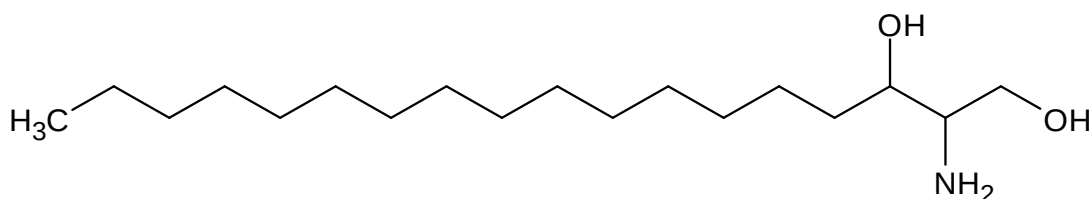


Figura 1.4. Estructura química de la esfinganina (Elaboración propia)

1.3.2. Efectos tóxicos sobre el ser humano

En los seres humanos, las intoxicaciones por FB₁ se producen principalmente por el consumo de maíz. Según diversos estudios, la ingesta de alimentos que presentan fumonisinas puede estar relacionada epidemiológicamente en humanos con cáncer esofágico, cáncer de hígado, defectos en el desarrollo del tubo neural e intoxicaciones agudas.

El cáncer de esófago predomina en aquellas zonas en las que el nivel socioeconómico es bajo, lo cual implica que las dietas se basen principalmente en maíz y trigo.

Por otro lado, el cáncer de hígado parece ser una acción sinérgica entre las fumonisinas (principalmente FB₁) con otras micotoxinas como las aflatoxinas, tricotecenos y microcistinas (toxinas de algas).

Los defectos neuronales son causa de la interrupción del metabolismo de los folatos por parte de las fumonisinas, disminuyendo así la absorción de estos y provocando defectos en el desarrollo del tubo neural.

En cuanto a las intoxicaciones agudas, los síntomas observados son de tipo gastrointestinal, y son: vómitos, diarrea, dolor abdominal y borborismos.

Por último, cabe destacar que, de acuerdo con la IARC (International Agency for Research on Cancer), la FB₁ está catalogada en humanos como posible carcinógeno. Por tanto, pertenece a la clase 2B.

1.3.3. Efectos tóxicos sobre los animales

Diversos estudios in vivo con animales concluyen que los principales órganos afectados son el hígado y los riñones. Los animales más sensibles a los efectos tóxicos de las fumonisinas son los equinos y los cerdos y, en menor medida, las aves, los rumiantes y los peces (Figura 1.5).



Figura 1.5. Incidencia de las fumonisinas sobre distintas especies animales (Elaboración propia)

La enfermedad que sufren los caballos a causa de la intoxicación por FB₁ se denomina leucoencefalomalacia equina (ELEM), también conocida como enfermedad del maíz mohoso. Se trata de una enfermedad neurotóxica que provoca la necrosis licuefactiva de la sustancia blanca del cerebro. En algunas ocasiones, también puede afectar a la materia gris. Algunos de los síntomas son: desorientación, cojera, cólicos, ceguera, depresión y convulsiones. Se estima que el porcentaje de mortalidad es muy cercano al 100%.

En el sector porcino, la intoxicación por fumonisinas está relacionada con el edema pulmonar, que a su vez está asociado con la necrosis de los hepatocitos y la insuficiencia hepática. Se cree que esta afección puede estar inducida por una disfunción cardiovascular, concretamente por alteraciones hemodinámicas y cambios significativos en el consumo de oxígeno.

- A dosis altas, se produce edema pulmonar letal e hidrotórax.
- A dosis más bajas, se produce hepatotoxicidad.

Algunos de los síntomas son: disminución del peso, apatía, disnea, debilidad, cianosis y la muerte.

1.4. Análisis químico de fumonisinas en productos a base de maíz

A la hora de realizar un análisis químico hay que llevar a cabo las siguientes etapas: selección del método de análisis, toma de muestra, preparación de la muestra (disolución de la muestra, eliminación de interferentes, etc), medición del analito y, análisis y evaluación de los resultados.

1.4.1. Técnicas de extracción y purificación

Algunas de las técnicas más habitualmente empleadas para la extracción y purificación de fumonisinas presentes en muestras de maíz son:

Extracción sólido-líquido

Es una técnica de separación que consiste en poner en contacto una determinada cantidad de muestra sólida (finamente dividida) con un disolvente o mezcla de disolventes de polaridad adecuada en función de la naturaleza de los analitos. Tras agitar, se forman dos fases y se produce la difusión de los analitos al disolvente en cuestión, por el cual deben presentar gran afinidad.

Puesto que las fumonisinas son solubles en disolventes polares, los disolventes más utilizados para este tipo de extracciones son mezclas de agua con disolventes orgánicos. Como disolvente orgánico, se usa principalmente metanol o acetonitrilo.

Se trata de un método sencillo y barato; pero en algunas ocasiones puede resultar insuficiente, siendo necesaria una etapa posterior de purificación.

Extracción en fase sólida (SPE) convencional

Es una técnica que permite la extracción/concentración de los analitos y la purificación de las muestras. Consiste en poner en contacto la muestra (en estado líquido) con una fase sólida, la cual va a retener al analito u otros componentes presentes en la muestra. Por lo general, la fase sólida se encuentra en el interior de un cartucho de extracción. Dichas fases suelen ser de fase reversa (C18).

El procedimiento de SPE (Figura 1.6) consta de cuatro etapas:

- Acondicionamiento: el sorbente es acondicionado/activado con un disolvente de propiedades similares a la muestra.

- Carga: consiste en la adición de la muestra. De esta forma, los analitos y otros compuestos quedan retenidos en la fase sólida.
- Lavado: con el objetivo de eliminar las interferencias, se hace pasar un disolvente que eluya los interferentes y deje retenido al analito.
- Elución: consiste en eluir el analito con un disolvente específico, que se va a encargar de liberar selectivamente a este de la fase sólida.

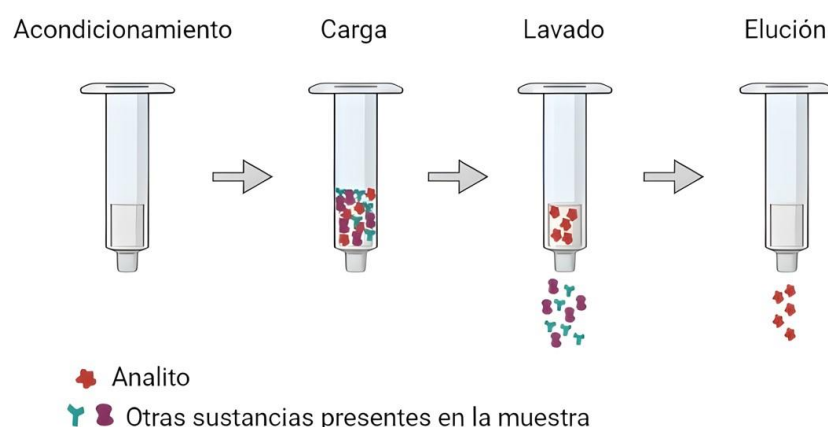


Figura 1.6. Etapas de la extracción en fase sólida convencional (Elaboración propia)

Esta técnica es utilizada normalmente para la extracción de micotoxinas presentes en muestras líquidas. Sin embargo, cuando la matriz es sólida (como en el caso del maíz) se utiliza como técnica de concentración o purificación.

Las principales ventajas de esta técnica son la sencillez, la rapidez, el consumo reducido de disolventes y la alta capacidad de automatización.

Extracción con columnas de inmunoafinidad

Hoy en día, este es el método de extracción y purificación de micotoxinas más comúnmente empleado por los laboratorios.

Consiste en el empleo de columnas de inmunoafinidad (IAC) empaquetadas con un relleno en el que se inmoviliza un anticuerpo específico para la micotoxina en cuestión formando un gel. De esta forma, cuando se hace pasar la muestra a través de la columna, las micotoxinas se unen selectivamente a los sitios de unión de los anticuerpos; mientras que el resto de componentes de la muestra son eluidos sin quedar retenidos. Posteriormente, se procede a eliminar los compuestos indeseados que hayan quedado retenidos con el uso de un disolvente de lavado adecuado. Finalmente, se eluye la micotoxina con un

disolvente de polaridad adecuada. Para eluir la FB₁ puede utilizarse, por ejemplo, una solución metanólica.

El procedimiento representado de manera esquemática viene reflejado en la Figura 1.7.

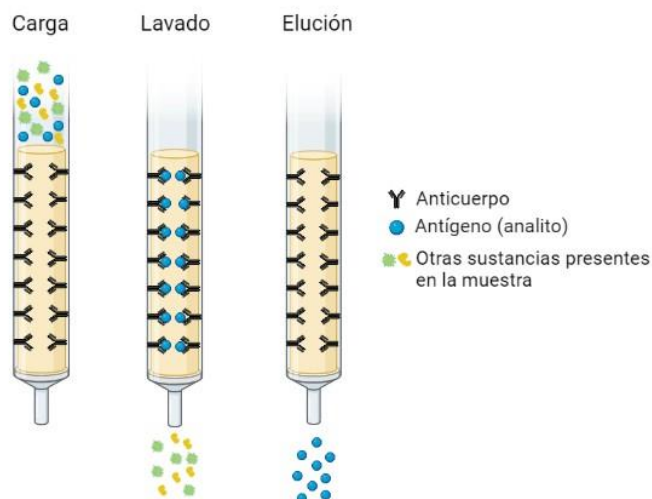


Figura 1.7. Etapas de la extracción con columnas de inmunoafinidad (Elaboración propia)

Este tipo de columnas presentan una alta especificidad (debido a la interacción anticuerpo-analito) y una alta sensibilidad. Además, ofrecen buenas tasas de recuperación y son fáciles de usar. El principal inconveniente es su lentitud y que tienen un coste relativamente elevado.

Extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS)

El nombre que recibe esta técnica corresponde al acrónimo de sus características en inglés: quick, easy, cheap, effective, rugged, safe (Figura 1.8). Por tanto, se trata de un método de extracción rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro.

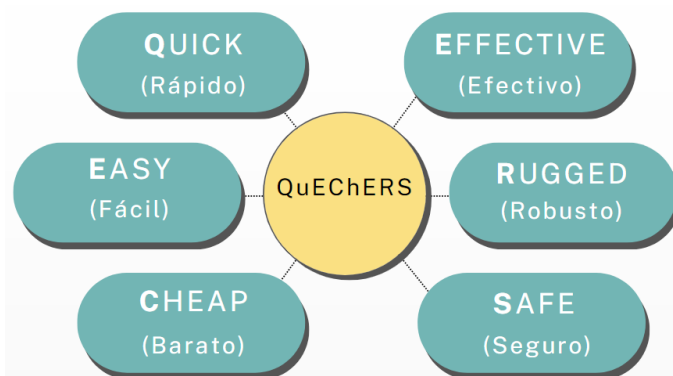


Figura 1.8. Características del método QuEChERS (Elaboración propia)

El método QuEChERS consta de dos etapas:

- Etapa de extracción simple con un disolvente orgánico, normalmente acetonitrilo, en presencia de una mezcla de diferentes sales. Así, se logra la separación de las fases y se ajusta el pH. Algunas de las sales que pueden utilizarse son NaCl, MgSO₄ y CH₃COONa.
- Etapa de limpieza o “clean-up” del extracto obtenido mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) con diversas sales y sorbentes, entre los que se encuentran: C18, carbón negro grafitizado (GCB) y amina primaria/secundaria (PSA). Gracias a esta etapa, se consigue eliminar el agua residual y los posibles interferentes de la matriz.

Tras aplicar el método QuEChERS, se centrifuga el extracto. De este modo, ya puede ser analizado directamente por cromatografía líquida o por cromatografía de gases.

Además de las propias características del método, otras ventajas que presenta son las siguientes: bajo consumo de disolventes y amplia aplicación sobre diversas matrices de alimentos.

1.4.2. Métodos de análisis

Los métodos analíticos más empleados para la detección y determinación de FB₁ son: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) y métodos inmunoquímicos.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es una técnica de separación de mezclas de componentes poco o nada volátiles. Se basa en la distribución de los componentes de la muestra entre dos fases: una fase móvil (disolvente) que se hace pasar a través de una columna, en la que se encuentra la otra fase (fase estacionaria). La muestra en disolución es inyectada en la fase móvil y esta es impulsada por una bomba hasta el detector (lugar en el que se cuantifican/caracterizan/detectan los analitos) pasando por todos los elementos del equipo. La separación de los componentes de la muestra se produce gracias a la diferente interacción de estos con la fase móvil y el relleno de la columna.

Los elementos básicos de un sistema para HPLC son: depósito para la fase móvil, desgaseificador, sistema de bombeo, inyector, columna cromatográfica (termostatizada), detector, sistema para el tratamiento de datos y registrador.

Existen dos tipos de HPLC en función de la naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria:

- HPLC en fase normal: fase estacionaria polar y fase móvil apolar.
- HPLC en fase reversa: fase estacionaria apolar y fase móvil polar.

Por último, cabe destacar que pueden usarse diferentes tipos de detectores, como detectores de fluorescencia o detectores de absorción UV-Vis.

Las principales ventajas del método HPLC son su elevada sensibilidad y el pequeño volumen de muestra que se requiere para el análisis. Por otro lado, entre sus inconvenientes, destacan su elevado coste y exigencia.

Cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)

En la actualidad, es una de las técnicas preferidas por los laboratorios para el análisis de fumonisinas en virtud de su elevada selectividad y sensibilidad. Es una técnica analítica que combina el poder de separación de la cromatografía líquida con el poder de detección e identificación de la espectrometría de masas.

En primer lugar, se inyecta la muestra en el cromatógrafo de líquidos, consiguiendo así la separación de sus componentes. Una vez separados, se ionizan (transformándose en partículas cargadas) para poder ser analizados por el espectrómetro de masas. A continuación, dichos iones migran a través de una serie de analizadores de masas. Finalmente, el espectrómetro detecta la relación masa/carga de los iones y genera un gráfico denominado espectro de masas.

Presenta tres grandes ventajas: elevada sensibilidad, elevada selectividad y notable eficacia. En cambio, sus principales inconvenientes son que el resultado del análisis depende fuertemente de la matriz y, por otro lado, su elevado coste.

Métodos inmunoquímicos

La base de estos métodos son las reacciones antígeno-anticuerpo. Se distingue entre:

- ELISA

El nombre que recibe esta técnica es el acrónimo en inglés de “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”. Por tanto, se trata de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

El fundamento se basa en la captura de antígenos diana en muestras utilizando anticuerpos específicos marcados con una enzima, y la posterior detección/cuantificación del antígeno de interés mediante una reacción enzimática colorimétrica con un sustrato.

En función de la unión antígeno-anticuerpo, se pueden distinguir cuatro tipos de ensayos ELISA: directo, indirecto, sándwich y competitivo. Los más ampliamente utilizados para el análisis de fumonisinas son el ELISA directo, el ELISA indirecto y el ELISA competitivo.

La representación esquemática de los tres ensayos se muestra en las Figuras 1.9, 1.10 y 1.11.

- ELISA directo

El antígeno (analito) se inmoviliza sobre la superficie de los pocillos de una microplaca absorbente. A continuación, se añade un anticuerpo primario marcado con una enzima que se unirá al antígeno de interés. Por último, se lleva a cabo la detección/cuantificación del antígeno añadiendo un sustrato que cambia de color cuando reacciona con la enzima, generando una señal visible.

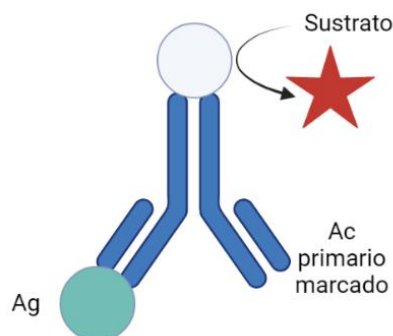


Figura 1.9. ELISA directo (Elaboración propia)

- ELISA indirecto

El antígeno (analito) se inmoviliza sobre la superficie de los pocillos de una microplaca absorbente. A continuación, se añade un anticuerpo primario no marcado que se une al antígeno de interés. Posteriormente, se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo

primario. Por último, se lleva a cabo la detección/cuantificación del antígeno añadiendo un sustrato que cambia de color cuando reacciona con la enzima, generando una señal visible.

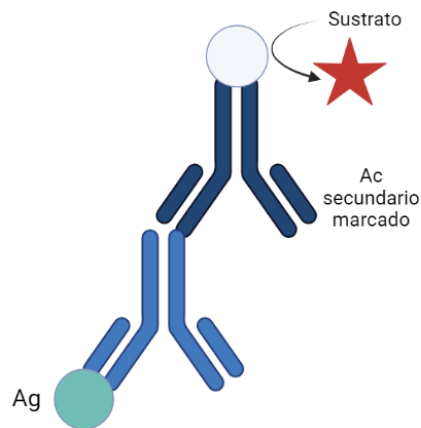


Figura 1.10. ELISA indirecto (Elaboración propia)

- ELISA competitivo

Se inmoviliza un antígeno de referencia sobre el pocillo de la microplaca. A continuación, se añade la muestra junto con un anticuerpo primario sin marcar. En ese momento, el antígeno de referencia va a competir con el antígeno de la muestra por la unión al anticuerpo. Seguidamente, se añade un anticuerpo secundario marcado, el cual se unirá al anticuerpo primario. Finalmente, se agrega un sustrato que cambia de color cuando reacciona con la enzima, generando una señal visible.

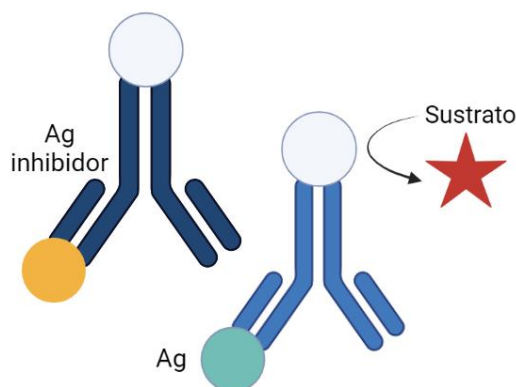


Figura 1.11. ELISA competitivo (Elaboración propia)

Las enzimas más utilizadas para el análisis de micotoxinas son: fosfatasa alcalina, peroxidasa de "horseradish" y β -galactosidasa.

Las ventajas más importantes de los ensayos ELISA son el pequeño volumen de muestra requerido, la sencillez y la alta especificidad y sensibilidad. Por otro

lado, sus principales inconvenientes son las posibles interferencias con la matriz y el elevado coste que supone la preparación de los anticuerpos.

- Tiras inmunocromatográficas (ICS)

Las tiras reactivas inmunocromatográficas también reciben el nombre de inmunoensayos de flujo lateral. El objetivo de estas tiras es detectar la presencia o ausencia del analito. En la Figura 1.12 se muestran sus cuatro componentes principales: almohadilla de muestra, almohadilla del conjugado, membrana y almohadilla absorbente.

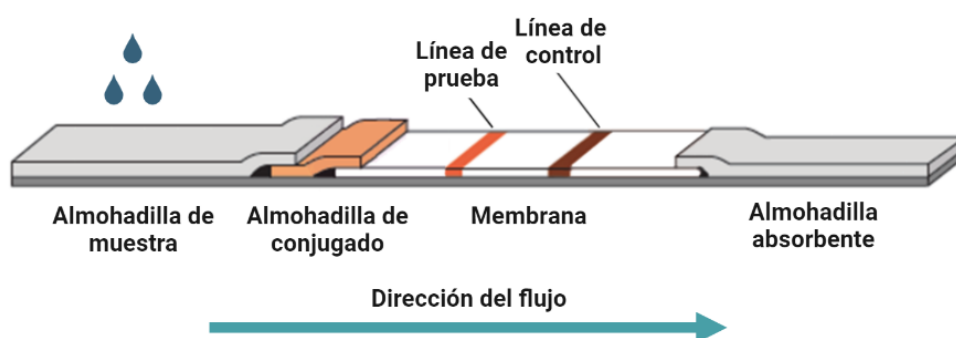


Figura 1.12. Partes de una tira inmunocromatográfica (Elaboración propia)

Los pasos a realizar son:

- Inmovilizar el anticuerpo marcado en la almohadilla del conjugado.
- Inmovilizar el anticuerpo de captura en la membrana.
- Añadir la muestra (en disolución) en la almohadilla de muestra.

Una vez añadida la muestra, esta migrará a través de la membrana hasta llegar a la almohadilla del conjugado. Allí se unirá con los anticuerpos de captura, formando la línea de prueba. El flujo de muestra continuará hasta llegar a la zona de control, donde se unirá con un exceso de anticuerpos marcados formando la línea de control.

El resultado será positivo si al final del ensayo aparecen las dos líneas. Por el contrario, si aparece solo la línea de control, el resultado será negativo.

Las ICS constituyen un método de detección rápido, específico, apto para análisis in situ y fácil de realizar. Entre sus desventajas, destaca la necesidad de preparar los anticuerpos.

2. OBJETIVOS

De acuerdo con lo estipulado en el Artículo 7 del Reglamento de los Trabajos de Fin de Grado en la Facultad de Ciencias Experimentales de la UJA: “El TFG supone la realización por parte del alumnado de un proyecto, memoria o estudio en el que se integran y desarrollan contenidos formativos recibidos, y debe estar orientado a la aplicación de competencias asociadas al título de Grado” (Reglamento de los Trabajos de Fin de Grado en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, 2017).

El objetivo fundamental del presente TFG es llevar a cabo una revisión bibliográfica de los diferentes métodos de análisis de FB₁ en maíz y productos derivados. Todo ello engloba, además, el estudio previo de los siguientes aspectos en relación con la micotoxina de interés: propiedades, toxicidad, problemática, alimentos afectados, efectos sobre el ser humano, efectos sobre los animales, límites legales y métodos de tratamiento de muestra.

3. METODOLOGÍA

La revisión y el estudio bibliográfico de los métodos de tratamiento de muestra habitualmente utilizados y de las diferentes técnicas de análisis se ha llevado a cabo mediante artículos científicos publicados en las siguientes bases de datos: *Google Académico*, *ScienceDirect*, *PubMed*, *Scopus*, *SpringerLink* y *MDPI*. Todas estas bases de datos han sido de gran utilidad para el desarrollo de este TFG, siendo cada una de ellas una gran fuente de información con un fácil acceso. Cabe señalar que, muchos de los artículos empleados, formaban parte de revistas científicas como *Food Control*, *Food Chemistry* o *Toxicon*, entre otras.

Además, gracias al servicio digital de Biblioteca de la Universidad de Jaén, se pudo acceder a diversos artículos, libros y revistas científicas de los que también se ha extraído información.

Con el objetivo de precisar y delimitar la búsqueda de artículos científicos, se han empleado algunos criterios de selección. El principal criterio utilizado ha sido el uso de palabras clave. Concretamente, se ha buscado: “*Fumonisin B1*”, “*Determination of fumonisin B1*”, “*Determination of fumonisin B1 in corn*” y

“Determination of fumonisin B1 in maize”. Por otro lado, también se ha estrechado el intervalo de tiempo, seleccionando solo aquellos artículos publicados desde 2010 hasta hoy.

Todas las páginas webs, libros y artículos científicos consultados para la elaboración de esta revisión bibliográfica se encuentran recogidos en el apartado de “Bibliografía”, redactados de acuerdo con el formato APA (estilo de redacción propuesto por la American Psychological Association).

Por último, resaltar que el presente TFG se ha redactado de acuerdo con el documento “Normas de Estilo de los TFG de la Facultad de Ciencias Experimentales”, disponible en la página web de la Universidad de Jaén.

4. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN

El maíz se ha convertido en uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a su importancia económica, potencial nutricional y adaptabilidad a diferentes climas y regiones (Abbade, 2020).

El consumo de maíz es muy habitual, pero sobre todo es especialmente habitual el consumo de productos derivados de este, entre los que se encuentran: harina de maíz, sémola de maíz, cereales de desayuno, snacks, jarabe de maíz, piensos para animales, etc. La problemática surge cuando el maíz es infectado por ciertos hongos dando lugar a la producción de micotoxinas, que son metabolitos secundarios perjudiciales para animales y humanos. En este alimento, predominan las fumonisinas (siendo la FB₁ la más abundante de todas). Por ende, es importante determinar la cantidad de fumonisinas presentes en el maíz y sus derivados, con el objetivo de velar por la seguridad alimentaria pública.

En España se han realizado numerosos estudios acerca de la contaminación por fumonisinas en diversos alimentos, principalmente en maíz y derivados. El resumen de estos estudios viene reflejado en la Tabla 4.1, en la que se muestran las tasas de contaminación por fumonisinas.

Tabla 4.1. Evaluación de la contaminación por fumonisinas en maíz y productos a base de maíz en España (Elaboración propia)

Muestra	Contaminación por fumonisinas (%)	Concentración media (µg/kg)	Referencias
Maíz convencional	13,3	0,065	(Ariño y col., 2007)
Maíz ecológico	10	0,054	
Copos de maíz	16,7	0,05-0,10	(Sanchis y col., 1994)
Harina de maíz	33,3	0,05-0,07	
Maíz triturado	20	0,05-0,09	
Pienso animal	79,5	3,3	(Castellá y col., 1999)
Grano de maíz	100	0,72	(Visconti y col., 1995)
Maíz dulce	100	0,72	

5. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE FUMONISINAS B₁ EN MAÍZ Y SUS DERIVADOS

5.1. Investigación bibliográfica

En la Tabla 5.1 se recoge la investigación bibliográfica llevada a cabo en relación con la determinación exclusiva de FB₁ en maíz y derivados. Dicha Tabla está constituida por un total de 32 artículos científicos.

Por otro lado, en la Tabla 5.2 se reúne la investigación bibliográfica llevada a cabo en relación con la determinación simultánea de FB₁ y otras micotoxinas en maíz y derivados, si bien es cierto que solo se recogen los datos específicos de la primera. En este caso, la Tabla está compuesta por un total de 24 artículos científicos.

En ambas Tablas se recoge la siguiente información: país de origen, número de muestras totales, tipo de muestra (matriz), tratamiento de muestra, técnicas de extracción y purificación, técnica analítica, analito, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y referencia del artículo.

Tabla 5.1. Investigación bibliográfica sobre la determinación de FB₁ en maíz y derivados (Elaboración propia)

País	Muestras totales	Tipo de muestra (matriz)	Tratamiento de muestra	Técnicas de extracción y purificación	Técnica analítica	Analito	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Referencia
China	30	Maíz	Molienda	Extracción S-L (PBS*)	ic-ELISA (basado en scFv)*	FB ₁	8,32	15	(Zou y col., 2013)
China	-	Harina de maíz	Almacenamiento (T ^a ambiente / noche)	Extracción S-L (metanol:agua, 4:6 v/v)	ICA* (basado en fluorescencia)	FB ₁	0,12 ng/mL	-	(Wang y col., 2014)
Irán	-	Harina de maíz	Molienda e incubación (T ^a ambiente / 24 h)	Extracción S-L (metanol:agua, 20:80 v/v)	Aptasensor electroquímico (SPCE modificado con AuNP)*	FB ₁	0,14 ng/mL	0,46 ng/mL	(Naghshbandi y col., 2023)
Indonesia	53	Maíz	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 70:30 v/v)	MINA*	FB ₁	0,001 ng/mL	-	(Munawar y col., 2019)
China	-	Maíz	-	Extracción S-L (metanol:agua, 1:1 v/v)	ic-ELISA (basado en MAb)*	FB ₁	5,4	-	(Sheng y col., 2012)
China	8	Maíz	Trituración	Extracción S-L (acetónitrilo:agua, 50:50 v/v)	ICS* (basada en scFv)	FB ₁	25	-	(Ren y col., 2020)
China	16	Maíz	Molienda	Extracción S-L (PBS 0,01 M)	ic-pELISA*	FB ₁	0,31 ng/ml	-	(Zhan y col., 2019)
Brasil	5	Maíz	Homogeneización en licuadora	Extracción S-L (metanol:agua, 8:2 v/v)	MIP-PSI-MS*	FB ₁	0,1 ng/mL	0,4 ng/mL	(Ramalho y col., 2022)

China	-	Harina de maíz	-	Extracción S-L (acetonitrilo:agua, 1:1 v/v)	Apt-PEG-MBs-UPLC*	FB ₁	3,75 ng/mL	-	(Deng y col., 2022)
China	-	Maíz	-	SPE	HPLC-MS/MS*	FB ₁	75 pg	-	QiuYan y col., 2010)
Irak	30	Mazorcas de maíz	Molienda	Extracción S-L (metanol al 70%)	ELISA competitivo	FB ₁	-	-	(Mohammed y col., 2021)
China	-	Maíz blanco	Molienda y secado (noche)	Extracción S-L (metanol:agua, 70:30 v/v)	IMB-ELISA* competitivo indirecto	FB ₁	0,24 ng/mL	-	(Wang y col., 2014)
China		Maíz	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 60:40 v/v) y posterior incubación a -20°C	AIE-ICS*	FB ₁	0,024 ng/mL	-	(Xu y col., 2023)
España	-	Maíz	-	Extracción S-L (70% MeOH-H ₂ O)	Inmunoensayo electroquímico multicanal competitivo	FB ₁	0,58 ± 0,05 ng/mL	-	(Ezquerria y col., 2015)
China	-	Maíz y trigo	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 75:25, v/v) (acetonitrilo:agua, 84:16, v/v) (etanol:agua, 20:80, v/v)	MECLIA*	FB ₁	0,027 ng/mL	-	(Jie y col., 2018)
EE.UU	32	Cereales desayuno (maíz)	-	Extracción S-L (metanol:tampón Na ₃ PO ₄ 0,1M, 1:1 v/v), y posterior SPE	CL*	FB ₁	10	100	(Trucksess y col., 2010)

EE.UU	-	Maíz	Molienda y almacenamiento (-20°C)	Extracción S-L (ACN:MeOH:agua, 25:25:50 v/v/v)	HPLC-FLD*	FB ₁	0,4	1,2	(Jakšić y col., 2015)
China	-	Harina de maíz	-	Extracción S-L (ACN-agua, 1:1 v/v) y posterior SPE	Espectrometría de fluorescencia	FB ₁	0,119 ng/mL	-	(Li y col., 2020)
Italia	19	Alimentos para bebés a base de maíz	Molienda	Extracción S-L (ACN:MeOH:tampón fosfato/citrato, 25:25:50 v/v/v) y posterior IAC (metanol)	HPLC-FLD	FB ₁	-	2,8	(de Girolamo y col., 2010)
China	69	Maíz, arroz y trigo	-	Extracción S-L (PBS 0,01 M)	ICS (basada en UGNs)*	FB ₁	5 ng/mL	-	(Ren y col., 2015)
Tailandia	-	Maíz	Corte en licuadora, almacenamiento (-20°C) y secado (horno)	QuEChERS (ligeramente modificado)	Ensayo colorimétrico (basado en Cys-AuNPs)*	FB ₁	0,90	2,74	(Chotchuang y col., 2019)
China	-	Maíz y pienso	-	-	ICS	FB ₁	0,025 ng/mL	-	(Zha y col., 2021)
China	-	Maíz (granos, pan y vaina)	-	-	Inmunoensayo competitivo (basado en oro coloidal-Ac)	FB ₁	2,5 ng/mL	-	(Ling y col., 2015)
China	-	Maíz	Molienda	Extracción S-L (metanol al 70%)	ICS (basado en oro coloidal)	FB ₁	-	-	(Hao y col., 2018)

China	96	Maíz	Trituración	Extracción S-L (metanol al 60% en PBS)	ic-ELISA	FB ₁	1,15 ng/mL	-	(Wang y col., 2016)
China	-	Harina de maíz	-	Extracción S-L (metanol)	Aptasensor fluorescente	FB ₁	14,42 ng/mL	43,70 ng/mL	(Zhao y col., 2022)
China	-	Harina de maíz	-	Extracción S-L (metanol:agua, 70:30 v/v)	Inmunoensayo fluorimétrico (basado en AuNP@MnO ₂)*	FB ₁	0,06 ng/mL	0,20 ng/mL	(Yu y col., 2023)
China	-	Maíz	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 20:80 v/v)	Aptasensor electroquímico basado en EIS*	FB ₁	2 pM	-	(Chen y col., 2015)
India	150	Maíz, sorgo, trigo y arroz con cáscara	-	Extracción S-L (metanol:agua, 3:1 v/v) y posterior SPE	ICS (basada en pAb)	FB ₁	5 ng/mL	-	M. Venkataramana y col., 2014)
China	-	Maíz y productos derivados (harina, pan, tortas)	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 7:3 v/v)	ic-ELISA (basado en McAb)	FB ₁	1 ng/mL	-	(Ling y col., 2014)
Brasil	105	Maíz y productos derivados	-	Extracción S-L (metanol:ACN:agua, 25:25:50 v/v) y posterior IAC	HPLC	FB ₁	2	10	(E. Peluque y col., 2013)
China	-	Maíz	-	Extracción S-L (ACN:agua, 1:1 v/v) y posterior lavado en IAC	Inmunosensor electroquímico (basado en SWNTs/CS/GCE) *	FB ₁	0,002 ng/mL	-	(Yang y col., 2015)

* **PBS**: tampón fosfato salino. **ic-ELISA (basado en scFv)**: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo indirecto (basado en anticuerpos de fragmentos variables de cadena única). **ICA**: ensayo inmunocromatográfico. **SPCE modificado con AuNP**: electrodo de carbono serigrafiado modificado con nanopartículas de oro. **MINA**: nanopartículas poliméricas impresas molecularmente. **ic-ELISA (basado en MAb)**: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo indirecto (basado en anticuerpos monoclonales). **ICS**: tira inmunocromatográfica. **ic-pELISA**: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas plasmónicas competitivo indirecto. **MIP-PSI-MS**: espectrometría de masas de ionización por aspersión de papel de polímero impreso molecularmente. **Apt-PEG-MBs-UPLC**: aptómetro con perlas magnéticas funcionalizadas y cromatografía líquida de ultra rendimiento. **HPLC-MS/MS**: cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas en tandem. **IMB-ELISA**: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas basado en perlas inmunomagnéticas. **AIE-ICS**: tira inmunocromatográfica basada en microesferas altamente luminiscentes de emisión inducida por agregación. **MECLIA**: inmunoensayo de quimioluminiscencia enzimática magnética. **CL**: cromatografía líquida. **IAC**: columna de inmunoafinidad. **HPLC-FLD**: cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia. **ICS (basada en UGNs)**: tira inmunocromatográfica (basada en nanopartículas de oro de tipo erizo). **Cys-AuNPs**: nanopartículas de oro recubiertas de cisteamina. **AuNP@MnO₂**: nanoláminas bidimensionales de MnO₂ monodispersas en una nanopartícula de oro individual. **EIS**: espectroscopia de impedancia electroquímica. **SWNTs/CS/GCE**: nanotubos de carbono de pared simple/quitosano/electrodo de carbono de vidrio.

Tabla 5.2. Investigación bibliográfica sobre la determinación de FB₁ en maíz y derivados (Elaboración propia)

País	Muestras totales	Tipo de muestra (matriz)	Tratamiento de muestra	Técnicas de extracción y purificación	Técnica analítica	Analito	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Referencia
Italia	168	Harina de maíz	Secado a 60°C, molienda y almacenamiento (lugar húmedo)	Extracción S-L (acetonitrilo:metanol:agua, 25:25:50) y posterior IAC*	FT-NIR*	FB ₁ FB ₂	-	-	(Gaspardo y col., 2012)
Vietnam	19	Granos de maíz	Molienda	Extracción S-L (PBS* 0,4 M)	ICS (basado en IgY)*	FB ₁ FB ₂	4000	-	(Viet Tran y col., 2019)
Italia	27	Granos, pienso, almidón y harina de maíz	Molienda y homogeneización (granos y piensos)	Extracción S-L (PBS con adición de PEG* al 2%, p/v)	ICS	FB ₁ FB ₂	12 ng/mL	-	(Anfossi y col., 2010)
China	18	Maíz y trigo	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 70% v/v)	ic-ELISA*	FB ₁ , DON, ZEN	60 ng/mL	-	(Hou y col., 2020)
China	62	Maíz	Secado y molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 3:1 v/v)	HPLC-ESI-MS-MS*	FB ₁ FB ₂	3,5	11,7	(Liang Wu y col., 2012)
Malasia	53	Maíz, arroz, copos de maíz y piensos	-	Extracción S-L (acetonitrilo:agua, 50:50 v/v) y posterior SPE	HPLC-fluorescencia	FB ₁ FB ₂	10	40	(Khayoon y col., 2010)
EE.UU	-	Harina de maíz y piensos	-	Extracción S-L (metanol:agua, 70:30 v/v) y posterior filtración	LC-MS/MS*	FB ₁ FB ₂ FB ₃	30	100	(Li y col., 2010)

Alemania	19	Maíz dulce enlatado, maíz dulce fresco, sémola de maíz, harina de maíz y copos de maíz	Molienda (copos) y liofilización (maíz fresco). Almacenamiento en la oscuridad (18°C) y congelación (-20°C)	Extracción S-L (ACN:metanol:agua, 25:25:50 v/v)	HPLC-FLD*	FB ₁ FB ₂	29,2	88	(Kaltner y col., 2016)
Portugal	22	Maíz	Molienda y homogeneización	Extracción S-L (acetónitrilo al 80%)	UHPLC-ToF-MS*	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , OTA, ZEA, toxina T-2*, FB ₁ , FB ₂	62,5	125	(Silva y col., 2019)
Costa de Marfil	238	Maíz, harina de maíz, arroz y pasta de maní	Molienda y almacenamiento (20°C)	QuEChERS*	UHPLC-MS/MS*	Micotoxinas (77)	0,5	1	(Manizan y col., 2018)
China	173	Maíz	Trituración	-	NIR	FB ₁ FB ₂	-	-	(Shen y col., 2022)
China	-	Maíz, cebada, avena y mijo	-	-	IATC*	FB ₁ FB ₂ FB ₃	20	-	(Sheng y col., 2018)
China	-	Harina de maíz	-	Extracción S-L (metanol:agua, 2:3 v/v)	FPIA*	FB ₁ FB ₂	157,4	-	(Li y col., 2015)
China	-	Maíz y trigo	Almacenamiento (4 °C / noche)	Extracción S-L (metanol:agua, 80:20 v/v)	LFDA*	ZEN, FB ₁	5,23 ng/mL	-	(Wang y col., 2013)

China	66	Maíz	-	Extracción S-L (acetonitrilo:agua, 1:1 v/v) y posterior SPE	UHPLC-MS/MS	FB ₁ FB ₂ FB ₃	0,45	1,50	(Ren y col., 2011)
Brasil	-	Maíz (granos y sémola)	Molienda y almacenamiento (-10 °C)	MSPD*	HPLC-MS/MS	FB ₁ FB ₂	514	594	(De Oliveira y col., 2017)
China	69	Maíz y trigo	Pulverización	Extracción S-L (agua ultrapura)	ICS (basada en AuNS)*	FB ₁ , DON	20 ng/mL	-	(Huang y col., 2020)
China	-	Maíz, trigo y maní	-	IMSPE*	UHPLC-MS/MS	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , FB ₁ , T-2, CPA*	0,02	0,06	(Wang y col., 2022)
Brasil	50	Harina de maíz	Molienda, y homogeneización y refrigeración (2-8 °C)	Extracción S-L (metanol:acetonitrilo:agua, 60:20:20 v/v/v)	UHPLC-MS/MS	Aflatoxinas, FB ₁ , ZEA	9,65	32,16	(Paschoal y col., 2016)
China	-	Maíz	Molienda	Extracción S-L (metanol al 75%)	ICS	DON, FB ₁ , AFB ₁	30 ng/mL	-	(Yu y col., 2018)
Japón	34	Maíz, trigo y cebada	Molienda	QuEChERS y posterior SPE	LC-Orbitrap MS*	20 toxinas de <i>Fusarium</i>	-	5	(Tamura y col., 2015)
Corea del Sur	507	Maíz, arroz integral, mijo, sorgo y cereales mixtos	Molienda	Extracción S-L (ACN:agua:ácido acético, 79,5:20:0,5 v/v/v) y posterior IAC (metanol al 80%)	LC/MS/MS	Micotoxinas (13)	2,4	7,3	(Kim y col., 2017)

Italia	21	Derivados de cereales (maíz, arroz, etc)	-	QuEChERS	LC-MS/MS	Aflatoxinas, T-2, HT-2*, FB ₁ , FB ₂ ,	100	200	Annunziata y col., 2017)
China	-	Maíz	Molienda y almacenamiento (-18°C)	QuEChERS	UPLC-Q-TOF-MS*	Aflatoxinas, FB ₁ , FB ₂ , FB ₃ , DON, ZEN	5	15	Wang y col., 2016)

* **IAC:** columna de inmunoafinidad. **FT-NIR:** espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier. **PBS:** tampón fosfato salino. **ICS (basado en IgY):** inmunoensayo de flujo lateral (basado en inmunoglobulinas de yema de huevo). **PEG:** polietilenglicol. **ic-ELISA:** ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo indirecto. **HPLC-ESI-MS-MS:** cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas en tándem de ionización por electrospray. **LC-MS/MS:** cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem. **HPLC-FLD:** cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia. **UHPLC-ToF-MS:** cromatografía líquida de ultra rendimiento-espectrometría de masas de tiempo de vuelo. **T-2:** micotoxina T-2 (micotoxina tricotecena). **QuEChERS:** Extracción en fase sólida dispersiva. **UHPLC-MS/MS:** cromatografía líquida de ultra rendimiento con espectrometría de masas en tándem. **IATC:** columna de prueba de inmunoafinidad. **FPIA:** inmunoensayo de polarización de fluorescencia. **LFDIA:** inmunoensayo dual de flujo lateral. **MSPD:** extracción por dispersión de la matriz en fase sólida. **ICS (basada en AuNS):** Tira reactiva inmunocromatográfica (basada en nanoesferas de oro). **IMSPE:** extracción inmunomagnética en fase sólida. **CPA:** ácido ciclopiazónico. **LC-Orbitrap MS:** cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas Orbitrap. **HT-2:** toxina HT-2 (micotoxina tricotecena). **UPLC-Q-TOF-MS:** cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo.

5.2. Técnicas de extracción y purificación empleadas

Con el objetivo de llevar a cabo la determinación de FB₁ en maíz y derivados, la muestra debe ser tratada con técnicas de extracción y purificación. De acuerdo con lo dicho en el apartado 1.4.1, las técnicas de extracción y purificación más habitualmente empleadas son: extracción sólido-líquido (S-L), extracción en fase sólida (SPE), extracción con columnas de inmutioafinidad (IAC) y extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS).

Extracción sólido-líquido

La técnica de extracción sólido-líquido es una de las más empleadas (con diferencia) de entre toda la bibliografía seleccionada.

Esta técnica se llevó a cabo, por ejemplo, en el estudio desarrollado por Yuan Kai Wang (Wang y col., 2014). En primer lugar, se molieron las muestras de maíz y se incubaron a 60° durante toda la noche para secarlas. Posteriormente, a cada 10 g de muestra se le añadió la disolución estándar de FB₁ y se dejó en reposo durante 12 horas. A continuación, se llevó a cabo una extracción sólido-líquido agregando 40 mL de metanol:agua (70:30, v/v) a cada muestra y agitando enérgicamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras 10 minutos de reposo, el sobrenadante se separó por centrifugación a 4000 xg.

Otra mezcla de disolventes que puede utilizarse para la extracción es la de acetonitrilo y agua. Esta mezcla fue utilizada en el estudio realizado por Deng (Deng y col., 2023). En este caso, se pesaron 5 g de harina de maíz, a los que se le agregaron 20 mL de agua:acetonitrilo (1:1, v/v) para llevar a cabo la extracción. Seguidamente, se centrifugó la muestra a 1600 xg durante 5 minutos y se extrajeron 1,2 mL del sobrenadante. El volumen de sobrenadante extraído se diluyó con 28 mL de PBS y se volvió a centrifugar a 3200 xg durante 10 minutos. Por último, se recuperó el sobrenadante.

Cabe mencionar que la mayoría de los estudios seleccionados optan por llevar a cabo la extracción S-L utilizando mezclas de metanol y agua.

Extracción en fase sólida

Esta técnica se empleó en el estudio realizado por Li (Li y col., 2020) como técnica de purificación. Inicialmente, se pesaron 2 g de polvo de harina de maíz.

Posteriormente, se añadió a cada muestra 25 mL de acetonitrilo:agua (1:1, v/v) para su extracción, y se agitó la mezcla durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se filtró a través de filtros de fibra de vidrio. Después, se llevó a cabo la dilución del extracto en metanol:agua (3:1, v/v). Finalmente, se purificó un volumen de 10 mL del extracto diluido empleando una columna de extracción en fase sólida C18.

La extracción en fase sólida también ha sido utilizada en el estudio desarrollado por M. Venkataramana (M. Venkataramana y col., 2014) como técnica de *clean-up*. En este estudio, se pesaron 5 g de muestra y se extrajeron con metanol:agua (3:1, v/v) usando un licuador. Seguidamente, se centrifugó la muestra a 1500 xg durante 10 minutos y a 4°C. La mezcla resultante se hizo pasar por un papel de filtro y se ajustó su pH a 6. A continuación, 5 mL del extracto filtrado fueron colocados en un cartucho de SPE de intercambio aniónico. Inicialmente, el cartucho se acondicionó haciendo pasar pequeños volúmenes de metanol de manera sucesiva. Seguidamente, se lavó con metanol:agua (3:1, v/v) y con 3 mL de metanol. Por último, se agregaron 10 mL ácido acético al 1% en metanol para extraer las fumonisinas del cartucho.

Extracción con columnas de inmunoafinidad

Las columnas de inmunoafinidad constituyen uno de los métodos de extracción y purificación de micotoxinas más comúnmente empleados por los laboratorios a día de hoy.

Este tipo de columnas se han utilizado en varios estudios, entre los que se encuentra el estudio realizado por de Girolamo (de Girolamo y col., 2010). Primeramente, se pesaron 20 g de la muestra molida. En segundo lugar, se agregaron 100 mL de la mezcla de disolventes para la extracción, constituida por acetonitrilo:metanol:tampón fosfato/citrato (25:25:50 v/v/v). A continuación, la mezcla se mantuvo durante 60 minutos en un baño de agua a 55°C. Tras el baño, se agitó la mezcla con la ayuda de un agitador orbital durante 30 minutos y, posteriormente, se centrifugó a 3000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de papel Whatman y se tomó una alícuota de 10 mL, la cual se diluyó con 40 mL de agua. El extracto diluido se volvió a filtrar y se tomaron 25 mL de este para hacerlo pasar a través de la columna de

inmunoafinidad. Dicha columna se lavó con 10 mL de PBS y 2 mL de agua. Finalmente, las fumonisinas fueron eluidas empleando 2 porciones de 1 mL de metanol.

Por otro lado, el estudio llevado a cabo por Jakšić (Jakšić y col., 2015) también optó por el uso de columnas de inmunoafinidad como técnica de purificación. Para extraer las fumonisinas del cartucho se utilizó metanol como eluyente (3 mL).

Extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS)

Uno de los estudios que utiliza esta técnica en su procedimiento es el de Yan Wang (Wang y col., 2016). En primer lugar, se pesaron 2 g de las muestras de maíz molidas en un tubo de polipropileno de 50 mL. Seguidamente, se extrajeron las muestras mediante la adición de 20 mL de acetonitrilo:agua (84:16, v/v). Para ello, se introdujo el tubo en cuestión en un baño de agua ultrasónico durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Con el fin de asegurar la extracción completa de las micotoxinas, se añadieron además 2 g de MgSO_4 y 0,5 g de NaCl. Posteriormente, se agitó la mezcla manualmente y de manera enérgica durante 1 minuto y, después, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Por otro lado, para realizar la etapa de limpieza, se transfirieron 2 mL del extracto a un tubo de centrífuga de 5 mL con el sorbente (C18/PSA/GCB). Tras agitar vigorosamente durante 1 minuto, el tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante se recogió y se evaporó hasta casi sequedad. El extracto seco se redisolvió con metanol:agua y, justo antes del análisis, se filtró a través de un filtro de jeringa PTFE.

Por otro lado, Chotchuang y sus colaboradores (Chotchuang y col., 2019) optaron por realizar la extracción y la limpieza de las muestras utilizando el método QuEChERS (ligeramente modificado) con el cartucho Oasis PRIME HLB. En este caso, para asegurar una extracción completa, se decidió agregar dos sales de citrato (citrato trisódico dihidratado y citrato de hidrógeno disódico sesquihidrato), además de NaCl y MgSO_4 . La purificación del sobrenadante obtenido se llevó a cabo en el cartucho mencionado anteriormente.

5.3. Técnicas analíticas empleadas

Como se puede observar en las Tablas del apartado 5.2, los métodos analíticos más frecuentemente utilizados para la determinación de FB₁ en maíz y productos derivados son los siguientes: ELISA, tiras inmunocromatográficas, técnicas cromatográficas (HPLC y (U)HPLC-MS/MS) y aptasensores electroquímicos.

ELISA

Esta técnica es una de las más empleadas para el análisis de FB₁, siendo la técnica de análisis seleccionada por 8 de los artículos científicos estudiados.

Esta técnica fue utilizada en el estudio de Sheng (Sheng y col., 2012). Concretamente, se desarrolló un ELISA competitivo indirecto muy sensible basado en un anticuerpo monoclonal (MAb). La técnica se aplicó sobre diferentes muestras de maíz procedentes de mercados locales de Pekín y se consiguió un límite de detección de 5,4 µg/kg.

En Fuzhou (China) también se desarrolló un ELISA competitivo indirecto basado en anticuerpo monoclonal (mcAb) contra FB₁. Dicha técnica fue empleada por Ling (Ling y col., 2014). El ic-ELISA se aplicó a diversas muestras de maíz recolectadas al azar (pan de maíz, harina de maíz y tortas de maíz). Como resultado, se obtuvo un límite de detección de 1 ng/mL.

Por otro lado, Zhan y sus colaboradores (Zhan y col., 2019) desarrollaron un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas plasmónicas (pElisa), el cual resultó ser bastante sensible para detectar a simple vista la FB₁. El pELISA competitivo indirecto propuesto se aplicó sobre numerosas muestras de maíz, logrando un límite de detección de 0,31 ng/mL.

Tiras inmunocromatográficas

Las tiras inmunocromatográficas (ICS) constituyen otra alternativa para la detección de FB₁. De todos los artículos estudiados, 10 de ellos optan por el uso de estas tiras.

En China, Ren (Ren y col., 2020) realizó un estudio en el que se llevó a cabo la detección de FB₁ en muestras de maíz a través de una tira inmunocromatográfica basada en anticuerpos de fragmento variable

monocatenario (scFv). La tira reactiva presentó un límite de detección de 25 µg/kg).

En otro estudio, elaborado por Huang (Huang y col., 2020), se desarrolló una tira inmunocromatográfica basada en AuNS-Mabs (anticuerpos monoclonales marcados con nanoesferas de oro). Esta técnica se usó para la detección simultánea de FB₁ y DON. Se aplicó a 51 muestras de trigo y 18 muestras de maíz. El límite de detección obtenido para esta tira reactiva fue de 20,0 ng/mL para ambos analitos.

También en China, Xu y sus colaboradores (Xu y col., 2023) desarrollaron una ICS para detectar FB₁ en muestras reales de maíz. Concretamente, se desarrolló un inmunoensayo de flujo lateral basado en microesferas fluorescentes ultrabrillantes, las cuales reciben el nombre de AIEMB. La técnica demostró una excelente sensibilidad, presentando un límite de detección de 0,024 ng/mL para la FB₁.

Técnicas cromatográficas

HPLC se utilizó, por ejemplo, en el estudio de Jakšić (Jakšić y col., 2015) y en el de de Girolamo (de Girolamo et al, 2010). En ambos casos se usó un detector de fluorescencia, por lo que el nombre completo de la técnica de análisis sería HPLD-FLD.

En el estudio de Jakšić (Jakšić y col., 2015) se analizaron diversas muestras de maíz, obteniendo un límite de detección de 0,4 µg/kg y un límite de cuantificación de 1,2 µg/kg.

Por otro lado, en el segundo estudio, se analizaron 19 alimentos para bebés elaborados a base de maíz. En el artículo no viene reflejado el límite de detección, pero sí el límite de cuantificación, que es de 2,8 µg/kg.

La cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas en tándem ((U)HPLC-MS/MS) es otra técnica cromatográfica muy comúnmente utilizada para detectar FB₁ en maíz y productos derivados. Más de 10 artículos de los seleccionados hacen uso de esta técnica.

Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Barros de Oliveira (de Oliveira y col., 2017). En él, se analizaron diferentes tipos de muestras de maíz (granos de palomitas, sémola de maíz y granos de maíz blanco) con HPLC-MS/MS.

Como resultado, se obtuvo un límite de detección y un límite de cuantificación para FB₁ de 514 µg/kg y 594 µg/kg, respectivamente.

En diversos estudios se ha empleado también la técnica de UHPLC-MS/MS para la detección simultánea de varias micotoxinas (incluida la micotoxina de interés). Es el caso de los estudios desarrollados por Manizan (Manizan y col., 2018) y por Paschoal (Paschoal y col., 2017). En el primero de ellos se analizó un total de 238 muestras de maíz y harina de maíz, entre otros. Con respecto a la FB₁, se logró un límite de detección de 0,5 µg/kg y un límite de cuantificación de 1 µg/kg. En cuanto al segundo estudio, se analizaron 50 muestras de harina de maíz. Los límites de detección y cuantificación obtenidos en este caso fueron 9,65 µg/kg y 32,16 µg/kg, respectivamente.

Aptasensores electroquímicos

Un estudio desarrollado en China y realizado por Zhao (Zhao y col., 2022) optó por el uso de un aptasensor fluorescente para la detección de FB₁. El análisis se llevó a cabo sobre numerosas muestras de harina de maíz, lográndose un límite de detección de 14,42 ng/mL y un límite de cuantificación de 43,70 ng/mL.

Esta técnica alternativa también fue estudiada por Naghshbandi (Naghshbandi y col., 2023). En este caso, se desarrolló un aptasensor electroquímico basado en un electrodo de carbono serigrafiado modificado con nanopartículas de oro, también para la detección de FB₁ en harina de maíz. Así, se consiguieron límites de detección y cuantificación inferiores a los anteriores: 0,14 ng/mL y 0,46 ng/mL, respectivamente.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con la revisión y la investigación bibliográfica llevada a cabo, se pueden extraer una serie de conclusiones.

Muchos de los estudios se centran en la puesta a punto del método. Para ello, se agregan concentraciones conocidas de FB₁ en los alimentos para su posterior análisis. En otras palabras, la muestra se enriquece con FB₁. Este es

el caso del artículo perteneciente a Xu (Xu et al, 2023) o del estudio elaborado por Hao (Hao et al, 2018).

Sin embargo, otros estudios también analizan directamente muestras reales. De esta forma, se puede saber en qué países existen altos niveles de FB₁ en maíz y derivados. Por ejemplo, en China, Ren (Ren y col., 2020) analizó en su estudio 8 muestras naturales de maíz, las cuales fueron compradas en un mercado local de China. De las 8 muestras, solo una de ellas presentaba altas concentraciones de FB₁. En el resto, se detectaron cantidades de FB₁ muy pequeñas e inferiores al límite de 1000 µg/kg establecido por la legislación (suma de FB₁ y FB₂).

Por otro lado, en Irak, Sinai W. Mohammed (Mohammed y col., 2021) llevó a cabo el análisis de 30 muestras naturales de mazorcas de maíz procedentes de mercados locales y silos de la provincia de Bagdad. La concentración máxima de FB₁ en las muestras obtenidas de los silos fue de 175,54 µg/kg, mientras que la concentración máxima de FB₁ en las muestras de los mercados locales fue de 172,88 µg/kg.

Cabe señalar con carácter general que, en aquellas muestras reales en las que se ha detectado FB₁, ésta estaba presente a niveles de traza y el valor no superaba los límites máximos establecidos por la legislación (a excepción del caso mencionado anteriormente).

En cuanto a las técnicas de extracción, cabe destacar que la extracción S-L con disolventes es la técnica preferida por los estudios seleccionados. 44 de los 54 artículos científicos optan por ella. En la mayoría de los casos, el disolvente empleado ha sido una mezcla de metanol:agua o acetonitrilo:agua. Sin embargo, el primero de ellos ha sido el más utilizado con diferencia.

Por otro lado, en aquellos estudios en los que se lleva a cabo la purificación del sobrenadante de la extracción, se opta preferentemente por cartuchos de extracción en fase sólida o por columnas de inmunoafinidad.

En cuanto a las técnicas analíticas, las más utilizadas en los artículos seleccionados han sido: técnicas cromatográficas, ELISA y tiras inmunocromatográficas.

A la hora de seleccionar un método de análisis es importante tener en cuenta el LOD, que se define como la menor cantidad de analito que se puede detectar con fiabilidad. Un LOD bajo significa que la técnica es capaz de detectar

cantidades más pequeñas del analito con mayor precisión. Por tanto, a menor LOD, mayor será la sensibilidad del método analítico.

A continuación, en la Tabla 6.1, se recogen las técnicas con menor LOD de los artículos estudiados:

Tabla 6.1. Técnicas analíticas con menor límite de detección (Elaboración propia)

Límite de detección	Técnica analítica	Referencia
5,4 µg/kg	ic-ELISA (basado en MAb)	(Sheng y col., 2012)
0,025 ng/mL	ICS	(Zha y col., 2021)
0,4 µg/kg	HPLC-FLD	(Jakšić y col., 2015)
0,45 µg/kg	UHPLC-MS/MS	(Ren y col., 2011)
0,14 ng/mL	Aptasensor electroquímico (SPCE modificado con AuNP)	(Naghshbandi y col., 2023)

Como puede observarse en la Tabla, las técnicas cromatográficas HPLC-MS/MS y HPLC-FLD ofrecen límites de detección más bajos que ic-ELISA, por lo que son más sensibles. No obstante, el método ic-ELISA demostró ser sencillo, rentable y rápido.

Por otro lado, el aptasensor electroquímico presenta un LOD más elevado que la tira inmunocromatográfica (ICS), lo cual significa que el aptasensor es menos sensible. Ahora bien, el aptasensor en cuestión mostró una excelente selectividad, una muy buena recuperación y, reproducibilidad y repetibilidad aceptables. Por tanto, a pesar de tener un LOD más bajo que ICS, presenta un gran potencial para detectar FB₁ en maíz.

Generalmente, al realizar un análisis, se opta por el uso de aquellos métodos analíticos más comunes (aunque su coste sea un poco más elevado). Es por ello que, finalmente, se llega a la conclusión de que la técnica más idónea para la determinación de FB₁ en maíz y derivados es UHPLC-MS/MS. A pesar de tener un LOD ligeramente más alto que otras técnicas estudiadas, esta técnica cromatográfica presenta varias ventajas. De acuerdo con el estudio de Ren (Ren y col., 2011), el método UHPLC-MS/MS empleado resultó ser más rápido, más sensible y más selectivo que ELISA y HPLC, entre otros. Además, mostró una muy buena recuperación, es aplicable a todo tipo de muestras y puede analizar

diferentes tipos de fumonisinas a la vez. La alta sensibilidad de dicha técnica se demuestra, por ejemplo, en el estudio mencionado previamente (Ren y col., 2011), ya que se obtiene un LOD de 0,45 µg/kg. Otro ejemplo sería el estudio desarrollado por Manizan (Manizan y col., 2018), en el que se consigue un LOD de 0,5 µg/kg.

Si lo que se desea es realizar un análisis extremadamente rápido, la técnica ELISA podría ser el método más conveniente debido a su elevada rapidez.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbade, E. B. (2020). Land and water footprints associated with rice and maize losses in Brazil. *Land Use Policy*, 99, 105106. doi:<https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2020.105106>
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2022). *Micotoxinas*. Obtenido de AESAN: <https://onx.la/8f345>
- Alltech. (2018). *Fumonisinas en el alimento: comprender la amenaza oculta para la salud del ganado*. Obtenido de Alltech Spain: <https://goo.su/PAPf7Dn>
- Anfossi, L., Calderara, M., Baggiani, C., Giovannoli, C., Arletti, E., & Giraudi, G. (2010). Development and application of a quantitative lateral flow immunoassay for fumonisins in maize. *Analytica Chimica Acta*, 682(1-2), 104-109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.045>
- Annunziata, L., Stramenga, A., Visciano, P., Schirone, M., De Colli, L., & Novella Colagrande, M. (2017). Simultaneous determination of aflatoxins, T-2 and HT-2 toxins, and fumonisins in cereal-derived products by QuEChERS extraction coupled with LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 5143–5155. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0462-z>
- Ariño Moneva, A. (2008). *Informe relativo a las micotoxinas fumonisinas*. Obtenido de Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria: <https://onx.la/c8dfc>
- Ariño, A., Juan, T., Estopañan, G., & González-Cabo, J. F. (2007). Fumonisin Production by Toxigenic Strains, and Concentrations of Fumonisins B1 and B2 in Conventional and Organic Maize Grown in Spain. *Journal of Food Protection*, 70(1), 151-156. doi:<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.1.151>
- Arroyo Manzanares, N., Huertas Pérez, J. F., Gámiz García, G., & García Campaña, A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín GRASEQA*, 7, 16-31. Obtenido de <https://goo.su/eH2yA>
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (s.f.). *Micotoxinas*. Obtenido de EFSA: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/mycotoxins>
- Ayora Cañada, M. J. (2020). *Preparación de la muestra*. Obtenido de Universidad de Jaén.
- Barros de Oliveira, G., Menezes de Castro Gomes Vieira, C., Mathias Orlando, R., & Ferreira Faria, A. (2017). Simultaneous determination of fumonisins B1 and B2

- in different types of maize by matrix solid phase dispersion and HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 233, 11-19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.091>
- Bezerra da Rocha, M. E., Oliveira Freire, F. d., Feitosa Maia, F. E., & Florindo Guedes, M. I. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- BioRender: *Scientific Image and Illustration Software*. (s.f.). Obtenido de <https://www.biorender.com/>
- Bräse, S., Gläser, F., Kramer, C., Lindner, S., Linsenmeier, A. M., Masters, K.-S., y col. (2013). *The Chemistry of Mycotoxins* (1st ed.). Springer Vienna.
- Byzova, N. A., Dzantiev, B. B., Urusov, A. E., & Zherdev, A. V. (2014). Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 55, 81-93. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.007>
- Calero, G. (2021). *Proceso de transformación del maíz*. Obtenido de Calero Group: <https://www.calero-group.com/proceso-de-transformacion-del-maiz/>
- Castellá, G., Bragulat, M. R., & Cabañes, F. J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *J Agric Food Chem*, 47(11), 4707-4710. doi:<https://doi.org/10.1021/jf981236d>
- Chen, J., Wen, J., Tang, Y., Shi, J., Mu, G., Yan, R., y col. (2021). Research Progress on Fumonisin B1 Contamination and Toxicity: A Review. *Molecules*, 26(17), 5238. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26175238>
- Chen, X., Huang, Y., Ma, X., Jia, F., Guo, X., & Wang, Z. (2015). Impedimetric aptamer-based determination of the mold toxin fumonisin B1. *Microchimica Acta*, 182, 1709–1714. doi:<https://doi.org/10.1007/s00604-015-1492-x>
- Chotchuang, T., Cheewasedtham, W., Jayeoye, T. J., & Rujiralai, T. (2019). Colorimetric determination of fumonisin B1 based on the aggregation of cysteamine-functionalized gold nanoparticles induced by a product of its hydrolysis. *Microchimica Acta*, 186(655), 1-10. doi:<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3778-x>
- Codex Alimentarius. (1995). *Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos*. Codex Stan 193-1995. Obtenido de <https://onx.la/501b5>
- Comisión Europea. (2005). *Reglamento (CE) nº 856/2005, de 6 de junio de 2005, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 en lo que se refiere a las toxinas de Fusarium*. Boletín Oficial del Estado. Obtenido de <https://www.boe.es/doue/2005/143/L00003-00008.pdf>
- Comisión Europea. (2006). *Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*. Boletín Oficial del Estado. Obtenido de <https://www.boe.es/doue/2006/364/L00005-00024.pdf>
- Comisión Europea. (2006). *Reglamento (CE) Nº 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios*. Boletín Oficial del Estado. Obtenido de <https://www.boe.es/doue/2006/070/L00012-00034.pdf>
- Comisión Europea. (2023). *Reglamento (UE) nº 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los*

alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº. 1881/2006. Boletín Oficial del Estado. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>

- De Girolamo, A., Pereboom-de Fauw, D., Sizoo, E., van Egmond, H., Gambacorta, L., Bouten, K., y col. (2010). Determination of fumonisins B1 and B2 in maize-based baby food products by HPLC with fluorimetric detection after immunoaffinity column clean-up. *World Mycotoxin Journal*, 3(2), 135 - 146. doi:<https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1213>
- Deng, M., Li, W., Chen, Y., Wang, K., Sun, Y., & Xu, H. (2022). Detection of fumonisin B1 by aptamer-functionalized magnetic beads and ultra-performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 178, 107346. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107346>
- Detección de las micotoxinas y métodos de análisis.* (2019). Obtenido de Mycotoxinsite.com: <https://onx.la/97938>
- Duarte-Vogel, S., & Villamil-Jiménez, L. (2006). Micotoxinas en la Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 129-135. Obtenido de <https://goo.su/yUTjHG>
- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).* (s.f.). Obtenido de Molecular Devices: <https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>
- Ezquerro, A., Vidal, J. C., Bonel, L., & Castillo, J. R. (2015). A validated multi-channel electrochemical immunoassay for rapid fumonisin B1 determination in cereal samples. *Analytical Methods*, 7(9), 3742-3749. doi:<https://doi.org/10.1039/C4AY02897J>
- Feijó Corrêa, J. A., Bianca Orso, P., Bordin, K., Vaz Hara, R., & Bittencourt Luciano, F. (2018). Toxicological effects of fumonisin B1 in combination with other Fusarium toxins. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 483-494. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.043>
- Franco, D. (s.f.). *Productos de maíz.* Obtenido de Ministerio de Economía y Producción - Buenos Aires, República Argentina: <https://goo.su/ZDW7MTH>
- Fuentes López, A., García Martínez, E., & Fernández Segovia, I. (2015). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas.* Obtenido de Universitat Politècnica de València: <https://goo.su/z11b>
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). *Alimentación animal.* Obtenido de ELIKA: <https://goo.su/jpnz4>
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). *Fumonisinás.* Obtenido de ELIKA: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/23.Fumonisinás.pdf>
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2018). *Las micotoxinas en alimentos.* Obtenido de ELIKA: <https://goo.su/6jEJs>
- Funes, G. J. (2011). *Factores que afectan el contenido de patulina y fumonisinas durante el procesamiento de alimentos.* Obtenido de Red de repositorios latinoamericanos: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/75221>
- García Reyes, J. F. (2021). *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).* Obtenido de Universidad de Jaén.

- García Reyes, J. F. (2021). *Otras técnicas cromatográficas de interés*. Obtenido de Universidad de Jaén.
- Gasparido, B., Del Zotto, S., Torelli, E., Cividino, S., Firrao, G., Della Riccia, G., & Stefanon, B. (2012). A rapid method for detection of fumonisins B1 and B2 in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. *Food Chemistry*, 3, 1608-1612. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.078
- Gimeno, A. (2008). *Las fumonisinas y sus efectos indeseables en la producción porcina*. Obtenido de ENGORMIX: https://www.adiveter.com/ftp_public/A3040708.pdf
- Hao, K., Suryoprabowo, S., Hong, T., Song, S., Liu, L., Zheng, Q., & Kuang, H. (2018). Immunochromatographic strip for ultrasensitive detection of fumonisin B1. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 699-710. doi:https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1439455
- Hou, S., Ma, J., Cheng, Y., Wang, H., Sun, J., & Yan, Y. (2020). One-step rapid detection of fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone in grains. *Food Control*, 117, 107107. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107107
- Huang, X., Huang, X., Xie, J., Li, X., & Huang, Z. (2020). Rapid simultaneous detection of fumonisin B1 and deoxynivalenol in grain by immunochromatographic test strip. *Analytical Biochemistry*, 606, 113878. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113878
- Jakšić, S., Živkov-Baloš, M., Mihaljev, Ž., Mašić, Z., Jajić, I., Banić, N., & Abramović, B. (2014). Extraction without Organic Solvents in the Determination of Fumonisins B1, B2, and B3 in Maize by HPLC–FLD and ELISA Tests. *Food Analytical Methods*, 8, 1446–1455. doi:https://doi.org/10.1007/s12161-014-0030-5
- Jie, M., Yu, S., Yu, F., Liu, L., He, L., Li, Y., y col. (2018). An ultrasensitive chemiluminescence immunoassay for fumonisin B1 detection in cereals based on gold-coated magnetic nanoparticles. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 8(9), 3384-3390. doi:https://doi.org/10.1002/jsfa.8849
- Kaltner, F., Rampl, C., Rychlik, M., Zimmermann, T., & Rohe, A. (2016). Development and Validation of a Cost-Effective HPLC-FLD Method for Routine Analysis of Fumonisins B1 and B2 in Corn and Corn Products. *Food Analytical Methods*, 10, 1349–1358. doi:https://doi.org/10.1007/s12161-016-0688-y
- Khayoon, W. S., Saad, B., Salleh, B., Ismail, N. A., Manaf, N. H., & Latiff, A. A. (2010). A reversed phase high performance liquid chromatography method for the determination of fumonisins B1 and B2 in food and feed using monolithic column and positive confirmation by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 679(1-2), 91-97. doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.008
- Kim, D.-H., Hong, S.-Y., Kang, J. W., Cho, S. M., Lee, K. R., An, T. K., y col. (2017). Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins*, 9(3), 106. doi:https://doi.org/10.3390/toxins9030106
- Li, C., Mi, T., Conti, G. O., Yu, Q., Wen, K., Shen, J., y col. (2015). Development of a Screening Fluorescence Polarization Immunoassay for the Simultaneous Detection of Fumonisins B1 and B2 in Maize. *J. Agric. Food Chem.*, 63(20), 4940-4946. doi:https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01845

- Li, C., Wu, Y.-L., Yang, T., & Huang-Fu, W.-G. (2012). Rapid Determination of Fumonisin B1 and B2 in Corn by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with Ultrasonic Extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 50(1), 57–63. doi:<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr009>
- Li, L., Chen, W., Li, H., Iqbal, J., Zhu, Y., Wu, T., & Du, Y. (2020). Rapid determination of fumonisin (FB1) by syringe SPE coupled with solid-phase fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 226, 117549. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117549>
- Li, W., Herrman, T., & Dai, S. (2019). Rapid Determination of Fumonisin in Corn-Based Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(5), 1472–1481. doi:<https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1472>
- Ling, S., Pang, J., Yu, J., Wang, R., Liu, L., Ma, Y., y col. (2014). Preparation and identification of monoclonal antibody against fumonisin B1 and development of detection by Ic-ELISA. *Toxicon*, 80, 64-72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.008>
- Ling, S., Wang, R., Gu, X., Wen, C., Chen, L., Chen, Z., y col. (2015). Rapid detection of fumonisin B1 using a colloidal gold immunoassay strip test in corn samples. *Toxicon*, 108, 210-215. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.014>
- Liu, X., de Lihong, F., Yin, S., Chen, H., & Hu, H. (2019). Molecular mechanisms of fumonisin B1-induced toxicities and its applications in the mechanism-based interventions. *Toxicon*, 167, 1-5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.009>
- Mamdou, A.-Z., & Zahran, E. (s.f.). *Micotoxinas y su impacto en la salud humana y animal*. Obtenido de Mycotoxinsite.com: <https://mycotoxinsite.com/micotoxinas-impacto-salud-humana-animal/>
- Manizan, A. L., Oplatowska-Stachowiak, M., Piro-Metayer, I., Campbell, K., Koffi-Nevry, R., Elliott, C., y col. (2018). Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*, 87, 22-30. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.032>
- Marasas, W., Miller, J., Riley, R., & Visconti, A. (2000). *Fumonisin B1*. *Environmental Health Criteria*. Geneva: World Health Organization.
- Medina B., J. C., & Castillo, E. (s.f.). *DETERMINACION DE MICOTOXINAS POR MEDIO DE ENSAYOS INMUNOQUIMICOS*. Obtenido de FAO: <https://www.fao.org/3/ab482s/AB482S15.htm>
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2015). *Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harina y sémolas*. Obtenido de AESAN: <https://onx.la/35d80>
- Mohammed, S., Nayyef, H., Sameer, F., & Hanoon, A. (2021). Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Fumonisin B1 Detection in Local Corn Seeds from Baghdad-Iraq. *Iraqi Journal of Science*, 62(12), 4621-4627. doi:<https://doi.org/10.24996/ij.s.2021.62.12.3>
- Moscoso Gama, J. M. (2020). *Cromatografía líquida de alta resolución*. El Cid Editor.
- Munawar, H., Safaryan, A. H., De Girolamo, A., García-Cruz, A., Marote, P., Karim, K., y col. (2019). Determination of Fumonisin B1 in maize using molecularly imprinted polymer nanoparticles-based assay. *Food Chemistry*, 298, 125044. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125044>

- Naghshbandi, B., Adabi, M., Bagheri, K. P., & Tavakolipour, H. (2023). Design of a new electrochemical aptasensor based on screen printed carbon electrode modified with gold nanoparticles for the detection of fumonisin B1 in maize flour. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 534. doi:<https://doi.org/10.1186/s12951-022-01745-7>
- Narciso Paschoal, F., de Azevedo Silva, D., Sperling de Souza, R., Silva de Oliveira, M., Alves Pereira, D. A., & Carvalho de Souza, S. V. (2017). A Rapid Single-Extraction Method for the Simultaneous Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, G2, Fumonisin B1, and Zearalenone in Corn Meal by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10, 1631–1644. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-016-0712-2>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). *Micotoxinas*. Obtenido de OMS: <https://onx.la/e5387>
- Peluque, E., Neres, N., Michelin, E., Reis, T., Rosim, R., Oliveira, C., & Fernandes, A. (2014). Fumonisin B1 in cereal mixtures marketed in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(1), 46-48. doi:<https://doi.org/10.1080/19393210.2013.841294>
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., & Pavlović, M. (1999). Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*, 77(9), 754-766. Obtenido de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/57586/RA_2000_2_80-92_spa.pdf
- Pérez Madueño, M., & Rifi Zaitouni, I. (2011). *Detección y eliminación de fumonisinas en alimentos*. Obtenido de Universitat Politècnica De Catalunya: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/13053/Mem%C3%B2ria.pdf>
- Piñeiro, M. (2000). *Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas alimentario*. Roma: D-FAO.
- Qiuyan, X., JianHong, X., Fang, J., & JianRong, S. (2010). Establishment of high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for detecting fumonisin B1 in maize. *Journal of Agricultural Sciences*, 26(3), 627-630.
- Ramalho, R. R., Pereira, I., da S. Lima, G., dos Santos, G. F., Maciel, L. I., Simas, R. C., & Vaz, B. G. (2022). Fumonisin B1 analysis in maize by Molecularly Imprinted Polymer Paper Spray Ionization Mass Spectrometry (MIP-PSI-MS). *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, 104362. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104362>
- Ren, W., Huang, Z., Xu, Y., Li, Y., Ji, Y., & Su, B. (2015). Urchin-like gold nanoparticle-based immunochromatographic strip test for rapid detection of fumonisin B1 in grains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 7341–7348. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8896-7>
- Ren, W., Xu, Y., Huang, Z., Li, Y., Tu, Z., Zou, L., y col. (2020). Single-chain variable fragment antibody-based immunochromatographic strip for rapid detection of fumonisin B1 in maize samples. *Food Chemistry*, 319, 126546. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126546>
- Ren, Y., Zhang, Y., Han, S., Han, Z., & Wu, Y. (2011). Simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 contaminants in maize by ultra high-performance liquid

- chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 692(1-2), 138-145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.005>
- Requena , F., Saume, E., & León, A. (2005). Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23(4), 393-410. Obtenido de <https://onx.la/be36d>
- Sanches Silva, A., Brites, C., Vila Pouca, A., Barbosa, J., & Freitas, A. (2019). UHPLC-ToF-MS method for determination of multi-mycotoxins in maize: Development and validation. *Current Research in Food Science*, 1, 1-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.07.001>
- Sanchis, V., Abadias, M., Oncics, L., Sala, N., Viñas, I., & Canela, R. (1994). Occurrence of Fumonisin B1 and B2 in Corn-Based Products from the Spanish Market. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2147-2148. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.60.6.2147-2148.1994>
- Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Med*, 29(1), 143-152.
- Shen, G., Kang, X., Su, J., Qiu, J., Liu, X., Xu, J., y col. (2022). Rapid detection of fumonisin B1 and B2 in ground corn samples using smartphone-controlled portable near-infrared spectrometry and chemometrics. *Food Chemistry*, 384, 132487. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132487>
- Sheng, W., Wu, H., Ji, W., Li, Z., Chu, F., & Wang, S. (2018). Visual Non-Instrumental On-Site Detection of Fumonisin B1, B2, and B3 in Cereal Samples Using a Clean-Up Combined with Gel-Based Immunoaffinity Test Column Assay. *Toxins*, 10(4), 165. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins10040165>
- Sheng, Y., Jiang, W., De Saeger, S., Shen, J., Zhang, S., & Wang, Z. (2012). Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fumonisin B1 in maize. *Toxicon*, 60, 1245-1250. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.011>
- Sierra Alonso, I., Morante Zarcero, S., Pérez Cortés, Y., Pérez Quintanilla, D., Ballesteros, R., & Sánchez, A. (2008). *Prácticas de análisis instrumental*. Madrid: Dykinson.
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. España: Díaz de Santos.
- Stockmann-Juvala, H., & Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*, 27, 799-809. Obtenido de <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0960327108099525>
- Tamura, M., Mochizuki, N., Nagatomi, Y., Harayama, K., Toriba, A., & Hayakawa , K. (2015). A Method for Simultaneous Determination of 20 Fusarium Toxins in Cereals by High-Resolution Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry with a Pentafluorophenyl Column. *Toxins*, 7(5), 1664-1682. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins7051664>
- Tran, T. V., Do, B. N., Thi Nguyen, T. P., Tran, T. T., Tran, S. C., Le, H. Q., & Nguyen, B. V. (2019). Development of an IgY-based lateral flow immunoassay for detection of fumonisin B in maize. *F1000Research*, 8. doi:<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8320775>
- Trucksess, M., Cho, T.-H., & Ready, D. (2010). Liquid chromatographic method for fumonisin B1 in sorghum syrup and corn-based breakfast cereals. *Food Additives & Contaminants*, 17(2), 161-166. doi:<https://doi.org/10.1080/026520300283513>

- U.S. Food & Drug, FDA. (2001). *Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds*. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Obtenido de <https://onx.la/ff99c>
- Universidad de Jaén. (2021). *Reglamento de los Trabajos de Fin de Grado en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén*. Obtenido de [ujaen.es: https://onx.la/c02d7](https://onx.la/c02d7)
- Valcárcel Cases, M., & Gómez Hens, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación* (1st ed.). Reverté.
- Velázquez González, C. A. (1999). *Análisis de micotoxinas aminopolihidroxiladas*. Obtenido de Universitat de Lleida: <https://goo.su/sx7e>
- Venkataramana, M., Navya, K., Chandranayaka, S., Priyanka, S., Murall, H., & Batra, H. (2014). Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid detection of fumonisin B1 from cereal samples. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 1920–1928. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1254-x>
- Visconti, A., Boenke, A., Doko, M. B., Solfrizzo, M., & Pascale, M. (1995). Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR. *Nat Toxins*, 3(4), 269-274. doi:<https://doi.org/10.1002/nt.2620030419>
- Wang, W., Zhang, Q., Ma, F., & Li, P. (2022). Simultaneous determination of aflatoxins, fumonisin B1, T-2 and cyclopiazonic acid in agri-products by immunomagnetic solid-phase extraction coupled with UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 378, 132020. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.132020>
- Wang, X., Bao, M., Li, F., Fan, H., Li, H., Li, Y., y col. (2016). Development of a sensitive, competitive, indirect ELISA for the detection of fumonisin B1 in corn originating from Anhui province, China. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(2), 107-112. doi:<https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1092829>
- Wang, Y., Dong, Y.-j., Li, Z.-m., Deng, L.-g., Guo, C.-y., Zhang, S.-q., y col. (2016). Fast determination of multi-mycotoxins in corn by dispersive solid-phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(7), 1656-1666. doi:[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61287-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61287-4)
- Wang, Y., Wang, Y.-C., Wang, H.-a., Ji, W.-H., Sun, J.-H., & Yan, Y.-X. (2014). An immunomagnetic-bead-based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of fumonisin B1. *Food Control*, 40, 41-45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.025>
- Wang, Y.-K., Yan, Y.-X., Ji, W.-H., Wang, H.-a., Li, S.-Q., Zou, Q., & Sun, J.-H. (2013). Rapid Simultaneous Quantification of Zearalenone and Fumonisin B1 in Corn and Wheat by Lateral Flow Dual Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.*, 61(21), 5031-5036. doi:<https://doi.org/10.1021/jf400803q>
- Wang, Z., Li, H., Li, C., Yu, Q., Shen, J., & De Saeger, S. (2014). Development and Application of a Quantitative Fluorescence-Based Immunochromatographic Assay for Fumonisin B1 in Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(27), 6294-6298. doi:<https://doi.org/10.1021/jf5017219>
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., & Goliński, P. (2012). Occurrence of fumonisins in food – An interdisciplinary approach to the problem. *Food Control*, 26(2), 491-499. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.007>
- Xu, G., Fan, X., Chen, X., Liu, Z., Xen, G., Wei, X., y col. (2023). Ultrasensitive Lateral Flow Immunoassay for Fumonisin B1 Detection Using Highly Luminescent

- Aggregation-Induced Emission Microbeads. *Toxins*, 15(1), 79. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins15010079>
- Yang, X., Zhou, X., Zhang, X., Qing, Y., Luo, M., Liu, X., y col. (2015). A Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor for Fumonisin B1 Detection in Corn Using Single-Walled Carbon Nanotubes/Chitosan. *ELECTROANALYSIS*, 27(11), 2679-2687. doi:<https://doi.org/10.1002/elan.201500169>
- Yu , S., He, L., Yu, F., Liu, L., Qu, C., Qu, L., y col. (2018). A lateral flow assay for simultaneous detection of Deoxynivalenol, Fumonisin B1 and Aflatoxin B1. *Toxicon*, 156, 23-27. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.305>
- Yu, Y., Li, Y., Xu, N., Zha, Y., Bai, X., Liu, M., y col. (2023). Fluorescence ratio immunoassay for fumonisin B1 based on the oxidase characteristics of the growth of monodispersed 2-D MnO₂ nanosheet on an individual gold nanoparticle (AuNP@MnO₂). *Microchimica Acta volume*, 190(3), 93. doi:<https://doi.org/10.1007/s00604-023-05675-5>
- Zha, C., An, X., Zhang, J., Wei, L., Zhang, Q., Yan, Q., y col. (2022). Indirect signal amplification strategy with a universal probe-based lateral flow immunoassay for the rapid quantitative detection of fumonisin B1. *Analytical Methods*, 14(7), 708-716. doi:<https://doi.org/10.1039/D1AY01625C>
- Zhan, S., Zheng, L., Zhou, Y., Wu, K., Duan, H., Huang, X., & Xiong, Y. (2019). A Gold Growth-Based Plasmonic ELISA for the Sensitive Detection of Fumonisin B1 in Maize. *Toxins*, 11(6), 323. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins11060323>
- Zhao, X., Gao, J., Song, Y., Zhang, J., & Han, Q. (2022). Determination of Fumonisin B1 by Aptamer-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Sensors*, 22(22), 85-98. doi:<https://doi.org/10.3390/s22228598>
- Zheng, M. Z., Richard, J. L., & Binder, J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161, 261-273. doi:<https://doi.org/10.1007/s11046-006-0215-6>
- Zou, L., Yang, X., Li, Y., He, Q., Chen, B., & Wang, D. (2013). Development of a single-chain variable fragment antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of fumonisin B1 in corn samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1865-1871. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.6505>