



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

OCRATOXINA A: PROBLEMÁTICA Y MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA SU DETERMINACIÓN EN CEREALES

Alumno: Cristóbal Hidalgo Cobo

Julio, 2021



MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN QUÍMICA APLICADA

MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO ACADÉMICO:

2020/2021

CONVOCATORIA (fecha):

Julio, 2021

UNIVERSIDAD:

Universidad de Jaén

TÍTULO DEL TRABAJO:

Ocratoxina A: Problemática y método de análisis para su determinación en cereales

ESTUDIANTE:

Cristóbal Hidalgo Cobo

TUTOR(es):

Antonio Ruíz Medina

Fecha:

VºBº Tutor(es)

Firmado digitalmente
por RUIZ MEDINA
ANTONIO - 26013133H
Fecha: 2021.06.15
17:47:13 +02'00'

Fdo:

El Estudiante

HIDALGO
COBO
CRISTÓBAL

Firmado digitalmente
por HIDALGO COBO
CRISTÓBAL
Fecha: 2021.06.11
18:19:11 +02'00'

Fdo:

INDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
Micotoxinas	5
Concepto y origen	5
Tipos	6
Ocratoxinas	7
Concepto y origen	7
Ocratoxina A.....	8
Ruta biosintética de la OTA	9
Métodos de reducción de micotoxinas en alimentos	10
Normativa sobre los contenidos máximos de OTA en alimentos	15
Técnicas de extracción y purificación en cereales.....	17
Técnicas de análisis de ocratoxina A en cereales	20
3. OBJETIVOS.....	25
4. REVISIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE	
OCRATOXINA A EN CEREALES	28
5. CONCLUSIONES	44
6. BIBLIOGRAFÍA.....	45

1. RESUMEN/ABSTRACT

Las micotoxinas son compuestos naturales que tienen bajo peso molecular que son producidos por hongos microscópicos que generan toxinas cuando son introducidos en bajas concentraciones en animales por una ruta natural. Entre los grupos de micotoxinas, se encuentra la ocratoxina A (OTA). En este trabajo, se ha estudiado las características principales de la OTA, así como su toxicidad, la biosíntesis de la misma y la normativa de la Comisión Europea sobre el contenido de OTA en cereales.

Por otra parte, se han revisado mediante un estudio bibliográfico, las técnicas utilizadas normalmente para la extracción y purificación de OTA, en ellas destaca la extracción en fase sólida y la extracción sólido-líquido. En las técnicas de determinación y cuantificación de OTA, las más comunes son la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con un detector de fluorescencia (HPLC-FD) y los ensayos inmunoabsorbentes ligado a enzimas (ELISA).

Mycotoxins are natural compounds that have low molecular weight that are produced by microscopic fungi that generate toxins when they are introduced in low concentrations into animals by a natural route. Among the groups of mycotoxins, there is Ochratoxin A (OTA). In this work, the main characteristics of OTA have been studied, as well as its biosynthesis and the regulations of the European Commission on the content of OTA in cereals.

On the other hand, the techniques normally used for the extraction and purification of OTA have been reviewed by means of a bibliographic study, including solid phase extraction and solid-liquid extraction. In determination and quantification techniques of OTA, the most common are High Performance Liquid Chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FD) and Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays (ELISA).

2. INTRODUCCIÓN

Micotoxinas

Concepto y origen

Las micotoxinas se pueden definir como compuestos naturales que tienen bajo peso molecular que son producidos por hongos microscópicos que generan toxinas cuando son introducidos en bajas concentraciones en animales por una ruta natural (Santillán Mendoza et al., 2017). El término “micotoxina” es de origen griego, “mycos” significa hongo, y del latín, “toxicum” significa tóxico o veneno (AFHSE, 2015). Esas rutas naturales incluyen la ingestión, el contacto con la piel, la inhalación, entre otros (Santillán Mendoza et al., 2017).

Aunque existen diferencias geográficas y climáticas a la hora de producir micotoxinas en cultivos, la exposición a las micotoxinas ocurre a nivel mundial. Las enfermedades causadas por las toxinas de hongos se les llaman micotoxicosis y el consumo de alimentos contaminados por las micotoxinas producen efectos agudos y crónicos, por lo general, los efectos son carcinogénicos, teratogénicos, inmunosupresivos y estrogénicos (Santillán Mendoza et al., 2017). Para la producción de las micotoxinas, necesitan una temperatura que oscile entre 20-25°C, un pH de entre 4 y 8 y una humedad relativa del 80 al 90% (Serrano-Coll et al., 2015).

En cuanto a la ganadería, el problema principal causado por la intoxicación de estas toxinas es la reducción en la productividad de los animales, esto es debido a que disminuye o rechaza el consumo de alimentos, al bajo aprovechamiento de los alimentos, a la reducción del peso corporal, el aumento de vulnerabilidad a enfermedades y la reducción de la capacidad para reproducirse.

Principalmente las micotoxinas contaminan a los cereales, se infectan antes y durante el almacenamiento. Hoy en día se han podido aislar y caracterizar más de 400 toxinas producidas por 350 especies de hongos, las investigaciones se enfocaron en las toxinas que causan daños significativos a seres humanos y animales (Santillán Mendoza et al., 2017). En la figura 1 se puede ver un ejemplo de un cereal contaminado por micotoxinas.



Figura 1. Maíz contaminado por micotoxinas

Tipos

Las toxinas se clasifican dependiendo de la especie fúngica de origen, a la estructura química que tengan y al mecanismo de acción. Aunque una especie es capaz de producir varias toxinas y una toxina puede ser producida por varias especies fúngicas.

Las micotoxinas son producidas principalmente por cuatro géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*. Aunque existen más géneros como *Rosellina*, *Phomopsis*, *Sstachybotrys*, *Petromyces*, *Clavicipes*, *Pithomyces* y *Monascus*. En la tabla 1 se puede ver las distintas especies fúngicas, las micotoxinas que producen dichas especies y los efectos que producen dentro del organismo (Santillán Mendoza et al., 2017).

Tabla 1. Representación de los tipos de micotoxinas producidos por distintas especies fúngicas y los efectos que produce.

Especie	Micotoxina	Efecto
<i>Aspergillus spp.</i>	Aflatoxinas	Carcinogénico y teratogénico
<i>Fusarium spp.</i>	Tricotecenos	Hepatotóxico Inhibición de síntesis de proteínas
<i>Fusarium spp.</i>	Fumonisin	Hepatotóxico y nefrotóxico
<i>Aspergillus spp.</i>	Ocratoxina	Nefrotóxico
<i>Petromyces alliaceus</i>		Hepatotóxico
<i>Penicillium verrucosum</i>		Carcinogénico
<i>Fusarium spp.</i>	Zearalenona	Estrogénico
<i>Fusarium spp.</i>	Beuvericina	Citotóxico
<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Rosellina necatrix</i>	Citocalasina E	Inhibe polimerización de actina
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina	Citotóxico
<i>Claviceps purpurea</i>	Alcaloides del ergot	Depresor del sistema nervioso central
<i>Alternaria spp.</i>	Ácido tenuazónico	Hematotóxico
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Fomopsina	Hepatotóxico
<i>Pithomyces chartarum</i>	Esporidesmina	Enfermedades en piel
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Satratoxina	Inhibe síntesis de proteínas
<i>Monascus ruber</i>	Citrinina	Nefrotóxico

Ocratoxinas

Concepto y origen

Las ocratoxinas provienen de las especies fúngicas *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus*. Estas toxinas contaminan a varios alimentos y aparte pueden ser acumulados en la sangre y leche de los animales que se exponen a ellas. Los productos

que suelen ser contaminados por las ocratoxinas son los cereales y los productos derivados de cereales, nueces, frutos secos, especias, leche, cerveza, vino, carne, fórmulas infantiles y alimentos para bebés. La solubilidad de las ocratoxinas es baja por lo que se absorben en el tracto gastrointestinal uniéndose de manera intensa a las proteínas de membrana. El resultado de esto, es la reabsorción en el riñón, y la recirculación enterohepática, por lo tanto, la biotransformación y eliminación renal disminuye, dando como resultado un tiempo de vida largo de las ocratoxinas en el organismo, aproximadamente 35 días.

Este tipo de micotoxinas están asociadas con problemas renales, se demostró en el laboratorio que estas toxinas causan una disminución en el funcionamiento del riñón, llegando a producirse adenomas renales o carcinomas. Aunque el principal órgano afectado sea el riñón, otros efectos han sido estudiados en hámsteres, incluyendo anomalías cardíacas y hepáticas, también lesiones del tracto gastrointestinal y de tejido linfoide. Aparte, las ocratoxinas pueden cruzar la placenta y así acumularse en el tejido fetal, provocando en el feto malformaciones. Por tanto, las ocratoxinas están consideradas como un grupo 2B de carcinógenos para los seres humanos (Santillán Mendoza et al., 2017).

Los tipos de ocratoxinas que existen son la ocratoxina A (OTA), la ocratoxina B (OTB) y la ocratoxina C (OTC). La ocratoxina B es un derivado no clorado de la OTA con un carácter menos tóxico y la ocratoxina C es un éster de la OTA con muy poco potencial tóxico por lo que, de las tres ocratoxinas, la ocratoxina con mayor toxicidad es la OTA (Ravelo Abreu et al., 2011).

Ocratoxina A

La ocratoxina A ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) es una molécula que está formada por un anillo de 3,4-dihidro metil isocumarina unido, mediante un grupo carboxilo y a través de un enlace amida a una molécula de fenilalanina, en la figura 2 se puede ver la estructura química de la OTA (Ravelo Abreu et al., 2011).

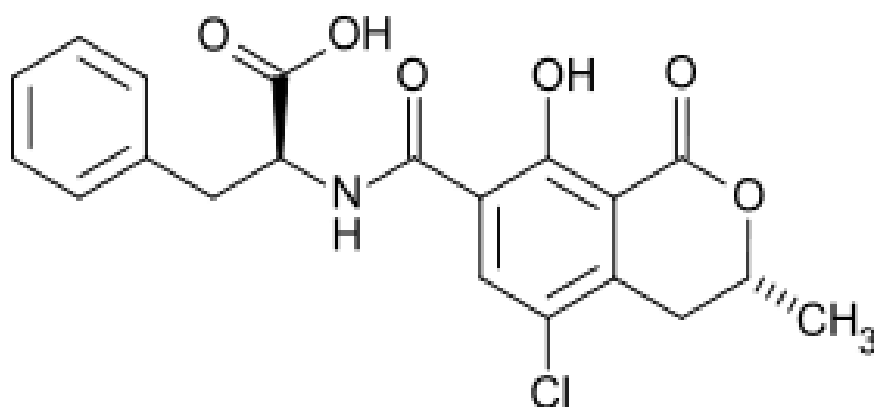


Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A.

Por otra parte, es una molécula estable, incolora, es soluble en disolventes orgánicos polares, tiene poca solubilidad en agua, es un ácido débil y emite fluorescencia cuando es excitada con luz UV.

Fue detectada por primera vez en muestras de maíz africanas, la OTA se considera un metabolito secundario tóxico producido por las especies fúngicas *Penicillium* y *Aspergillus*, son capaces de crecer en muchos sustratos orgánicos.

Las fuentes principales de exposición a la OTA se encuentran en cereales y piensos, aunque también pueden encontrarse (en un nivel notable) en los granos de café verde, las uvas, las pasas, los higos secos, el vino, la carne y sus derivados, el chocolate, la cerveza, las especias y las legumbres. También existen otras fuentes menos habituales son las infusiones, el aceite de oliva, el regaliz, el té y los alimentos infantiles a base de cereales.

Las condiciones medio ambientales y las prácticas agrícolas durante el periodo de almacenamiento y el transporte afectan de manera directa a los niveles de ocratoxina A en alimentos. Al mismo tiempo, se demostró que una alta humedad favorece la producción de OTA en los productos alimentarios (Ravelo Abreu et al., 2011).

Ruta biosintética de la OTA

La ruta biosintética para la síntesis de la ocratoxina A comienza con la reacción entre el acetil coA y el malonil coA para formar un pentaketido no ramificado. Después se

produce una ciclación y aromatización para formar una isocumarina, posteriormente se produce una metilación y una oxidación al carboxilo derivado clorado antes de la activación del acilo para la reacción con un éster de fenilalanina que proviene de la vía del ácido shikímico para así formarse la ocratoxina A. El esquema de esta ruta biosintética viene en la figura 3 (Huff et al., 1979).

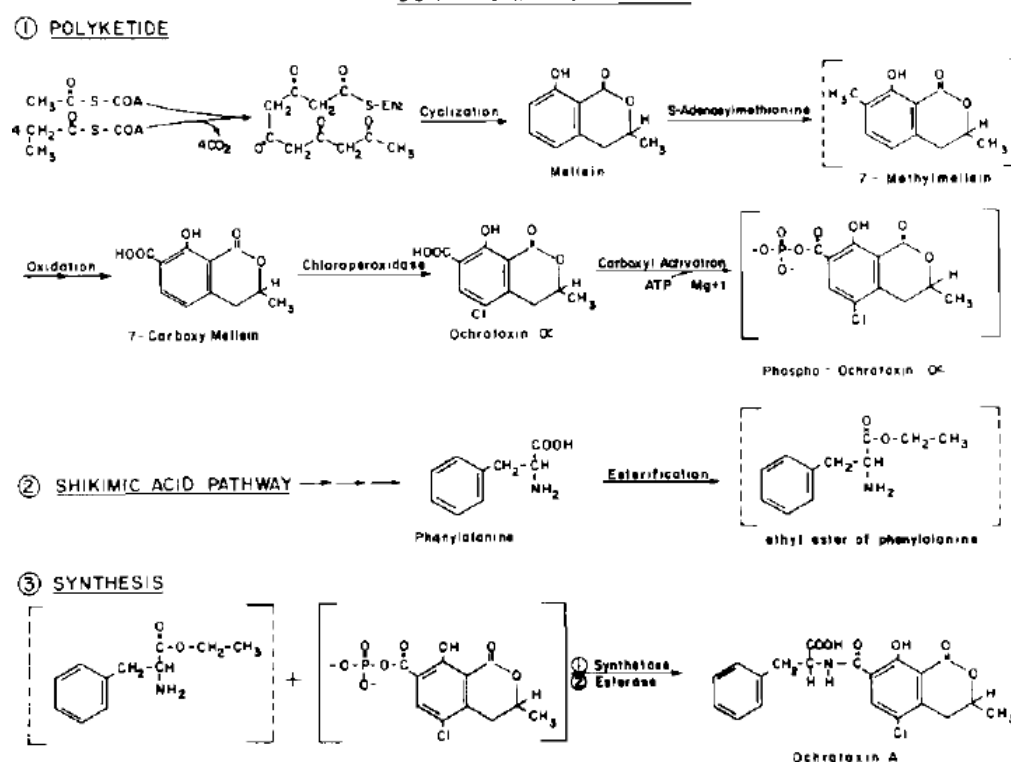


Figura 3. Ruta biosintética de la ocratoxina A.

Métodos de reducción de micotoxinas en alimentos

Los procedimientos que existen para la desintoxicación de las micotoxinas deben cumplir unos requisitos para su eficacia:

- La micotoxina debe ser destruida o transformada a compuestos que no sean tóxicos.
- Las esporas de hongos y los micelios deben ser destruidos con el fin de no formar nuevas toxinas

- Mantener el valor nutritivo de los alimentos y seguir siendo agradable al paladar.
- No modificar las propiedades físicas que tiene la materia prima.
- El proceso debe ser rentable económicamente y factible, o dicho de otro modo, el coste de la desintoxicación deberá ser menor que el coste del tratamiento del producto (Mishra et al., 2003).

Varios métodos físicos para la reducción de la aflatoxina en harina de maní son aceptados, sin embargo, ciertos nutrientes son destruidos en el proceso. Se usaron también una variedad de productos químicos que destacan por su capacidad para reaccionar con aflatoxinas. Entre aquellos productos químicos, destacan el metanol, amoníaco, agentes oxidantes, etc. Pero pueden surgir problemas de seguridad debido a la formación de sustancias químicas residuales (Mishra et al., 2003). Por eso mismo, se utilizan adsorbentes para eliminar estas toxinas.

- Adsorbentes

En los adsorbentes, se estudian particularmente la eficacia, especificidad y mecanismo del proceso de adsorción. Este último es parecido a una reacción química y supone la liberación de la energía libre de Gibbs (G) cuya energía es la fuerza impulsora de cada mecanismo de adsorción. La característica que más importancia debe tener el adsorbente es su estructura física, dicho de otro modo, la carga total, la distribución de carga, el tamaño de los poros y el área de superficie. Los distintos adsorbentes existentes para la eliminación de las toxinas son:

- Carbón activo

Se forma mediante la pirolisis de materiales orgánicos, el carbón activo es muy poroso, no soluble y con una alta relación superficie/masa. En solución acuosa, es capaz de adsorber gran parte de las micotoxinas de manera eficiente pero el inconveniente es que, al ser un adsorbente inespecífico, también adsorbe nutrientes esenciales por lo que se deteriora el alimento.

- Aluminosilicatos

Gran parte del estudio relacionado con la reducción de toxinas mediante adsorbente se centra en aluminosilicatos, concretamente zeolitas y aluminosilicatos hidratados de sodio y calcio (HSCAS), y arcillas que contienen aluminosilicatos. Las zeolitas están formadas por tetraedros de SiO_4 y AlO_4 como los dos bloques fundamentales de construcción con el átomo del metal en el centro de cada tetraedro. Las zeolitas son parecidas a las tamices y son adecuados para distinguir diferentes moléculas ya sea por tamaño, forma y carga. El HSCAS contiene iones calcio y protones que participan en el intercambio contra los iones de sodio. Son un tipo de montmorillonita que pertenecen al grupo de los filosilicatos que están compuestos de capas de aluminio y silicio conectado (1:1 o 2:1). El HSCAS es capaz de adsorber aflatoxinas en el tracto gastrointestinal de animales de granja, lo que hace que sea muy eficaz en la reducción de aflatoxinas en el organismo.

- Polímeros

La colestiramina es una resina que intercambia aniones y tiene como finalidad unir ácidos biliares en el tracto gastrointestinal y reducir la densidad de las lipoproteínas y del colesterol. En vitro, esta resina adsorbió un 9,6 mg/g de ocratoxina A y más de 0,3 mg/g de zearalenona. Sin embargo, tuvo un efecto muy pequeño en vivo en la reducción de ocratoxinas en bilis, sangre y tejidos. La cospovidona es un polímero anfótero con alta polaridad en el que la adsorbancia in vitro midió 0,3 mg/g para zearalenona. Este polímero no fue probado en vivo hasta el día de hoy. Recientemente se mostró como un criogel mejorado de cospovidona aumentó la adsorbancia hasta 2,1 mg/g.

- Levaduras y productos de levaduras

Las paredes de las células de la levadura pueden servir como adsorbentes para las micotoxinas. La adsorción in vitro para la ocratoxina (consiste en un 40% de levadura esterilizada y 60% de fermentación de residuos de levadura que fueron utilizadas para producir cerveza) depende del pH que debe estar al máximo en disoluciones ácidas (pH=3; 8,6 mg/g y pH=8; 1,2 mg/g). Pero en ensayos con cerdos en el que se emplea un 5% del complemento alimenticio en levadura derivó en una ligera reducción de la concentración de OTA en sangre, bilis y tejidos. Se puede mejorar la adsorción de micotoxinas si solo se utiliza las paredes de células de levadura ya que contienen

polisacáridos, proteínas y lípidos que exhiben amplia cantidad de mecanismos de adsorción diferentes de fácil acceso (Huwig et al., 2001).

En cuanto a los métodos físicos, químicos y biológicos existen distintos métodos para la reducción o inactivación de las aflatoxinas.

- Métodos físicos

Los diferentes métodos físicos, que se suelen utilizar con el fin de reducir la concentración de aflatoxinas, se pueden ver en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos físicos para la destrucción de aflatoxinas.

Métodos físicos	Condición	Destrucción (%)
Luz del sol	Luz solar intensa en productos líquidos	99
Luz UV	Solución de cloroformo de aceite de cacahuete	45
Microondas	6 KW, 4 minutos	95
Autoclave	121°C, 4 horas	95
Cocina	Vapor/Soplado	50
Asado	180°C, 30 minutos	80
Pasteurización	80°C, 45 segundos	64
Calor seco	250°C	Parcial
Disolventes	Específico para cada disolvente	80-95

Estos métodos son altamente eficaces y aparte eliminan cualidades organolépticas en la mayoría de los casos. Además ningún proceso es capaz de desintoxicar todas las toxinas en productos líquidos o en sólidos infectados (Mishra et al., 2003).

- Métodos químicos

Los siguientes métodos químicos utilizados para la reducción de aflatoxinas se pueden ver en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos químicos para la destrucción de aflatoxinas.

Métodos	Condición	Destrucción (%)
H ₂ O ₂	6% H ₂ O ₂ , 30 minutos, 80°C, pH alcalino	97
Ozono	2 horas, 100°C, 22% humedad	100
Amoníaco	40 psig, 100°C, NH ₄ OH, 30 minutos	99
Urea+ureasa	20% de urea, 2% harina de soja, luz del sol 14 horas	85
Hipoclorito de sodio	15 mg de gas Cl ₂ por 100 mg de AFB1	100
Bisulfito de sodio	0,4%, 5 minutos	45

Los inconvenientes que presentan estos métodos es que pueden quedar residuos químicos nocivos después de la desintoxicación de aflatoxinas y pueden generar compuestos tóxicos por la reacción (Mishra et al., 2003).

- Métodos biológicos

Los métodos biológicos existentes para la adsorción de aflotoxinas vienen representados en la tabla 4.

Tabla 4. Métodos biológicos para la reducción de aflatoxinas.

Métodos	Condición	Destrucción (%)
<i>F. aurantiacum</i>	Reacción en medio acuoso	100
NRRL B 184	-	-
<i>Tetrahymena</i>	-	-
<i>Pyriiformis</i>	Reacción en medio líquido	Parcial
<i>Bacillus sp.</i>	-	-
<i>Rhizopus sp.</i>	-	-

Estos métodos son caros, el intento de purgar variedades resistentes requiere mucho tiempo y aparte pueden aparecer infecciones de algunos hongos y bacterias no deseados (Mishra et al., 2003).

Normativa sobre los contenidos máximos de OTA en alimentos

Debido a que la ocratoxina A tiene efectos nocivos para el ser humano y para los animales, la Unión Europea (UE) estableció unos límites máximos de concentración de OTA tanto en alimentos de consumo humano como alimentos para los animales. Los límites establecidos vienen impuestos por el Reglamento (CE) No 1831/2003 de la comisión europea (Comisión Europea, 2006). En la tabla 5 viene el contenido máximo de OTA que puede tener cada producto alimentario.

Tabla 5. Límites de OTA por la comisión europea.

Alimento	Límite Máximo de Residuo (LMR)
Cereales no elaborados	5,0
Todos los productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo a excepción de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes.	3,0
Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10,0
Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5,0
Café soluble (café instantáneo)	10,0
Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15% vol.) y vino de frutas	2,0
Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2,0
Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo	2,0
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,50
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0,50
Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor, productos cárnicos, especias y regaliz	—

Técnicas de extracción y purificación en cereales

Un método analítico se basa en las siguientes etapas: toma de muestra, preparación de la muestra, separación del analito de la muestra, eliminación de posibles interferencias en una matriz, medida analítica y análisis de resultados.

Para el muestreo, se suele recolectar en diferentes cultivos de manera aleatoria. Después se lleva a molienda para pasarlo por un tamiz, se mezcla bien la muestra y se almacena en bolsas de plástico a -20°C conservándolo hasta el análisis (Jung Lee et al., 2015).

A continuación se muestran las técnicas de extracción y purificación más comunes de la OTA para su análisis en cereales.

- Extracción en fase sólida (SPE)

Este tipo de extracción se basa en poner en contacto una muestra líquida o gaseosa con una fase sólida en donde el analito se adsorbe selectivamente sobre la superficie del sólido. El sorbente sólido retiene el analito antes que otros componentes que tenga la muestra y generalmente se realizan varias eluciones con diferentes disolventes o mezcla para la elución selectiva de la matriz y analito.

Esta técnica de extracción y purificación tiene básicamente cuatro etapas que son el acondicionamiento del soporte, adsorción de la muestra, lavado de interferentes y elución del analito de interés (Esteve Turrillas, 2007).

En la figura 4 viene una representación visual de las cuatro etapas del proceso de extracción.

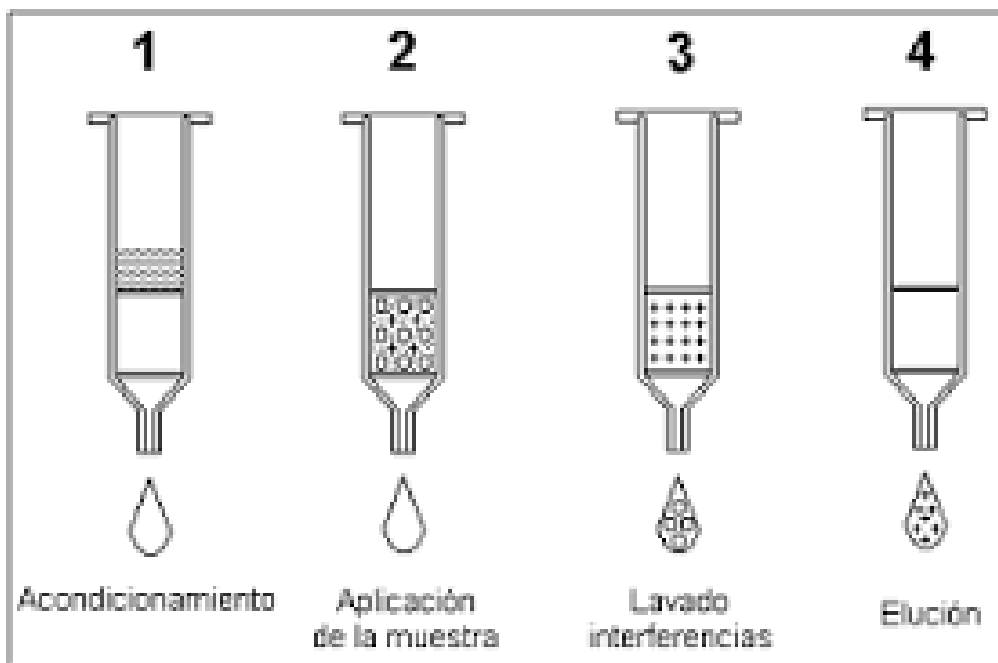


Figura 4. Etapas de la extracción en fase sólida (SPE).

La separación del analito de la muestra puede basarse en tres fenómenos distintos:

- Fase reversa

El fin de esta fase es la separación de los compuestos no polares desde una muestra de alta polaridad. Es aconsejable para este tipo de aplicaciones un soporte sólido hidrofóbico siendo así eluidos con baja cantidad de disolvente orgánico.

- Fase normal

El objetivo de esta fase es el aislamiento de compuestos polares de muestras no polares, por lo que se requiere emplear soportes polares para la extracción del analito y eluirlo con un disolvente que sea polar.

- Intercambio iónico

Para la extracción de compuestos iónicos o que sean capaces de ionizarse con un cambio en el pH. En este caso, se emplean soportes que tengan grupos intercambiadores de cationes o aniones, esto dependerá del analito que se tenga que retener y después se eluye con disolventes orgánicos (Esteve Turrillas, 2007).

- Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido (SLE) es una operación básica cuyo objetivo es recuperar o extraer en el que uno o varios componentes de la fase sólida desestructurada, denominada alimento (R_0), se transfiere a una fase líquida, denominada como disolvente (E_0). Si dicha extracción tiene lugar en una sola etapa, consistirá en mezclar durante cierto tiempo el alimento y el disolvente para producir un transporte de materia entre ambos. Los componentes que sean solubles en el disolvente y sean transferidos de una fase a otra se le conocen como solutos y la matriz sólida, que es insoluble, se le conoce como inerte. El sentido de la transferencia siempre va dirigido del sólido hasta el líquido. Una vez haya transcurrido el tiempo establecido para el alcance del equilibrio entre ambas fases, se procede a la separación de la fase sólida, conocida como refinado (R_1), de la disolución, conocida como extracto (E_1). En la figura 5 se puede apreciar un esquema con las corrientes que intervienen en una etapa de la extracción sólido-líquido (Castelló Gómez et al., 2020).

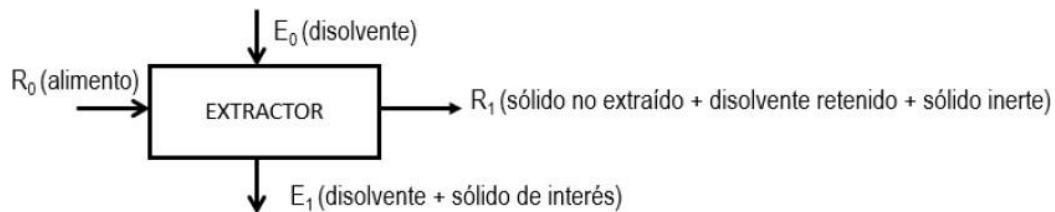


Figura 5. Esquema de una etapa de SLE.

- Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido (LLE) consiste en permitir la recuperación de un soluto en una disolución por medio de su mezcla con un disolvente. El disolvente empleado debe ser insoluble o poco soluble en la disolución que se va a extraer y el soluto a extraer debe presentar alta afinidad por el disolvente de extracción. Básicamente el proceso de LLE requiere de dos etapas:

- Se mezcla el disolvente de extracción con la disolución a procesar
- Se separa la mezcla en dos fases líquidas inmiscibles (Tejada et al., 2011)

En la figura 6 se puede ver las etapas de la extracción líquido-líquido.

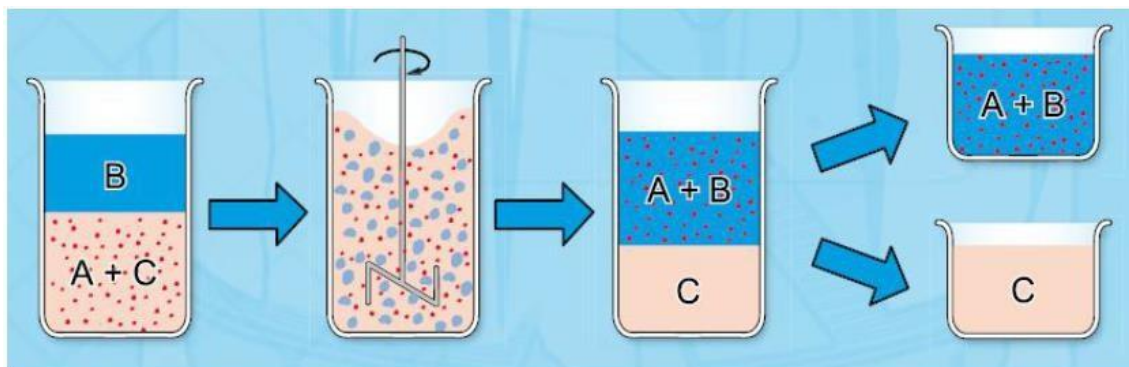


Figura 6. Etapas de la extracción líquido-líquido (LLE)

- Microextracción líquido-líquido dispersiva

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) se basa en mezclar un disolvente extractante con un agente dispersante. El agente dispersante tiene como característica tener una alta miscibilidad tanto con el disolvente extractante como con la fase acuosa donde están los analitos. Después de haber obtenido la mezcla extractor-dispersante, se procede a inyectar, con una jeringa, en la muestra acuosa con el analito. En ese instante, se comienza a formar una nube por el que el disolvente extractante se encuentra en forma de grandes cantidades de gotitas pequeñas dispersas en la fase acuosa. Luego se somete la muestra a centrifugación y el disolvente extractante se recoge para el método de análisis (Ochoa Ortega., 2016).

Técnicas de análisis de ocratoxina A en cereales

Son muchas las técnicas que normalmente se utilizan para la determinación de ocratoxina A en cereales, sin embargo las que se emplean en mayor número de ocasiones son las siguientes:

- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La técnica HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) o cromatografía líquida de alto rendimiento es una de las técnicas más usadas debido a la capacidad que tiene para separar analitos de distinta naturaleza que se encuentran en una mezcla. Su

aplicación en la industria abarca la bioquímica, los productos de la industria química, la química forense, la farmacéutica, los alimentos y la medicina clínica. Sin embargo, esta amplitud de aplicaciones es un inconveniente a la hora de tomar decisiones para desarrollar un proceso de separación por esta técnica.

En esta técnica participan la fase móvil y la fase estacionaria, las cuales son inmiscibles entre sí y la muestra de interés. La fase móvil está en estado líquido y tiene como función transportar la muestra a través de la fase estacionaria (puede ser sólida o una película líquida que tiene como soporte un sólido inerte). La actuación de las fuerzas químicas y físicas entre la mezcla que se debe analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada componente de la mezcla. Aquellos componentes que tengan mayor afinidad con la fase estacionaria, se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad con la fase estacionaria. Estas diferencias hacen que se separen los componentes de la muestra.

Un HPLC normalmente opera con cinco instrumentos que son el reservorio, la bomba, el inyector, el horno (columna), el detector y el registrador. Los componentes del HPLC vienen representados en la figura 7 (Suarez Ospina et al., 2018).

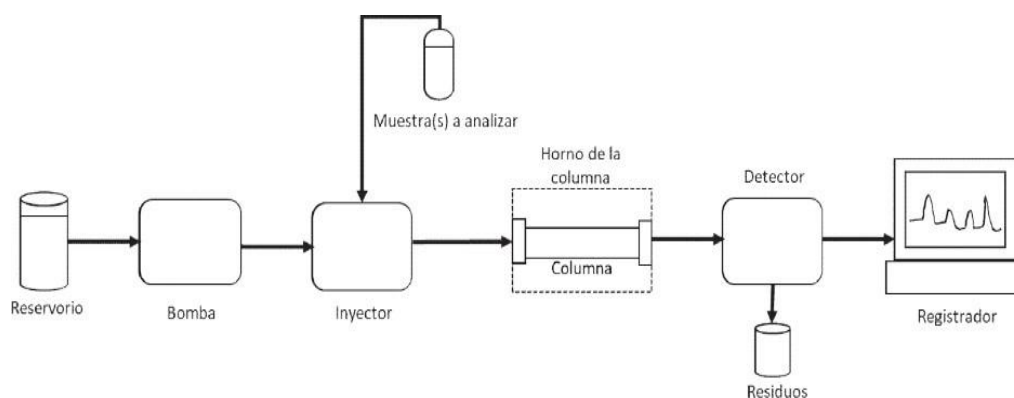


Figura 7. Esquema de un HPLC.

El reservorio es donde se encuentra la fase móvil. Esta fase contiene sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo del tipo de muestra que se va a analizar. La bomba es la encargada de transportar la fase móvil del reservorio por todo el sistema. Normalmente se inyecta un volumen de entre 5 μ L y 5 mL. En cuanto al

inyector, puede actuar de manera automática o manual y se encarga de introducir la muestra a la fase móvil. El horno es el encargado de regular y mantener la temperatura programada dentro de la columna debido a que la columna influye en la retención y selectividad de la misma. Por otra parte, la columna suele estar fabricada de acero inoxidable y contiene la fase estacionaria. El detector se encarga de la captación de los cambios en los efluentes de la columna y transformarlos en señales eléctricas, que a su vez son recibidas por el registrador (Suarez Ospina et al., 2018). Los tipos de detectores que se pueden utilizar para la determinación de OTA por HPLC son los siguientes:

- Detector de absorbancia ultravioleta

Este tipo de detector es el más utilizado en HPLC, su fundamento se basa en la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente con una longitud de onda definida. Los datos de absorbancia son representados en función de longitud de onda frente al tiempo.

- Detector de fluorescencia

Los detectores de fluorescencia se caracterizan por ser muy sensibles y selectivos, el principio de operación consiste en irradiar el componente de interés mediante la luz UV y la medición de la luz fluorescente que emite dicho componente.

- Detector electroquímico

Los detectores electroquímicos poseen ventajas debido a su sensibilidad, especificidad y su amplia aplicabilidad, sobre todo para compuestos orgánicos. Este tipo de detectores detecta por oxidación o reducción frente a aquellos analitos que pueden oxidarse o reducirse.

- Detector de índice de refracción

Estos detectores están formados por una celda con dos compartimentos, donde se introduce en uno de ellos el disolvente puro y en el otro la muestra. A continuación se hace pasar por luz visible paralela. Después, al entrar en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente, el haz de luz se desvía y varía la señal que es dada

por la fotocélula. Sin embargo, este tipo de detector es muy sensible a la variación de temperatura y no es adecuado para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.

- Detector de conductividad

Este tipo de detector es adecuado para los analitos que son iónicos (ácidos, bases, cationes y aniones inorgánicos). Sus principales ventajas son que presenta alta sensibilidad, es barato y de larga duración (Pássaro Carvalho et al., 2016).

Por último, el registrador se encarga de procesar las señales eléctricas y los plasma en un cromatograma para su lectura e interpretación de los resultados (Suarez Ospina et al., 2018).

- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una técnica que consiste en detectar antígenos o anticuerpos específicos en una muestra de interés, por medio de una combinación de principios enzimáticos e inmunológicos. Los componentes que tiene la prueba ELISA son: un antígeno o anticuerpo marcado con una enzima, un sustrato que es transformado por la enzima en un producto que se pueda detectar, un soporte y un sistema para detectar el producto. La clasificación de los tipos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas son los siguientes:

- ELISA directo

Esta técnica se encarga de detectar antígenos específicos en una muestra. Consiste en agregar la muestra en el soporte y permite que el antígeno se adsorba al soporte. Después se realiza un lavado para la eliminación de todo lo que no esté unido al soporte. Luego se añade el anticuerpo específico conjugado con la enzima, en el que posteriormente se unirá al antígeno en caso de que se haya adsorbido al soporte. Posteriormente, se le somete a un segundo lavado, donde se produce la eliminación del conjugado que no se adherió, se añade el sustrato incoloro y se convierte en un producto detectable.

- ELISA indirecto

Esta técnica beneficia la detección de anticuerpos. El soporte que une el antígeno específico contra el que va dirigido el anticuerpo que es buscado en la muestra. Primeramente, se añade la muestra y el anticuerpo se une al antígeno que está adherido al soporte. Después se realiza un lavado para eliminar lo que no esté unido al antígeno y luego se añade un anticuerpo antiinmunoglobina humana conjugado con una enzima, que se une al anticuerpo. Se realiza el segundo lavado por la cual se elimina el conjugado que no se ha unido y se añade el sustrato incoloro, siendo este convertido en un producto detectable.

- ELISA sándwich

En esta técnica, el soporte tiene unido a un anticuerpo específico con el antígeno buscado. Primeramente se añade la muestra e inmediatamente se une al anticuerpo que se encuentra adherido al soporte. Después se realiza un lavado para la eliminación de todo lo que no esté unido al anticuerpo. Luego se añade un segundo anticuerpo que está conjugado con la enzima, la cual es unida específicamente al antígeno de interés, pero en un epítipo diferente del que se unió el anticuerpo que estaba unido al soporte. Posteriormente, se realiza el segundo lavado en la cual es eliminado el conjugado que no estaba unido, se añade el sustrato incoloro y se convierte en un producto detectable (Ríos Yuil et al., 2012).

- ELISA competitivo

En este tipo de ELISA, los anticuerpos o los antígenos están inmovilizados en la fase sólida y se inhibe la unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima debido a la presencia de analito que no esté marcado en la muestra. Las incubaciones entre las muestras y los conjugados pueden ser simultáneas o secuenciales. Las incubaciones secuenciales no son muy competitivas, ya que se alcanza una mayor detectabilidad y es recomendable para la detección de anticuerpos de baja afinidad (Ochoa Azze, 2012).

En la figura 8 viene una representación de las técnicas de ensayo inmunoabsorbente ligadas a enzimas.

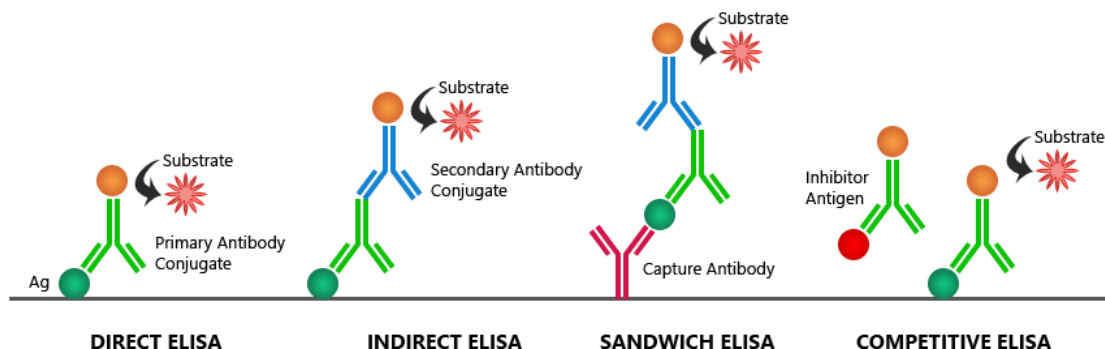


Figura 8. Tipos de ELISA.

3. OBJETIVOS

Según la normativa del TFM de la Universidad de Jaén, este trabajo supone hacer una mejora en la formación investigadora del estudiante (CGUJ, 2014). Las “competencias y resultados de aprendizaje” recogidos en la guía docente de esta asignatura son:

- Los estudiantes deben estudiar de un modo que tendrá que ser en la mayor medida autodirigido o autónomo
- Poseer y comprender conocimientos que aporten una base que tenga originalidad en el desarrollo y/o aplicación de ideas.
- Los estudiantes deben ser capaces de aplicar los conocimientos adquiridos y capacidad para resolver problemas en entornos nuevos dentro de contextos más amplios que estén relacionados con su área de estudio.
- Los estudiantes deberán integrar conocimientos y poder enfrentarse a la dificultad de formular juicios a partir de una información que incluya reflexiones sobre las responsabilidades éticas y sociales que estén vinculadas a la utilización de sus conocimientos y juicios.
- Deben ser capaces de comunicar sus conclusiones y los conocimientos y motivos últimos que las sustentan a públicos especializados y no especializados de una manera clara y sin ambigüedades.
- Han de analizar las necesidades de información que son planteadas en el entorno de la utilización de distintas metodologías avanzadas en Química.

- Tienen que seleccionar la instrumentación química y recursos informáticos que sean adecuados para el estudio a realizar y utilizar sus conocimientos para aplicarlos de manera correcta.
- Deben de adquirir la experiencia investigadora para su aplicación en labores propias de su profesión en el ámbito de la I+D+I.
- Han de elaborar una memoria que sea clara y concisa de los resultados de su trabajo y de las conclusiones obtenidas, así como la exposición y la defensa pública del desarrollo, resultados y conclusiones de su trabajo.
- Los estudiantes deben ser capaces de participar en equipos multidisciplinares encargados del diseño y desarrollo de proyectos científicos y/o profesionales en el ámbito de la Química.
- Los estudiantes desarrollarán su capacidad para alcanzar la perfección en el trabajo que deban realizar en las distintas áreas de la Química.
- Adoptarán decisiones de forma eficaz en el desarrollo de su labor investigadora y/o profesional en cualquier campo de la Química Básica y/o Aplicada.
- Han de conocer la necesidad de fomentar el avance científico, tecnológico, cultural o social en los que la Química desempeña una función básica dentro de una sociedad que está basada en el conocimiento.
- Deberán saber interpretar los resultados experimentales a la luz de las teorías aceptadas dentro de la Química y emitir hipótesis conforme al método científico y defender dichas hipótesis con argumentos.
- El estudiante deberá conocer la necesidad de completar su formación científica en informática e idiomas mediante la realización de actividades complementarias.
- Deberá saber utilizar herramientas de información y comunicación con el fin de plantear y resolver problemas nuevos dentro del contexto relacionado con su área de estudio.
- El estudiante tendrá que conocer y desarrollar hábitos de búsqueda activa de empleo, así como la capacidad de emprendimiento.
- Después de realizar el TFM, el estudiante debe ser capaz de elaborar un trabajo ya sea en formato libre o estructurado, donde se informe sobre los conocimientos y competencias adquiridos durante su realización así como sobre

los procedimientos seguidos para la obtención de los resultados. Aparte, deberá ser capaz de exponer los resultados más relevantes de dicho trabajo en el tiempo asignado para ello ante un tribunal, el cuál valorará la aptitud del estudiante en su trabajo de inicio a la investigación.

- El estudiante deberá aplicar los conocimientos adquiridos y tener la capacidad de resolver problemas en entornos nuevos o poco conocidos dentro de contextos más amplios relacionados con la industria química, el campo agroalimentario, el medio ambiente y el campo bio-sanitario, etc.
- También deberá interpretar los resultados experimentales a la luz de las teorías aceptadas y poder emitir hipótesis conforme al método científico y defenderlas de forma argumentada.
- Adquirirá las habilidades de aprendizaje que le permitan continuar estudiando de un modo que deberá ser en la mayor parte autodirigido o autónomo.

Todo ello pone de manifiesto la capacidad que debe adquirir estudiante en análisis y síntesis, organización y planificación, el conocimiento de una lengua extranjera, capacidad para gestionar datos y la generación de conocimiento mediante la utilización de las nuevas tecnologías de información y comunicación, aparte del razonamiento crítico y otras competencias relacionadas con el aprendizaje recibido.

Con la finalidad de demostrar todos estos aprendizajes adquiridos, el objetivo principal marcado de este TFM es la revisión bibliográfica de diferentes métodos existentes utilizados para la determinación de OTA en cereales y comparar dichos métodos y realizar una comparación entre los mismos viendo sus ventajas y desventajas. Por otra parte, se quiere discutir la problemática existente de la contaminación de OTA en cereales y revisar la concentración encontrada en distintas muestras de cereales de diferente origen.

4. REVISIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE OCRATOXINA A EN CEREALES

A la hora de empezar con la revisión bibliográfica, se ha trabajado con Scopus, Science Direct y SciFinder, que han facilitado el acceso a artículos científicos y ha sido utilizado como una gran fuente de información.

Gracias a la Universidad de Jaén y a la Biblioteca de la Universidad se pudo acceder a artículos y libros que han aportado datos para el desarrollo de este trabajo, recogidos todos en la Bibliografía.

Para llevar a cabo la determinación de la concentración de OTA en cereales se han utilizado diferentes etapas de extracción y purificación así como métodos de análisis. Comentaré a continuación algunos de ellos.

Según Biffi (Biffi et al., 2004) la muestra se extrae primeramente con 40 mL de acetonitrilo-agua (60:40) utilizando un licuado de alta velocidad durante 2 minutos. Después de llevar la muestra a centrifugación durante 25 minutos a 4°C, se diluye una alícuota de 9 mL con 99 mL de PBS (tampón fosfato salino). Posteriormente, se somete la muestra a SPE con una columna de inmunoafinidad (IAC) con un caudal de 3 mL/min. La columna se lava pasando 20mL de agua a 6 mL/min. Luego la OTA se recoge eluyendo con 1,5 mL de metanol-ácido acético (98:2). Se seca bajo nitrógeno y suspendido en 300 mL de agua, metanol y ácido acético (50:49:1) para así terminar analizando 100 μ L mediante HPLC con detección fluorescente. Para ello, se inyectó 100 μ L a la columna. La fase móvil era una mezcla de agua-acetonitrilo-ácido acético (50:49:1) a un caudal de 1 mL/min y la temperatura de la columna se fija a 40°C. El detector de fluorescencia se hace funcionar en $\lambda_{\text{ex}} = 333\text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 443\text{ nm}$.

Otra opción es la propuesta por Axberg (Axberg et al., 1997) en la que a la muestra se le aplica 2 mL HCl junto con 25 mL de tolueno y se agita en una licuadora durante 2 minutos. Después se lleva a centrifugación y se toma 5 mL de la fase de tolueno para la purificación. Para ello se somete la muestra a SPE, lavando primeramente la columna con 3 mL de cloroformo/ácido fórmico (95:5). El eluido se lava con 1 mL de agua y se seca con Na₂SO₄ anhidro. El cloroformo se somete a evaporación mediante corriente de nitrógeno y finalmente se le somete a análisis HPLC con detección fluorescente. Se

utiliza la técnica de par de iones con detección de fluorescencia. El residuo es disuelto en un 1 mL de la fase móvil que contiene bromuro de tetrabutilamonio en metanol/mezcla de tampón fosfato (54:46). Se inyecta 100 µL en la columna con una temperatura de 30°C y un caudal de 0,8 mL/min. El tiempo de retención de la OTA es de 7 minutos.

Según Jørgensen (Jørgensen et al., 1996) se extrae una porción de muestra molida con 250 mL de diclorometano:etanol (4:1) y 25 mL de ácido fosfórico 0-1M durante 30 minutos en un instrumento de agitación. El extracto se filtra con sulfato de sodio seco, se toman 50 mL del extracto y se purifica con LLE transfiriendo el extracto a un embudo de decantación, donde se extrae con 3x35 mL de bicarbonato de sodio en agua:etanol (5:2). La fase acuosa se lava con 25 mL de diclorometano y se agrega 15 mL de ácido fosfórico 2M y se extrae en un embudo de decantación 2 veces con diclorometano. La fase orgánica se filtra con sulfato sódico seco y se añade 10 µL de propilenglicol como protector y se evapora el diclorometano casi a sequedad y el residuo se transfiere con diclorometano:ácido acético a un matraz. El disolvente finalmente se evapora con nitrógeno. La fase móvil que se utiliza para el análisis por HPLC es una mezcla de acetonitrilo-agua-ácido acético (50:49:1) con un caudal de 1 mL/min y derivatización post-columna con 6% de amoniaco en agua con un caudal de 0,8 mL/min. Se inyecta 25 µL a la columna y se utiliza un detector de fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$.

Otra posibilidad es la de Sun (Sun et al., 2019) en el que la muestra es sometida a una SLE, para ello se mezcla la muestra con 2 mL de metanol-PBS al 50%. Luego se agita durante 10 minutos y se lleva a centrifugación durante 10 minutos. El sobrenadante se diluye 1:5 con PBS antes del ensayo mediante ELISA BA-Nb. En este último se recubren los pocillos de la placa de microvaloración con 100 µL del conjugado antígeno OTA-BSA (0,5 µg/mL en PBS) durante 2 horas a 37°C. Luego se realiza 3 lavados con PBS con un 0,05% de Tween 20 (PBST). Los pocillos se bloquean mediante una incubación con 300 µL de PBS con un 3% de leche en polvo desnatada durante 1 hora a 37°C, seguido de tres lavados con PBST. Posteriormente, 50 µL de los extractos de muestra se añaden a los pocillos 50 µL de la solución de Nb28 biotinilada. Las placas se incuban durante 15 minutos a 37°C y se lavan tres veces con PBST. Después se

administran 100 μ L por pocillo de solución SA-HRP (diluido x4000 en PBS) y las placas se incuban durante 15 minutos a 37°C. Se realizan tres lavados con PBST y, posteriormente, se añaden 100 μ L por pocillo del sustrato TMB en las placas y se lleva a incubación durante 10 minutos a 37°C. La reacción enzimática se detiene por medio de la adición de 50 μ L por pocillo de ácido sulfúrico 2M. La absorbancia de los pocillos se mide a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas de microvaloración.

En la investigación de Zhang (Zhang et al., 2011), la muestra se le somete a SLE, para ello la muestra se extrae con 100 mL de metanol al 50% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente agitándolo de vez en cuando. Después se lleva a centrifugación durante 10 minutos y se realiza una filtración de pliegues antes del análisis por ELISA competitivo indirecto (ci-ELISA). En donde una mezcla de OTA-KLH (ojo de cerradura hemocianina de lapa) en tampón bicarbonato-carbohidratos 0,05M es añadido a los micropocillos y se mantiene a una temperatura de 4°C de noche para recubrir. Luego se realizan tres lavados con PBST (Tampón fosfato salino con Tween-20) y se utiliza un volumen de gelatina al 1% en PBS para bloquear los pocillos durante 2 horas a 37°C antes de realizar otros tres lavados con PBST. Posteriormente, 100 μ L de anticuerpo se mezcla con las muestras extraídas en un tubo nuevo y la mezcla se añade a cada pocillo revestido para que reaccione con el revestimiento antígeno durante 1 hora a 37°C. Después de un lavado adicional con PBST, se lleva a incubación aproximadamente 100 μ L de IgGe-HRP (Cabra anti-ratón IgGe peroxidasa de rábano) (1:1000 en PBST) en los pocillos durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se agrega el sustrato TMB (3,3,5,5-tetrametilbencidina)/H₂O₂ y se incuba durante 15 minutos a 37°C. La absorbancia se lee a 450 nm después de la detención de la reacción con 50 μ L de ácido sulfúrico 2M.

En el estudio de Tang (Tang et al., 2018) se realiza un SLE, para ello la muestra se mezcla con 2 mL de 40% metanol/agua por medio de agitación y ultrasonidos durante 15 minutos. Luego la muestra se somete a centrifugación durante 5 minutos, el sobrenadante se diluye 1:8 con PBS y así estar la muestra preparada para el análisis por ELISA.

Según De Girolamo (De Girolamo et al., 2011) se somete la muestra a SLE y después a SPE, por lo que primeramente la muestra se extrae con 40 mL de metanol-agua (60:40) y se lleva a agitación durante 5 minutos. Posteriormente, los extractos se filtran por

pliegues y se diluyen 5 mL de extracto con 15 mL de tampón de unión. Después el extracto se filtra por un filtro de microfibra de vidrio. Ahora comienza el proceso de SPE, para ello se limpia un volumen de 10 mL de extracto de muestra en columna SPE empaquetada con 300 μ L de oligosorbente y gravimétricamente. La columna se lava con 6 mL de tampón de unión y se descarta el eluido. La OTA se eluye de la columna aptámero-SPE con 4 mL de metanol:tampón de elución (20:80). Por último los extractos se almacenan a 4°C hasta el análisis por HPLC con detección fluorescente. La fase móvil está compuesta por una mezcla de acetonitrilo-agua-ácido acético (49,5:49,5:1). El tiempo de retención de OTA es de 7 minutos aproximadamente. En el detector de fluorescencia, las longitudes de onda establecidas son de $\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$.

En la investigación de Blesa (Blesa et al., 2004) se extrae la muestra mediante SLE, para ello primero se coloca la muestra en un mortero y se mezcla con 1,5 gramos de la fase sólida (C8) durante 5 minutos con un mortero para la obtención de una mezcla homogénea. Esta mezcla se introduce en una columna cromatográfica de vidrio, la OTA se eluye con 20 mL de metanol-ácido fórmico (99:11) con un colector de vacío. Después el eluido se evapora con una corriente suave de nitrógeno a 45°C y se filtra a través de un acrodisco de nailon y se lleva a centrifugación durante 10 minutos. El extracto se filtra y se evapora con nitrógeno a 45°C para finalmente ser llevado a HPLC con detección fluorescente. Se utiliza una fase móvil compuesta de metanol-ácido fórmico 0,1M (70:30) a un caudal de 0,4 mL/min. El detector fluorescente registraba la detección de OTA con unas longitudes de onda para excitación y emisión de 334 y 464 nm respectivamente.

Por otra parte, Dohnal (Dohnal et al., 2010) llevó a cabo un estudio en el que la muestra es sometida a SLE y a LLE, para ello se extrae la muestra con una mezcla de 144 mL de acetonitrilo y 16 mL de KCl al 4% acidificada por 0,32 mL de H_2SO_4 concentrado. Después se filtra la suspensión con un filtro de pliegues y se extrae con 100 mL de hexano durante 1 minuto. Este paso se repite 2 veces, posteriormente, a la fase acuosa se le añade 20 mL de cloroformo y se agita durante 20 minutos. Se elimina la fase orgánica y se vuelve a extraer 2 veces más. Los extractos de cloroformo se alcalinizan y se extraen con 3x50 mL de bicarbonato de sodio al 5% y se lleva a agitación durante 10 minutos. Las fases acuosas se combinan y se acidifican con HCL hasta un pH=1,5 y se

deja en reposo durante 20 minutos. A continuación, se extrae la disolución 3 veces con cloroformo (100, 50 y 50 mL). Los extractos de cloroformo se combinan y se evapora a vacío en un rotavapor, se añaden 2 mL de metanol y la disolución se transfiere a un vial y se evapora por corriente de nitrógeno y finalmente se mide en HPLC.

En el estudio de Vega (Vega et al., 2009) se aplica primeramente una SLE y después una SPE. Primeramente, se extrae la muestra con 200 mL de bicarbonato de sodio al 1% (p/v) y se lleva a agitación durante 30 minutos en un agitador orbital. La disolución se filtra con un filtro de pliegues y después se mezcla 10 mL del filtrado con 10 mL de solución salina tampón y se pasa por la columna que es previamente acondicionada con 10 mL de la solución salina tampón. La columna se lava con 5 mL de agua destilada y se eluye la muestra con 3 mL de metanol. Finalmente, el eluido se evapora hasta sequedad por una corriente de nitrógeno a 40°C antes de pasar por el HPLC, donde la fase móvil contiene acetonitrilo-metanol-ácido ortofosfórico 0,15M (33,33:33,33:33,33) con un caudal de 0,8 mL/min. El residuo previamente se disuelve en 500 µL de líquido y se filtra con un filtro de jeringa de PTFE con un tamaño de poro de 0,45 µm. El detector fluorescente trabaja con una longitud de excitación de 333 nm y una longitud de 470 nm. El tiempo de retención de la OTA en estas condiciones es de 5-5,5 minutos.

En la investigación de Jung Lee (Jung Lee et al., 2015) la muestra se extrae con 100 mL de acetonitrilo/agua (80:20) y se agita durante 30 minutos. Posteriormente, el extracto se filtra por filtro de pliegues y se toman 10 mL del filtrado para mezclarlo con 40 mL de PBS. Luego se pasan 10 mL del extracto diluido por la columna de inmunoafinidad (IAC) con un caudal de 2-3 mL/min. La columna se lava con 10 mL de PBS y con 10 mL de agua y se eluye la OTA con 3 mL de metanol con el mismo caudal que en el caso anterior. Después, el eluido se evapora hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno a 50°C. El residuo se disuelve en 500 µL metanol/agua (50:50) y finalmente se realiza el análisis por HPLC con detección fluorescente. Se inyecta 50 µL en la columna, la fase móvil está compuesta de una mezcla de acetonitrilo-agua (50:50) que contiene ácido acético al 1% con un caudal de 0,4 mL/min. Las longitudes de onda para la excitación y emisión son de 334 nm y 460 nm respectivamente.

En el estudio de Campone (Campone et al., 2012) primeramente se aplica una SLE y después una DLLME. La muestra se extrae con 20 mL de metanol y se agita con una

licuadora durante 1 minuto y los extractos se filtran mediante filtro de pliegues. Luego se añade 400 μL de CCl_4 como extractante I a una alícuota de 1 mL de extracto de metanol, que actúa como disolvente dispersor, y la mezcla se inyecta en un tubo cónico Falcon que contiene 10 mL de agua con $\text{pH}=8$ (previamente ajustada con NaOH 0,1N). La mezcla se agita a mano durante unos segundos, después se lleva a centrifugación durante 5 minutos. Posteriormente se lleva a un segundo tubo Falcon y su pH se ajusta a 2 mediante HCl 1N. Una mezcla de 150 μL de $\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}_2$ como extractante II y 600 μL de metanol (como disolvente dispersor) se inyecta en la disolución acuosa, formándose una disolución turbia estable, la cual se centrifuga durante 5 minutos. Posteriormente, se cuantifica la fase de $\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}_2$ sedimentada transfiriéndolo a un pequeño vial con una microjeringa. La jeringa se lava dos veces con acetona y la disolución de lavado se transfiere al mismo vial. La fase orgánica se seca bajo una corriente de nitrógeno y finalmente se reconstituye el residuo con 100 μL de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) antes de pasar por el HPLC con detección fluorescente. La fase móvil utilizada contiene ácido acético 1% acuoso-acetonitrilo (60:40) con un caudal de 1 mL/min. Las longitudes de onda de excitación y emisión son de 330 nm y 460 nm respectivamente. La cantidad inyectada en la columna de extractos de muestra son de 20 μL .

Según Barna-Vertró (Barna-Vertró et al., 1996) a la muestra se le realiza una SLE, para ello se agrega a la muestra 10 mL de diclorometano y 5 mL de ácido cítrico 1M en un matraz Erlenmeyer y se agita en vórtex durante 5 minutos, se sella con parafilm y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal. La suspensión se lleva a centrifugación durante 30 minutos. Se obtienen tres fases, una acuosa (superior), torta de muestra (medio) y diclorometano (inferior). La fase acuosa se elimina, la torta de muestra se parte en trozos y 2 mL de diclorometano se lleva a otro tubo cónico. A la fase de diclorometano se le agrega 2 mL de tampón bicarbonato de sodio al 1%, se sella con parafilm y se agita durante 30 minutos. La mezcla se centrifuga durante 20 minutos para obtener una solución tampón clara. 490 μL de solución se pipetea en un tubo de ensayo y se agrega 10 μL de HCl 1N. Se mezcla y 50 μL se utiliza para el ELISA competitivo directo. Para ello se comienza con el recubrimiento de los pocillos con 150 μL de Ig de conejo y anti-Ig de ratón (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 18 horas a temperatura ambiente y después se lava tres veces con Tween 20 al 0,05% de agua destilada. Luego se pipetea 120 μL de ascitis anti-OA diluido (1:500) a

cada pocillo y se incuban durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de lavar con agua destilada, las placas se secan y se almacenan en una bolsa de aluminio durante varios meses a 4°C. 50 µL de muestras extraídas son incubadas en pocillos con 50 µL de conjugado OA-peroxidasa (1:4000) diluido en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados, los pocillos se llevan a incubación con 150 µL de TMB-H₂O₂ por pocillo durante 15 minutos. La reacción se termina añadiendo 50 µL de ácido sulfúrico 6N y se mide con un lector de microplacas automático.

Por último, en la investigación de Scudamore (Scudamore et al., 1999) se mezcla la muestra con 250 mL de cloroformo y 25 mL de ácido ortofosfórico 0,1M y se lleva a agitación durante 30 minutos. El extracto se filtra y se toman 50 mL de extracto reducido a sequedad y 1 mL de tolueno adicional. Después se prelava un cartucho de sílice con 10 mL de tolueno y la muestra agregada al cartucho en 1 mL de tolueno. El cartucho se lava con 10 mL de tolueno seguido de 10 mL de cloroformo-metanol (97:3) y la OTA se eluye con 10 mL de tolueno:ácido acético (90:10). Finalmente se evapora a sequedad y se transfiere a un vial antes de la medición por HPLC con detección fluorescente. La fase móvil utilizada contiene ácido ortofosfórico al 0,1%-acetonitrilo (50:50) con un caudal de 0,5 mL/min. El detector utilizado es un detector de fluorescencia que tiene una longitud de excitación de 333 nm y una longitud de onda de emisión de 470 nm.

En las tablas 6-10, se recoge un resumen de la determinación de OTA en cereales mediante HPLC. En la tabla 11 se muestra un resumen de las técnicas ELISA. Los aptasensores e inmunosensores, técnicas menos empleadas que las anteriores, así como otros tipos de técnicas raramente utilizadas den la determinación de OTA en cereales se muestran en las tablas 12 y 13, respectivamente.

Tabla 6. Tabla resumen de la determinación de OTA mediante HPLC (Cromatografía Líquida de alto rendimiento) (Elaboración propia).

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
Italia	2001-2002	422	Trigo	ND-0,16	0,13	0,02	SPE metanol-ácido acético (98:2)	HPLC-	Biffi et al., 2004
			Maíz	0,10-0,27	0,17			FD	
			Espelta	0,14-0,82	0,40				
			Avena	ND-0,44	0,22				
			Cebada	-	ND				
			Centeno	0,04-1,15	0,35				
			Arroz	0,01-0,15	0,07				
Suecia	1995	459	Centeno	-	0,10	0,03	SPE cloroformo-ácido fórmico (95:5)	HPLC-	Axberg et al., 1997
			Trigo	-	0,20			FD	
Dinamarca	1986-1992	1431	Trigo	ND-51,00	0,70	0,05	LLE NaHCO ₃ en agua-etanol (5:2)	HPLC-	Jorgensen et al., 1996
			Centeno	ND-121,00	1,20			FD	
			Avena	ND-5,60	0,50				
			Cebada	ND-14,00	0,90				
-	-	8130	Cebada	-	-	-	SLE ACN/agua (60:40) SPE con metanol	HPLC- FD	Andersson et al., 2011
Túnez	-	422	Trigo	11,00-250,00	55,00	0,05	SLE tolueno, HCl 2M y MgCl 0,4M SPE Metanol-ácido acético (98:2)	HPLC-	Zaied et al., 2009
			Cebada	11,00-940,00	96,00			FD	
			Sorgo	10,00-150,00	44,00				
			Arroz	8,00-950,00	117,00				
Italia	-	-	Trigo	-	-	0,02	SLE metanol-agua (60:40) SPE metanol-tampón (20:80)	HPLC- FD	De Girolamo et al., 2011

ND: concentración de OTA inferior al límite de detección.

Tabla 7. Continuación de la tabla 6.

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
República Checa	2008	20	Trigo	-	-	0,30 µg/L	SLE acetonitrilo y KCl acidificado LLE bicarbonato de sodio y cloroformo	HPLC-FD	Dohnal et al., 2010
Irán	-	-	Arroz	2,50-200,00	-	0,06	SLE acetonitrilo-agua (60:40)	HPLC-FD	Hossein Mashhadizadeh et al., 2013
			Trigo	2,50-200,00	-	0,03	SPE metanol-ácido acético (98:2)		
			Maíz	2,50-200,00	-	0,05			
Chile	-	91	Trigo	ND-2,10	0,15	0,60	SLE bicarbonato de sodio 1% SPE metanol	HPLC-FD	Vega et al., 2009
			Arroz	ND-12,50	0,00				
			Maíz	ND-1,2	0,00				
Italia	-	238	Sémola	-	-	0,06	SPE metanol-ácido acético (98:2)	HPLC-FD	Beretta et al., 2002
			Arroz	-	-				
			Maíz	-	-				
			Multicereal	-	-				
-	-	-	-	-	-	-	SPE	HPLC	Wood et al., 1995
Dinamarca	1993-1999	1431	Trigo	ND-32,00	0,30	0,01	SPE	HPLC-FD	Jørgensen et al., 2002
			Centeno	ND-63,00	1,02				
India	-	126	Trigo	-	-	0,03	SLE ácido fosfórico y cloroformo LLE bicarbonato 3% SPE acetato etilo-metanol-ácido acético (95:5:0,5)	HPLC-FD	Viswanath et al., 2007
			Cebada	-	-				
Reino Unido	-	306	Trigo	ND-9,20	0,29	0,10	SLE cloroformo y ácido ortofosfórico SPE tolueno-ácido acético (90:10)	HPLC-FD	Scudamore et al., 1999
			Cebada	ND-17,80	0,69				
			Avena	ND-2,2	0,15				

Tabla 8. Continuación de la tabla 7.

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
Brasil	-	20	Harina de trigo	0,22-0,85	0,36	0,25	QuEChERS	HPLC-FD	Kupski et al., 2015
EEUU	2012-2014	489	Maíz	0,02-40,00	0,23	0,03	SLE con acetonitrilo-agua (80:20)	HPLC-FD	Jung Lee et al., 2015
			Arroz	0,08-47,00	0,10		SPE con metanol		
			Trigo	0,02-160,00	0,30				
			Avena	0,12-9,30	1,33				
Italia	-	-	Maíz	-	-	0,02	SLE con metanol	HPLC-FD	Campone et al., 2012
			Arroz	-	-		DLLME con CCl ₄ (extractante 1) y C ₂ H ₄ Br ₂ (extractante 2) (metanol disolvente)		
			Trigo	-	-				
Turquía	2008-2010	84	Cereales desayuno	ND-0,42	0,32	0,05	SLE con acetonitrilo-agua (60:40)	HPLC-FD	Ozden et al., 2012
			Cereales infantiles	ND-0,20	0,14		SPE con metanol		
			Tarhana	ND-1,85	0,41				
Estados Unidos	-	-	Avena	-	-	0,18	SLE con acetonitrilo-agua (80:20) SPE con metanol	HPLC-FD	Jung Lee et al., 2019

ND: concentración de OTA inferior al límite de detección.

Tabla 9. Continuación de la tabla 8.

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
Suecia	-	9	Trigo	3,55-4,94	4,19	-	NMKL	HPLC	Larsson et al., 1996
			Centeno	1,94-5,82	3,85				
			Cebada	1,75-4,26	3,33				
España y Portugal	2005	83	Trigo	0,20-7,97	0,54	0,05	MSPD	HPLC-	Juan et al., 2008
			Maíz	ND-1,90	0,04			FD	
			Avena	ND-2,50	0,04				
			Cebada	ND-ND	ND				
			Centeno	ND-27,10	0,77				
			Arroz	ND-7,60	0,12				
			Espelta	ND-2,20	0,37				
España	2003	-	Arroz	ND-ND	ND	0,25	SLE metanol-ácido fórmico (99:1)	HPLC-	Blesa et al., 2004
			Trigo	ND-ND	ND			FD	
			Cebada	ND-ND	ND				
Marruecos	-	68	Maíz	ND-15,7	1,04	0,08	PLE (Extracción líquida presurizada)	HPLC-	Zinedine et al., 2010
			Arroz	ND-ND	ND			FD	
			Trigo	ND-ND	ND				
Marruecos	2006	100	Arroz	0,08-47,00	12,60	0,015	ASE (Extracción disolvente acelerado)	HPLC- FD	Juan et al., 2008

ND: concentración de OTA inferior al límite de detección.

Tabla 10. Continuación de la tabla 9.

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
España	-	6	Trigo	-	-	0,45	Microextracción supramolecular	HPLC-FD	García-Fonseca et al., 2010
Suecia	1990, 1992-1993, 1999, 2000-2002	220	Trigo	-	-	0,10	ASPEC (sistema automatizado de extracción en fase sólida)	HPLC-FD	Lindblad et al., 2004
			Centeno	-	-				
			Avena	-	-				
			Cebada	-	-				
España	-	84	Arroz	ND-27,3	1,06	0,01	ASE	HPLC-FD	González et al., 2006

ND: concentración de OTA inferior al límite de detección.

Tabla 11. Tabla resumen de la determinación de OTA mediante ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (Elaboración propia).

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
China	-	-	Arroz	ND-2,21	1,41	0,01	SLE metanol-PBS (50:50)	BA-Nb ELISA	Sun et al., 2019
			Avena	ND-7,45	3,72	µg/L			
			Cebada	ND-1,91	0,95				
China	-	65	Trigo	-	-	0,15	SLE metanol-PBS (50:50)	ci-ELISA	Zhang et al., 2011
			Maíz	-	-	µg/L			
			Arroz	-	-				
China	-	-	Cebada	-	-	0,03	SLE metanol 50%	BA-ELISA	Sun et al., 2018
			Avena	-	-	µg/L			
			Arroz	-	-				
China	-	-	Arroz	-	-	0,31	SLE metanol-agua (40:60)	ELISA	Tang et al., 2018
			Avena	-	-	µg/L			
			Cebada	-	-				
Hungría	-	-	Maíz	-	-	0,50	SLE diclorometano	ELISA competitivo directo	Barna- Vetró et al., 1996
			Cebada	-	-				
China	-	10	Trigo	ND-1,98	0,55	0,10	SLE 70% metanol-PBS	ELISA competitivo	Wang et al., 2015
			Maíz	ND-6,91	2,19	µg/L			

ND: concentración de OTA inferior al límite de detección.

Tabla 12. Tabla resumen de la determinación de OTA por medio de Aptasensores e Inmunosensores. (Elaboración propia).

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
China	-	-	Trigo	-	0,90	0,001 µg/L	SLE acetonitrilo-agua (60:40)	Aptasensor electroquímico	Tong et al., 2011
China	-	13	Arroz	ND-1,68	1,18	0,005 µg/L	SLE tampón metanol-borato (50:50)	Inmunosensor Nb-FRET	Tang et al., 2019
			Avena	ND-13,80	4,93				
			Cebada	ND-1,64	0,82				
			Trigo	ND-0,006	0,003				
-	-	-	Trigo	-	-	0,013 µg/L	SLE ACN-H ₂ O (60:40)	Inmunosensor electroquímico	Alarcón et al., 2006
China	-	-	Maíz	-	-	8,2e-03 µg/L	SLE metanol-agua (75:25)	Inmunosensor electroquímico	Liu et al., 2009
China	-	-	Maíz	-	-	0,07 µg/L	SLE metanol-agua (80:20)	Aptasensor electroquímico	Qing et al., 2017
			Trigo	-	-		SPE metanol-ácido acético (98:2)		
China	-	-	Maíz	-	-	0,20 µg/L	SLE metanol-agua (80:20)	Aptasensor fluorescente	Bi et al., 2020
			Cebada	-	-				
China	-	-	Trigo	-	-	0,002 µg/L	SLE metanol-agua (80:20)	Aptasensor fluorescente	Chen et al., 2014
España	-	-	Trigo	-	-	0,07 µg/L	SLE acetonitrilo-agua (60:40)	Aptasensor magnético	Bonel et al., 2011

ND: concentración de OTA inferior al límite de detección.

Tabla 13. Tabla resumen de la determinación de OTA mediante otras técnicas. (Elaboración propia).

País	Año de recolección	Muestras totales	Tipo de muestra	Concentración MIN y MAX de OTA (µg/kg)	Concentración media de OTA (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Técnica de extracción y purificación	Método de análisis	Referencia
Dinamarca	-	43	Cebada	ND-24,30	1,40	-	SLE con H ₃ PO ₄ y CHCl ₃	TLC	Hald et al., 1975
			Avena	ND-ND	ND				
Canadá	-	27	Cebada	-	11200	-	SLE con H ₃ PO ₄ 0,1M y cloroformo	RPTLC	Frohlich et al., 1988
			Trigo	-	73500				
China	-	-	Arroz	-	-	10,00 µg/L	SLE con PBS 20mM con metanol al 50%	HN-DIA	Chen et al., 2020
			Avena	-	-				
China	-	12	Trigo	0,98-9,23	4,63	3e-04 µg/L	SLE con metanol-agua (80:20)	ChI	Hun et al., 2013
China	-	20	Maíz	0,10-0,75	0,30	4,4e-04	SLE con metanol al 60% en agua	RT-IPCR	Liu et al., 2014
			Trigo	0,13-1,27	0,68		desionizada y éter de petróleo		
			Arroz	0,12-0,44	0,25				
China	-	-	Arroz	-	-	0,02 µg/L	SLE con metanol al 80%	SPCM	Li et al., 2021
			Maíz	-	-				
			Trigo	-	-				
Italia	-	-	Maíz	-	-	1,50	SLE con PBS (2% PEG)	LFIA	Laura et al., 2011

TLC: Cromatografía de Capa Fina

RPTLC: Cromatografía de Capa Fina en Fase Reversa

HN-DIA: Inmunoensayo Puntual

ChI: Sistema de inmunoensayo por quimioluminiscencia

RT-IPCR: Inmuno PCR en Tiempo Real

SPCM: Microesferas de Cristal Fotónico de Sílice

LFIA: Inmunoensayo de Flujo Lateral

ND: concentración de OTA inferior al límite de detección.

Teniendo en cuenta que el límite máximo permitido de OTA en cereales no elaborados es de 5 µg/kg, se puede observar en las tablas anteriores que en estudios realizados por Dinamarca, Túnez, Irán, Chile, Reino Unido, Estados Unidos, China, Suecia, España, Portugal y Marruecos se superaba la concentración de OTA permitida por la comisión europea en el muestreo realizado. En cambio, en Italia, Brasil y Turquía no se superaban dicho límite.

También se puede ver que, en la mayoría de los estudios realizados, utilizan para la extracción y purificación de OTA la extracción en fase sólida (SPE) o la extracción sólido-líquido (SLE), esto se debe a que al ser muestras sólidas es más sencillo usar estas dos técnicas de extracción en vez de usar la extracción líquido-líquido.

En cuanto al límite de detección (LOD), por medio del método de análisis HPLC, se puede ver que en España (González et al., 2006) y Dinamarca (Jørgensen et al., 2002) se obtuvo el límite de detección más bajo, dando un valor de 0,01 µg/kg. El intervalo en el que se encuentra los límites de detección en HPLC es [0,01-0,45] µg/kg. En el método de análisis ELISA, el límite de detección más bajo se encontró en China (Sun et al., 2019) con un valor de 0,01 µg/L y el rango de LOD de ELISA es [0,01-0,31] µg/L.

En general, los límites de detección de todas las técnicas para la determinación de OTA en cereales, se encuentra en el rango ng/kg o ng/L. Esto significa que se puede analizar la cantidad de OTA en cereales de una forma segura para el cumplimiento de la normativa de la Comisión Europea.

Comparando el HPLC con ELISA, ambos métodos presentan una muy buena correlación por lo que la medición de la OTA presenta una alta exactitud. En cuanto a los resultados de ELISA son ligeramente más bajos en comparación con el HPLC (Dohnal et al., 2013). Según Rubio (Rubio et al., 2003) tanto ELISA como HPLC son eficaces pero ELISA presenta un límite de detección inferior al del HPLC, lo que supone una ventaja para los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ELISA se caracteriza por ser rápido, sensible, específico y tener la capacidad de analizar muchas muestras simultáneamente, sin embargo puede producirse anticuerpos uniformes y estables y necesitar un tiempo largo para el desarrollo de un procedimiento. En cuanto al HPLC, presenta las ventajas de alcanzar una exactitud y una precisión alta,

aunque para ello se requiere de una instrumentación muy costosa y etapas de pretratamiento de muestra muy complejas (Yuan et al., 2001).

5. CONCLUSIONES

Como se ha visto a lo largo de este trabajo, las ocratoxinas afectan a varios alimentos y se acumulan en la sangre y leche de los animales que se encuentran expuestos a ellas. La baja solubilidad hace que OTA se absorba en el tracto gastrointestinal uniéndose así a las proteínas de membrana. Como resultado de esta absorción, se produce la reabsorción en el riñón, y la recirculación enterohepática, lo que se traduce en una disminución de la biotransformación y eliminación renal. Por lo tanto, OTA está asociada a problemas renales, incluso llegando a producir adenomas o carcinomas. Habitualmente, los cereales que se toman para la determinación y cuantificación de OTA son el trigo, cebada, avena, arroz y maíz. Se han llegado a las siguientes conclusiones:

- Es importante la prevención y control de calidad de alimentos para evitar o reducir de manera significativa su contaminación. Una de las muestras que habitualmente son analizadas son los cereales, en donde se investiga los niveles de concentración de la OTA.
- Los niveles de OTA encontrados en cereales deben ser siempre inferiores a los límites establecidos por la legislación. En el caso de cereales no elaborados el LMR está fijado por la Unión Europea en un valor de 5 µg/kg.
- Las técnicas de extracción y purificación más utilizadas para la determinación de OTA en cereales son la SLE y la SPE, debido a que los cereales son muestras sólidas y es más fácil la extracción utilizando estas metodologías.
- Las técnicas de análisis más utilizadas para la determinación y cuantificación de OTA en cereales son el HPLC y el ELISA.
- En algunos países como Italia, Brasil y Turquía se han analizado muestras que cumplen con la normativa europea en cuanto al límite máximo de residuo de OTA en cereales. En cambio, en países como Dinamarca, Túnez, Irán, Chile, Reino Unido, Estados Unidos, China, Suecia, España, Portugal y Marruecos, se

han detectado muestras que no cumplen con la normativa, superando el límite establecido.

- En general, los límites de detección se encuentran en un rango de ng/kg o ng/L, lo que hace indicar que con estas técnicas se puede detectar que cereales cumplen con la normativa de la Comisión Europea y cuáles no.
- Comparando ELISA y HPLC, con la primera técnica se han conseguido en algunos casos menores límites de detección que con HPLC.
- Ambas técnicas son eficaces, rentables, con alta exactitud y precisión. ELISA es capaz de medir mayor número de muestras ya que nos permite un análisis simultáneo, a diferencia de HPLC que nos permite analizar muestra por muestra.
- El grado de automatización con HPLC es mayor que con ELISA, motivo por el cual dicha técnica sea tan utilizada hoy día en los laboratorios. En número de métodos encontrados en bibliografía que utilizan HPLC es muy superior al de cualquier otra técnica, pese al elevado coste que supone la instrumentación utilizada.
- Solo es posible contar con una adecuada seguridad alimentaria mediante el empleo de métodos de análisis que permitan controlar los niveles de concentración de los contaminantes. En el caso de la OTA, se debe seguir investigando para encontrar métodos que sean más sencillos, rápidos y económicos a los establecidos hoy día en el mercado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AFHSE. (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Andersson, M.G., Reiter, E.V., Lindqvist, P.A., Razzali-Fazeli, E., Häggblom, P. (2011). Comparison of manual and automatic sampling for monitoring ochratoxin A in barley grain. Food Additives & Contaminants: Part A, 28 (8), 1066-1075.

- Axberg, K., Jansson, G., Svensson, G., Hult, K. (1997). Varietal differences in accumulation of ochratoxin A in barley and wheat cultivars after inoculation of *Penicillium verrucosum*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 47 (4), 229-237.
- Barna-Vetró, I., Solti, L., Téren, J., Gyöngyösi, Á., Szabó, E., Wölfling, A. (1996). Sensitive ELISA Test for Determination of Ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem*, 44, 4071-4074.
- Beretta, B., de Domenico, R., Gaiaschi, A., Ballabio, C., Galli, C.L., Gigliotti, C., Restani, P. (2002). Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives & Contaminants*, 19 (1), 70-75.
- Bi, X., Luo, L., Li, L., Liu, X., Chen, B., You, T. (2020). A FRET-based aptasensor for ochratoxin A detection using graphitic carbon nitride quantum dots and CoOOH nanosheets as donor-acceptor pair. *Talanta*, 218, 121159.
- Biffi, R., Munari, M., Dioguardi, L., Ballabio, C., Cattaneo, A., Galli, C.L., Restani, P. (2004). Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market, 2001-02. *Food Additives & Contaminants*, 21 (6), 586-591.
- Blesa, J., Berrada, H., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2004). Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1046, 127-131.
- Bonel, L., Vidal, J.C., Duato, P., Castillo, J.R. (2011). An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 3254-3259.
- Campone, L., Piccinelli, A.L., Celano, R., Rastrelli, L. (2012). pH-controlled dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of ionizable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. *Analytica Chimica Acta*, 754, 61-66.
- Castelló Gómez, M., Fito Suñer, P., Seguí Gil, L., Betoret Valls, N. (2020). *Fundamentos de la Extracción Sólido-Líquido*. Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos.

- CGUJ (2014). Normativa sobre los másteres oficiales en la Universidad de Jaén, aprobada en sesión nº 24 de fecha 30 de abril de 2013 y modificada en sesión nº 39 de fecha 8 de abril de 2014.
- Chen, J., Zhang, X., Cai, S., Wu, D., Chen, M., Wang, S., Zhang, J. (2014). A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver-nanocluster for ochratoxin A detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 226-231.
- Chen, Q., Wang, Y., Mao, F., Su, B., Bao, K., Zhang, Z., Xie, G., Liu, X. (2020). Development of a horseradish peroxidase-nanobody fusion protein for visual detection of ochratoxin A by dot immunoassay. *RSC Advances*, 20, 33700-33705.
- Comisión Europea (2016). Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, 020.001, 1-40.
- De Girolamo, A., McKeague, M., Miller, J.D., DeRosa, M.C., Visconti, A. (2011). Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column. *Food Chemistry*, 127, 1378-1384.
- Dohnal, V., Dvořák, V., Malíř, F., Ostrý, V., Roubal, T. (2013). A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 427-431.
- Dohnal, V., Pavlíková, L., Kuca, K. (2010). The pH and Mobile Phase Composition Effects Ochratoxin A Fluorescence at Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 48, 766-770.
- Esteve Turrillas, F.A. (2007). Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados. Universitat de Valencia. Valencia (Diciembre, 2006).
- Frohlich, A.A., Marquardt, R.R., Bernatsky, A. (1988). Quantitation of Ochratoxin A: Use of Reverse Phase Thin-Layer Chromatography for Sample Cleanup Followed by Liquid Chromatography or Direct Fluorescence Measurement. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(5), 949-953.
- García-Fonseca, S., Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., Pérez-Bendito, D. (2010). Supramolecular solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat

- prior to liquid chromatography-fluorescence determination. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2376-2382.
- González, L., Juan, C., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2006). Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 223-227.
 - Hald, B., Krogh, P. (1975). Detection of Ochratoxin A in Barley, Using Silica Gel Minicolumns. *Journal of the AOAC*, 58 (1) 156-158.
 - Hossein Mashhadizadeh, M., Amoli-diva, M., Pourghazi, K. (2013). Magnetic nanoparticles solid phase extraction for determination of ochratoxin A in cereals using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1320, 17-26.
 - Huff, W.E., Hamilton, P.B. (1979). Mycotoxins. Their Biosynthesis in Fungi: Ochratoxins. Metabolites of Combined Pathways. *Journal of Food Protection*, 42 (10), 815-820.
 - Hugo Alarcón, S., Palleschi, G., Compagnone, D., Pascale, M., Visconti, A., Barna-Vetró, I. (2006). Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for determination of ochratoxin A in wheat. *Talanta*, 69, 1031-1037.
 - Hun, X., Liu, F., Mei, Z., Ma, L., Wang, Z., Luo, X. (2013). Signal amplified strategy based on target-induced strand release coupling cleavage of nicking endonuclease for the ultrasensitive detection of ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 39, 145-151.
 - Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122, 179-188.
 - Jørgensen, K., Jacobsen, J.S. (2002). Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. *Food Additives and Contaminants*, 19 (12), 1184-1189.
 - Jørgensen, K., Rasmussen, G., Thorup, I. (1996). Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Additives & Contaminants*, 13 (1), 95-104.
 - Juan, C., Moltó, J.C., Lino, C.M., Mañes, J. (2008). Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chemistry*, 107, 525-530.

- Juan, C., Zinedine, A., Idrissi, L., Mañes, J. (2008). Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 83-85.
- Jung Lee, H., Gu, B.J., Ganjyal, G., Ryu, D. (2019). Reduction of ochratoxin A in direct steam injected oat-based infant cereals with baking soda. *Food Control*, 96, 441-444.
- Jung Lee, H., Ryu, D. (2015). Significance of Ochratoxin A in Breakfast Cereals from the United States. *J. Agric. Food Chem*, 64 (43), 9404-9409.
- Kupski, L., Badiale-Furlong, E. (2015). Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. *Food Chemistry*, 177, 354-360.
- Larsson, K., Möller, T. (1996). Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxin A in Barley, Wheat Bran, and Rye by the AOAC/IUPAC/NMKL Method: NMKL Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 79 (5), 1102-1106.
- Laura, A., Gilda, D.A., Claudio, B., Cristina, G., Gianfranco, G. (2011). A lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A: Development of a single system for maize, wheat and durum wheat. *Food Control*, 22, 1965-1970.
- Li, Q., Liang, B., Li, W., Li, W., Sun, J., Jiao, S., Wang, S., Jin, Y., Zheng, T., Li, J. (2021). A capillary device made by aptamer-functionalized silica photonic crystal microspheres for the point-of-care detection of Ochratoxin A. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 330, 129367.
- Lindblad, M., Jonhsson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R., Olsen, M. (2004). Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 609-616.
- Liu, X., Xu, Y., Xiong, Y., Tu, Z., Li, Y., He, Z., Qiu, Y., Fu, J., Gee, S.J., Hammock, B.D. (2014). VHH-phage based competitive real-time immuno-PCR for ultrasensitive detection of ochratoxin A in cereal. *Anal. Chem*, 86, 7471-7477.
- Liu, X.P., Deng, Y.J., Jin, X.Y., Chen, L.G., Jiang, J.H., Shen, G.L., Yu, R.Q. (2009). Ultrasensitive electrochemical immunosensor for ochratoxin A using gold colloid-mediated hapten immobilization. *Analytical Biochemistry*, 389, 63-68.

- Mishra, H.N., Das, C. (2003). A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (3), 245-264.
- Ochoa Azze, C.R.F. (2012). Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. La Habana (Cuba). Finlay Ediciones.
- Ochoa Ortega, P. (2016). Estudio comparativo de métodos de tratamiento de muestra para la determinación de bisfenol A en alimentos/bebidas. Universidad de Jaén. Jaén (Junio, 2016).
- Ozden, S., Akdeniz, A.S., Alpertunga, B. (2012). Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. *Food Control*, 25, 69-74.
- Pássaro Carvalho, C.P., Rivera Narváez, C.M., Román Páez, M.A., Cardona Bermúdez, L.M., Muñoz Echeverri, L.M., David Gómez, D., Quinceno Rico, J.M., Rojas Bedoya, L.C. (2016). Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. *SENNOVA*, 29-30.
- Qing, Y., Li, X., Chen, S., Zhou, X., Luo, M., Xu, X., Li, C., Qiu, J. (2017). Differential pulse voltammetric ochratoxin A assay based on the use of an aptamer and hybridization chain reaction. *Microchim Acta*, 184, 863-870.
- Ravelo Abreu, A., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A.J., Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutr. Hosp*, 26 (6), 1215-1226.
- Ríos Yuil, J.M., Mercadillo Pérez, P., Yuil de Ríos, E., Ríos Castro, M. (2012). ELISA y sus aplicaciones en dermatología. *Dermatología CMQ*, 10 (3), 212-222.
- Rubio, F., Veldhuis, L.J., Clegg, B.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C. (2003). Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 691-696.
- Santillán Mendoza, R., Rodríguez Alvarado, G., Fernández Pavía, S.P., Vázquez Marrufo, G., Montero Castro, J.C., Benítez Malvido, J. (2017). Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública?. *Revista Digital Universitaria*, 18 (6).

- Scudamore, K.A., Patel, S., Breeze, V. (1999). Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food Additives & Contaminants*, 16 (7), 281-290.
- Serrano-Coll, H.A., Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Med*, 29 (1), 143-152.
- Suarez Ospina, D., Morales Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Semilleros: Formación Investigativa*, 4 (1), 7-14.
- Sun, Z., Lv, J., Liu, X., Tang, Z., Wang, X., Xu, Y., Hammock, B.D. (2018). Development of a nanobody-AviTag fusion protein and its application in a streptavidin-biotin-amplified enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A in cereal. *Anal. Chem*, 90 (17), 10628-10634.
- Sun, Z., Wang, X., Tang, Z., Chen, Q., Liu, X. (2019). Development of a biotin-streptavidin-amplified nanobody-based ELISA for ochratoxin A in cereal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 382-388.
- Tang, Z., Liu, X., Su, B., Chen, Q., Cao, H., Yun, Y., Xu, Y., Hammock, B.D. (2019). Ultrasensitive and rapid detection of ochratoxin A in agro-products by a nanobody-mediated FRET-based immunosensor. *Journal of Hazardous Materials*, 387, 121678.
- Tang, Z., Wang, X., Lv, J., Hu, X., Liu, X. (2018). One-step detection of ochratoxin A in cereal by dot immunoassay using a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein. *Food Control*, 92, 430-436.
- Tejada Mansir, A., Montesinos Cisneros, R.M., Guzmán Zamudio, R. (2011). *Bioseparaciones*. México. Pearson Educación, 209.
- Tong, P., Zhang, L., Xu, J.J., Chen, H.Y. (2011). Simply amplified electrochemical aptasensor of Ochratoxin A based on exonuclease-catalyzed target recycling. *Biosensors and Bioelectronics*, 29, 97-101.
- Vega, M., Muñoz, K., Sepúlveda, C., Aranda, M., Campos, V., Villegas, R., Villarroel, O. (2009). Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market. *Food Control*, 20, 631-634.
- Viswanath, P., Kavitha, S., Ayesha, F., Appaiah, K.M. (2007). A survey of ochratoxin A in wheat and barley in India. *Journal of Food Safety*, 21, 111-123.

- Wang, Y., Hu, X., Pei, Y., Sun, Y., Wang, F., Song, C., Yin, M., Deng, R., Li, Z., Zhang, G. (2015). Selection of phage-displayed minotopes of ochratoxin A and its detection in cereal by ELISA. *Anal. Methods*, 7, 1849-1854.
- Wood, G.M., Entwisle, A.C., Patel, S., Hald, B., Boenke, A. (1995). Ochratoxin A in cereals and the BCR-M&T-Projects. *Natural Toxins*, 3, 275-279.
- Yuan, Z., Duan, J., Fan, S., Kong, K. (2001). Comparison of an ELISA and a HPLC for Determination of Ciprofloxacin Residues in Pork. *Food and Agricultural Immunology*, 13, 199-204.
- Zaied, C., Abid, S., Zorgui, L., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M., BACHA, H. (2009). Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control*, 20, 218-222.
- Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X., Zhang, H. (2011). Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*, 22, 1723-1728.
- Zinedine, A., Blesa, J., Mahnine, N., El Abidi, A., Montesano, D., Mañes, J. (2010). Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. *Food Control*, 21, 132-135.