



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**Determinación de  
residuos de micotoxinas  
en alimentos mediante  
Cromatografía de  
Líquidos/Espectrometría  
de Masas**

**Alumna: Sandra Esteo Donaire**

**Febrero, 2018**



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Facultad de  
Ciencias Experimentales 

Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

**Determinación de  
residuos de micotoxinas  
en alimentos mediante  
Cromatografía de  
Líquidos/Espectrometría  
de Masas**

**Alumna: Sandra Esteo Donaire**

**Febrero, 2018**

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN / ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Justificación.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Seguridad Alimentaria y Legislación .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Micotoxinas .....</b>	<b>10</b>
<i>2.3.1. Toxicidad de Micotoxinas .....</i>	<i>11</i>
<i>2.3.2. Clasificación de Micotoxinas.....</i>	<i>13</i>
<b>2.4. Antecedentes .....</b>	<b>20</b>
<b>2.5. Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas.....</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Materiales y Reactivos .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2. Tratamiento de Muestra .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3. Instrumentación.....</b>	<b>33</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1. Optimización del Método Cromatográfico.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2. Validación del Método.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2. Aplicación al estudio de muestras reales .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>



## 1. RESUMEN

Actualmente, el análisis de residuos de micotoxinas en alimentos es de gran importancia debido a que su consumo puede tener efectos tóxicos, agudos y crónicos, tanto en la salud humana como animal. Este trabajo trata de identificar y cuantificar varios tipos de estos residuos en leche y vino. Se seleccionaron 10 compuestos de micotoxinas ampliamente conocidos. Su determinación fue llevada a cabo mediante el desarrollo y validación de un método de Cromatografía de Líquidos de Ultra Elevada Eficacia acoplada a un Espectrómetro de Masas en Tándem (UHPLC-MS/MS) con analizador de Triple Quadrupolo (QqQ) equipado con una interfase de electrospray (ESI) operando en modo positivo. Estos compuestos se caracterizaron a través del tiempo de retención del ion precursor ( $[M+H]^+$ ), de la masa de dicho ion y las masas de sus dos fragmentos mayoritarios. Se hizo uso de Extracción en Fase Sólida con cartuchos Oasis HLB PRiME para el tratamiento de muestra. Para finalizar, se analizaron 11 muestras de leche y 5 de vino, de diferentes marcas comerciales, obtenidas en distintos supermercados para comprobar la presencia/ausencia de residuos de micotoxinas.

## ABSTRACT

Currently, the analysis of mycotoxin residues in food is of great importance because its consumption can have toxic, acute and chronic effects, both in human and animal health. This work tries to identify and quantify several types of these residues in milk and wine. Ten widely known mycotoxin compounds were selected. Their determination was carried out through the development and validation of a method of Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to a Tandem Mass Spectrometer (UHPLC-MS/MS) with Triple Quadrupole (QqQ) analyzer equipped with an electrospray interface (ESI) operating in positive mode. These compounds were characterized through the retention time of the precursor ion ( $[M+H]^+$ ), its mass, and the masses of its two major fragments. Solid Phase Extraction was used with Oasis HLB PRiME cartridges for the sample treatment. Finally, 11 samples of milk and 5 samples of wine, from different commercial brands, obtained in different supermarkets were analyzed to check the presence/absence of mycotoxin residues.

## **2. INTRODUCCIÓN**

*“La comida que comes puede ser la más poderosa forma de medicina o la forma más lenta de veneno”* mencionó alguna vez la doctora Ann Wigmore basándose en lo que dijo en su momento el filósofo griego Hipócrates: *“Deja que la medicina sea tu comida y deja que la comida sea tu medicina”*.

Tener una buena nutrición está relacionado con la salud. La alimentación es una parte imprescindible para el ser humano. Es la primera defensa contra enfermedades que se puedan contraer, es la fuente de energía de la que se dispone para estar activo y vivir, además de ser especialmente importante para que el niño pueda crecer y desarrollarse.

Los problemas que se pueden ocasionar por dieta inadecuada o ausencia de ésta pueden ser de muchos tipos, hasta el punto de causar un ciclo generacional de malnutrición que puede afectar a todos los individuos y naciones.

No se ha de encasillar estos problemas simplemente en ciertos países, puesto que pueden existir problemas de malnutrición, como subalimentación, deficiencia de micronutrientes y obesidad, en todos los países, afectando a todas las clases socioeconómicas. [FAO Nutrición].

Por lo tanto, tener una buena alimentación aportando al organismo los nutrientes necesarios es de vital importancia, y por ello, es necesario realizar un análisis para asegurar la calidad en los alimentos, cuidando que no lleguen a la población con residuos de contaminantes, que pudieran suponer un riesgo para la salud.

Este estudio se centra en desarrollar y validar un método de análisis mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, que permita detectar residuos de micotoxinas que podrían llegar a nuestro organismo a través de leche y de vino, matrices de interés en este trabajo.

### **2.1. Justificación**

El mundo verdaderamente ha cambiado en las últimas décadas. Ahora es posible obtener productos e ingredientes de todas las partes del mundo con mucha facilidad. Sin embargo, como consecuencia de estos cambios, también llegan algunos problemas complejos. Ahora, la población debe ser consciente de los posibles

incidentes de contaminación y las fuentes de contaminación que pueden afectar a los productos tanto en calidad como en seguridad.

Además, es necesario añadir, que la tecnología ha ido evolucionando, que se dispone de nuevos materiales y nuevos métodos de producción que también pueden afectar a estos productos.

Estos hechos, junto con otros ocurridos a nivel mundial, como los incidentes de vertidos de petróleo en agua, la presencia de pesticidas en bebidas, entre otros, hacen que el análisis de contaminantes en alimentos sea cada vez más necesario.

De ahí que la sociedad deba estar cada vez más concienciada en que los productos que lleguen al consumidor sean de buena calidad y que no contengan sustancias perjudiciales para la salud. [Food Safety Magazine (2011)].

La leche, objeto de estudio en este trabajo, proporciona nutrientes esenciales y es una fuente importante de energía, de proteínas de alta calidad y de grasas. Es por esto que la leche de origen animal puede jugar un papel muy importante en países con un nivel bajo de ingestión de grasas o un acceso limitado a otros alimentos de origen animal. También contribuye a la ingestión diaria de calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B<sub>12</sub> y ácido pantoténico. [FAO Portal lácteo].

Un vaso de leche aporta a un niño el 21% de las necesidades diarias de proteínas, el 8% de calorías y además micronutrientes clave. [FAO: La leche en cifras].

Las micotoxinas pueden llegar a la leche fresca cuando la vaca haya consumido algún alimento con aflatoxina B<sub>1</sub>. Estos metabolitos son generados por la actividad de hongos en granos y forrajes, por ejemplo, y podrían proliferar debido al cultivo en el campo, su recogida, transporte y almacenamiento. La presencia de estos microorganismos en el propio campo es inevitable, sin embargo para su propagación sería necesario que los cultivos pasaran por daños causados por insectos, por fechas de siembra y cosecha incorrectas y otras condiciones ambientales extremas como estrés hídrico o daños por granizos.

Las micotoxinas poseen unas características bastante importantes, éstas son su termoestabilidad y su resistencia. Así pueden llegar hasta varios niveles de la cadena alimenticia, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria, causando graves problemas para la salud e incluso pudiendo causar la muerte.

Anteriormente se pensaba que la vaca lechera era menos susceptible a estos compuestos que otros animales, ya que se creía que el rumen podría reducir el efecto de las micotoxinas producidas por hongos. Sin embargo, se ha observado en

recientes estudios que no es del todo cierto, ya que si estos animales consumen alimentos con un nivel de micotoxinas mayor del rango tolerable, la leche podría sufrir cambios en su composición y podría afectar a la eficiencia reproductiva, entre otras cosas. [Gómez Bravo *et al.* 2018].

El vino incide significativamente en la economía de muchos países. Los principales productores de vino son, en este orden, Francia, Italia, España, EE.UU., Argentina y Sudáfrica. Para controlar la calidad del vino se necesita considerar tanto los aspectos microbiológicos como los químicos. La mercancía puede estar contaminada por micotoxinas producidas por ciertos hongos. Las uvas pueden contraer enfermedades fúngicas y los hongos a veces producen micotoxinas. Son los llamados hongos micotoxigénicos, de los cuales la preocupación mayor se encuentra en *Aspergillus carbonarius*, que produce la Ocratoxina A (OTA).

Un factor determinante es el clima, siendo de especial importancia las altas temperaturas para la contaminación por OTA. *Aspergillus niger* también es importante, ya que está relacionado con las fumonisinas. Además, se han observado en el vino las aflatoxinas y la micotoxina T-2 de forma común. Sin embargo la patulina rara vez se detecta y las demás no son motivo de preocupación actualmente.

Hay un período crítico entre el envero y la cosecha temprana para la contaminación por OTA debido a daños abióticos y/o bióticos de las bayas. Esta contaminación aumenta con la maduración y con el daño de estas bayas, que puede ser causado por insectos, hongos patógenos, por lluvia o un riego excesivo.

Se necesitan buenas prácticas agrícolas para controlar los efectos por micotoxinas en el vino. El efecto del cambio climático en las vides y en las micotoxinas del vino necesita ser estudiado urgentemente para obtener una buena interpretación de los datos, sobre todo de OTA en uvas a temperaturas más altas. La salud de la vid es importante para esto.

Pueden ser susceptibles de contaminarse por micotoxinas una gran diversidad de vinos, como rojo, blanco, dulce, seco y fortificado. Este trabajo se dedica al estudio de vino rojo (vino tinto de mesa). [Paterson *et al.* 2018].

Por todos estos motivos, es importante realizar un estudio sobre micotoxinas en estas muestras y comprobar si cumplen los niveles regulados por la legislación.

## 2.2. Seguridad Alimentaria y Legislación

### ❖ SEGURIDAD ALIMENTARIA

El concepto de Seguridad Alimentaria surgió en la década de los 70 y se basó en la producción y disponibilidad alimentaria tanto a nivel global como nacional. En los años 80, se añadió la idea de acceso económico y físico. En la década de los 90, se llegó al concepto que se tiene en la actualidad, en la que se incorpora la inocuidad y las preferencias culturales y se reafirma como un derecho humano.

Según el Instituto de Nutrición para Centroamérica y Panamá (INCAP), la **Seguridad Alimentaria Nutricional** *“es un estado en el cual todas las personas gozan, en forma oportuna y permanente, de acceso físico, económico y social a los alimentos que necesitan, en cantidad y calidad, para su adecuado consumo y utilización biológica, garantizándoles un estado de bienestar general que coadyuve al logro de su desarrollo”*.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), desde la Cumbre Mundial de la Alimentación (CMA) de 1996, la **Seguridad Alimentaria** *“a nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana”*. En esta definición, el término “seguro” se refiere a la inocuidad de los alimentos y a la garantía de su salubridad para el consumidor.

En esa misma Cumbre, dirigentes de 185 países y de la Comunidad Europea, reafirmaron en la Declaración de Roma sobre la Seguridad Alimentaria Mundial, *“el derecho de toda persona a tener acceso a alimentos sanos y nutritivos, en consonancia con el derecho a una alimentación apropiada y con el derecho fundamental de toda persona a no padecer hambre”*. [FAO (2011): Seguridad Alimentaria y Nutricional].

En España, la AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición es un Organismo Autónomo que se creó en 2001, adscrito al Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, cuya misión es garantizar la Seguridad Alimentaria, como algo fundamental para la salud pública, promover la salud de los ciudadanos para

que tengan confianza en los alimentos que consumen, así como información adecuada.

A nivel comunitario, la legislación alimentaria tiene como objetivo garantizar la libre circulación de alimentos y piensos en la Unión Europea (EU, *European Union*), adaptándolo según las normas internacionales.

La Comisión Europea (EC, *European Commission*) plasmó sus prioridades en el “Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria”, que se presentó en 2000, donde se recoge la principal estrategia de conseguir los más elevados niveles de seguridad alimentaria en la EU.

Este libro establece que el “Análisis de riesgo” debe ser la base de la política de la seguridad alimentaria, mediante tres componentes recogidos en el Reglamento 178/2002, que son:

- Evaluación del riesgo: Consiste en el asesoramiento científico y análisis de datos.
- Gestión del riesgo: Pondera las distintas opciones normativas según los resultados de la evaluación del riesgo y si es necesario adoptar las medidas apropiadas para prevenir, reducir o eliminar el riesgo. Es una etapa basada en la reglamentación y control del riesgo.
- Comunicación del riesgo: Proporciona información apropiada, coherente y exacta sobre seguridad agroalimentaria a todos los interesados según la conclusión científica obtenida. [Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria].

## ❖ **LEGISLACIÓN**

Actualmente, los compuestos tóxicos que se deben controlar en los alimentos son muchos, pero en este caso, el trabajo está dedicado a los contaminantes llamados micotoxinas.

Para que el control sea efectivo, se establecen límites máximos de residuos tolerados (MRLs, *Maximum Residues Levels*) según el procedimiento del Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y Sanidad Animal y previa consulta a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*). [Reglamento 178/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo].

### **Legislación española**

La legislación española se basa en el Real Decreto 475/1998, de 13 de Mayo de 1988, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en alimentos para consumo humano. Establece como máximo 10 µg/kg para la suma de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> y un máximo de 5 µg/kg para la aflatoxina B<sub>1</sub>. [Real Decreto 475/1998].

### **Legislación europea**

En la tabla 1 se muestra un resumen de la legislación que aplica Europa a las micotoxinas.

En lo que respecta a la alimentación animal, actualmente sólo se establece un nivel máximo para aflatoxina B<sub>1</sub> para la alimentación de ganado vacuno lechero, el cual no debe superar los 0.050 mg/kg, y para todas las materias primas 0.02 mg/kg. [ELIKA (2005)].

El nivel máximo para la aflatoxina M<sub>1</sub> en leche para humanos es de 0.050 µg/kg. Para la ocratoxina A en vino es de 2.0 µg/kg. Para la patulina se establece una ingesta tolerable máxima provisional (PMTDI, *provisional maximum tolerable daily intake*) de 0.4 µg/kg por peso corporal. Para la ocratoxina A una ingesta semanal tolerable (TWI, *tolerable weekly intake*) de 120 ng/kg por peso corporal. Se establece una ingesta diaria tolerable (TDI, *tolerable daily intake*) para algunas toxinas de *Fusarium*, como para deoxinivalenol 1 µg/kg, zearalenona 0.2 µg/kg, para las fumonisinas 2 µg/kg, para nivalenol 0.7 µg/kg y para T-2 y HT-2 0.06 µg/kg. [Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión].

### **Legislación a nivel mundial**

Para la mayoría de los países se establece un límite de 2 µg/kg para la aflatoxina B<sub>1</sub>. Sin embargo para la suma de todas las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se permite hasta un máximo de 4 µg/kg. En cuanto a la aflatoxina M<sub>1</sub> el límite establecido está en 0.05 µg/kg.

Para la ocratoxina A se permite un valor de 5 µg/kg, sobre todo para cereales.

En el caso de las fumonisinas, para el total de ellas el límite va de 1000 a 3000 µg/kg. Como se ha mencionado, esto es para la mayoría de los países. [FAO-ONU (2004)].

Normativa	Descripción		
Directiva 93/5/CEE	Contenidos máximos para la patulina en determinados productos alimenticios		
Recomendación 2003/598	Prevención y reducción de la contaminación por patulina del zumo de manzana y los ingredientes de zumo de manzana en otras bebidas		
Recomendación 2006/583/CE de la Comisión	Prevención y reducción de la contaminación con toxinas de <i>Fusarium</i> (zearalenona, fumonisinas y tricotecenos) en los cereales		
Reglamento 1881/2006 de la Comisión	Se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios	Aflatoxinas	Frutos secos, cereales, leche y alimentos infantiles
		Ocratoxina A	Cereales, uvas pasas, café, vino, zumo de uva, alimentos a base de cereales, alimentos dietéticos y para lactantes y niños de corta edad
		Patulina	Zumos de frutas, bebidas elaboradas con manzana, alimentos infantiles y productos sólidos elaborados con manzana
		Deoxinivalenol	Cereales, pasta, pan y alimentos infantiles a base de cereales
		Zearalenona	Cereales, aperitivos y alimentos infantiles a base de cereales
		Fumonisinias	Cereales y alimentos elaborados a base de maíz
Reglamento 401/2006 de la Comisión	Métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios		
Reglamento 178/2010 de la Comisión	En lo que respecta a los cacahuetes y otras semillas oleaginosas, a los frutos de cáscara arbóreos, a los huesos de albaricoque, al regaliz y al aceite vegetal		
Recomendación 2013/165/UE	Sobre la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en los cereales y los productos a base de cereales		

Tabla 1. Legislación europea aplicable a micotoxinas. [Pérez Ortega 2015].

### 2.3. Micotoxinas

El reino de los hongos se puede clasificar en levaduras y hongos filamentosos o mohos. Los últimos mencionados son los productores de micotoxinas.

Los hongos filamentosos o mohos son organismos eucariotas multicelulares y filamentosos que están constituidos por micelios verdaderos. Están formados por una serie de células alineadas llamadas hifas y carecen de clorofila. El micelio es el conjunto de hifas ramificadas que resulta visible debido a su aspecto y color

característicos en la superficie o en el interior del alimento sobre el que se desarrolla. Los mohos utilizan para su crecimiento metabolitos primarios como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales se asocian con un crecimiento exponencial rápido de estos. Los metabolitos secundarios son unos compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro y entre los que se incluyen antibióticos y micotoxinas. [Carlile *et al.* 2001].

En la figura 1 se muestra un esquema de las distintas partes del moho.

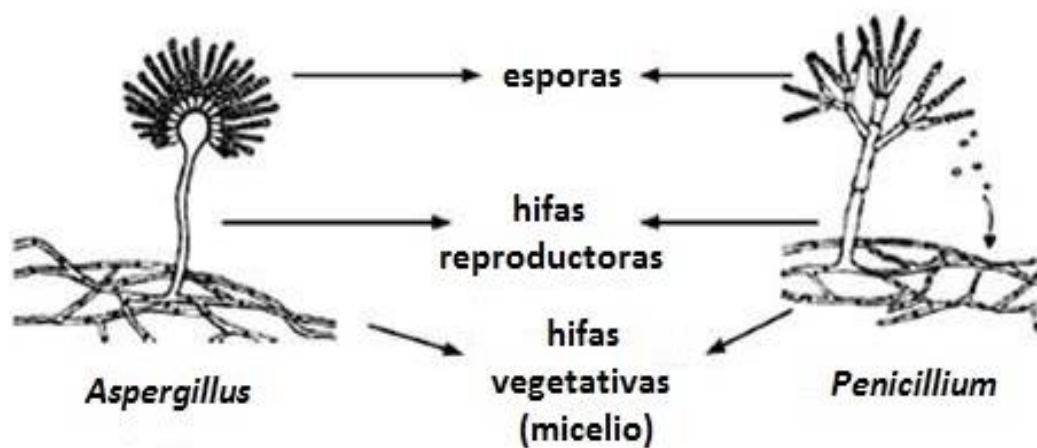


Figura 1. Partes del moho. [Arroyo Manzanares 2013].

El nombre de “micotoxina” proviene de las palabras griegas “*mikes*” que significa hongo y “*toxina*” que significa veneno. Se les conoce también como toxinas fúngicas y se definen como “*metabolitos secundarios de bajo peso molecular, producidos por varios centenares de especies de mohos que pueden crecer sobre los alimentos en determinadas condiciones*”. Desde antiguamente se conoce este efecto perjudicial y ya en ese tiempo se recomendaba no tomar alimentos enmohecidos. [AECOSAN: Seguridad Alimentaria].

### 2.3.1. Toxicidad de micotoxinas

En cuanto a la toxicidad que poseen las micotoxinas se puede decir que pueden contaminar alimentos, piensos, así como las materias primas que se utilizan para la elaboración de estos. Si la cantidad ingerida es elevada puede causar enfermedades o trastornos tanto en humanos como en animales, lo cual se denomina micotoxicosis. Puede verse aumentada la toxicidad de una micotoxina si se produce un efecto sinérgico al presentarse simultáneamente con otra u otras micotoxinas.

Los efectos adversos que se pueden presentar en el hombre y en los animales pueden ser agudos o crónicos y pueden afectar al hígado, al riñón, al sistema endocrino, al sistema nervioso e inmunitario. Los síntomas variarán dependiendo de la estructura de las toxinas. [Faustman *et al.* 2005; Martínez Larrañaga *et al.* 2006; Soriano del Castillo *et al.* 2007].

El riesgo de intoxicación aguda en el hombre por micotoxinas es bajo o moderado si se compara con otros agentes de origen microbiológico o contaminantes químicos. Sin embargo, la exposición crónica puede causar lesiones severas, como cáncer. [Martínez Larrañaga *et al.* 2006].

En la figura 2 se observan los efectos agudos y crónicos que pueden provocar las micotoxinas comparándolos con otros agentes. Se deduce de la figura que las micotoxinas se encuentran más cerca del vértice de la pirámide que de la base para efectos agudos, lo cual indica que hay otros agentes que producen muchos más perjuicio como los microbiológicos. Sin embargo para efectos crónicos las micotoxinas se encuentran en la base de la pirámide, siendo los agentes que más problemas causan a largo plazo. [Soriano del Castillo *et al.* 2007].

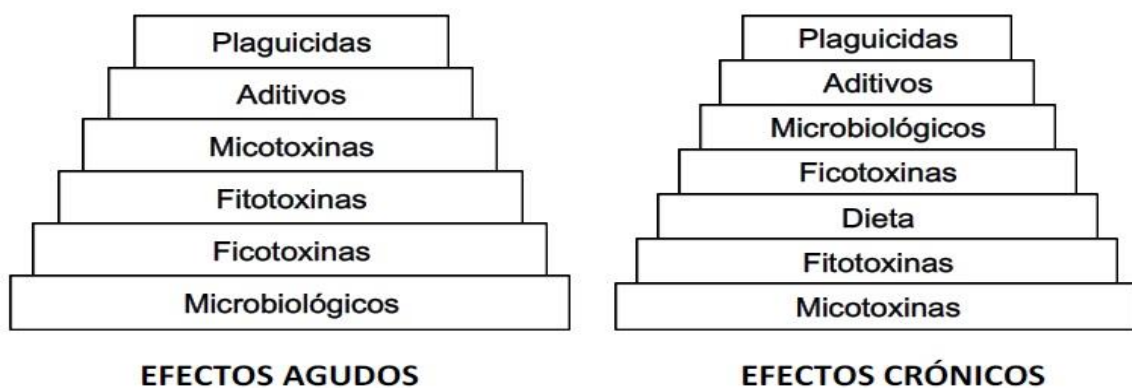


Figura 2. Efectos de la exposición a distintos agentes sobre la salud humana. [Soriano del Castillo *et al.* 2007].

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) clasifica algunas micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre, según la toxicidad crónica, en:

**Grupo 1:** agente carcinógeno en humanos.

**Grupo 2:** probablemente carcinógeno en humanos pero limitada, no existe evidencia con animales.

**Grupo 2B:** posiblemente carcinógeno en humanos limitada, en animales no existe suficiente evidencia.

**Grupo 3:** no clasificable como carcinógeno para humanos.

**Grupo 4:** probablemente no carcinógeno en humanos con evidencia disponible tanto en animales como en animales de experimentación. [IARC].

En la tabla 2 se detalla la evaluación realizada por la IARC según el poder carcinógeno de las micotoxinas.

Micotoxinas	Grupo
Aflatoxinas de origen natural	1
Aflatoxina M <sub>1</sub>	2B
Citrinina	3
Esterigmatocistina	2B
Fumonisina B <sub>1</sub>	2B
Ocratoxina A	2B
Patulina	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> (zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium sporotrichioides</i> (toxina T-2)	3

Tabla 2. Clasificación de micotoxinas según la IARC. [Carlile *et al.* 2001].

### 2.3.2. Clasificación de micotoxinas

En la figura 3 se encuentra una clasificación de micotoxinas atendiendo a los principales grupos. Las micotoxinas más importantes son las producidas por mohos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.

#### ❖ AFLATOXINAS

Son un grupo de micotoxinas producidas por mohos del género *Aspergillus*, en concreto de varias cepas de especies como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. Nomius* y *A. tamarii*.

Las aflatoxinas se conocen desde 1960, por la epidemia en Inglaterra que mató unos 100000 pavos que se alimentaban con maní infectado con *A. flavus* proveniente de Brasil. [Martínez Miranda *et al.* 2013].

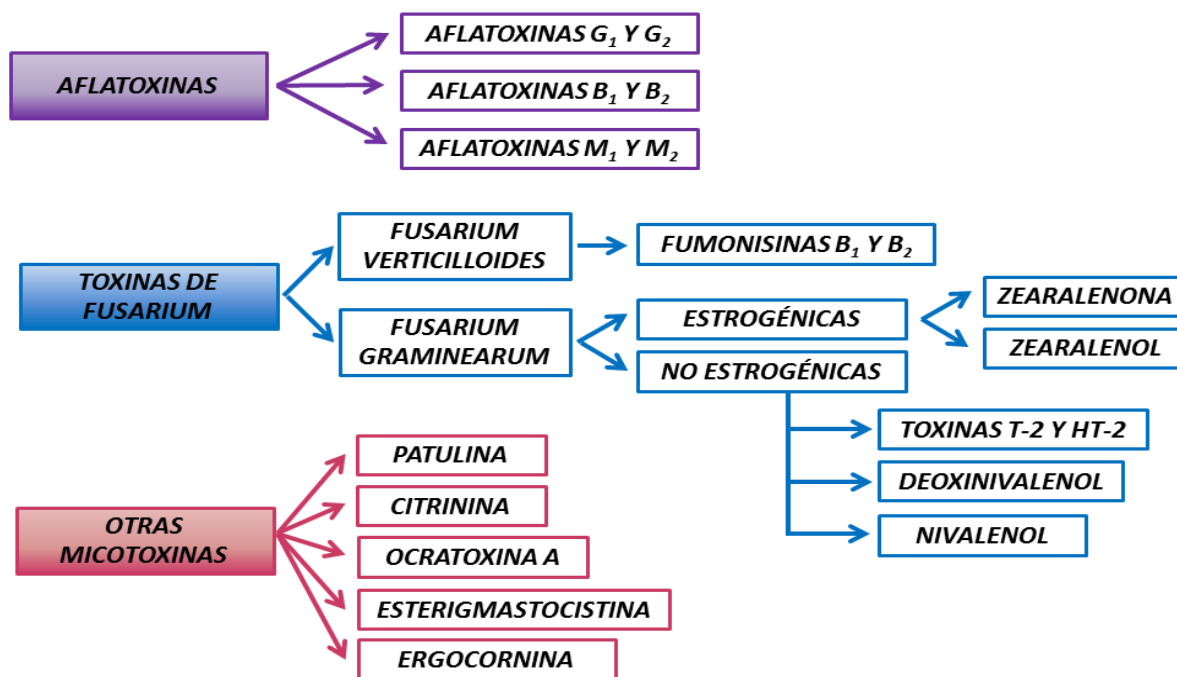


Figura 3. Clasificación de las micotoxinas. [Adaptado de Pérez Ortega 2015].

Pueden proliferar en muchos alimentos, como cacahuetes, maíz, en las semillas de algodón, además de frutos secos y frutas desecadas (higos secos, pasas, etc.), en cereales, en semillas oleaginosas como girasol, soja, en especias (pimentón, pimienta, etc.), en cacao, café y piensos. [Juan *et al.* 2001].

Principalmente se presenta este tipo de mohos en climas tropicales, por la temperatura y humedad elevadas. A una temperatura por debajo de 12°C prácticamente las aflatoxinas no se producen. Tiene lugar su producción entre los 12°C y los 27°C.

Existen unos 16 compuestos dentro de este grupo, pero sólo cinco se analizan como rutina. Éstas son: B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) y M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>). Para entender la información que da el nombre se aporta lo siguiente: la letra B indica que dichas aflatoxinas tienen fluorescencia azul frente a la luz ultravioleta (365 nm) (B del inglés *blue*). La letra G indica fluorescencia verde amarillenta (G del inglés *green*). Las que poseen subíndice 1 se diferencian de las de subíndice 2 puesto que éstas últimas presentan un doble enlace más que las primeras. Además, las B difieren de las G porque el anillo de furano de las primeras es un anillo de lactona en las segundas.

Los animales que consumen alimentos que estén contaminados por aflatoxinas B, son capaces de metabolizarlas, hidroxilándolas en una posición determinada y así

de esta forma a partir de la AFB<sub>1</sub> se puede formar la AFM<sub>1</sub> y de la AFB<sub>2</sub> la AFM<sub>2</sub>, siendo las aflatoxinas M las secretadas en la leche.

Actualmente se consideran las micotoxinas de mayor riesgo para la salud, sobre todo por ser tóxicos hepáticos y por su grado de toxicidad y carcinogenicidad siguiendo el orden de B<sub>1</sub>>G<sub>1</sub>>B<sub>2</sub>>G<sub>2</sub> de mayor a menor toxicidad, siendo la más tóxica la AFB<sub>1</sub>, que ha demostrado ser carcinógena en todos los animales de experimentación y además está clasificada por la Organización Mundial de la Salud (WHO, *World Health Organization*) como carcinógeno para el hombre.

En los humanos, estas aflatoxinas son responsables de muchas intoxicaciones masivas produciendo hepatitis agudas, sobre todo en zonas de la India, de África tropical y ecuatorial y del Sudeste Asiático, además de agravar enfermedades que se producen por malnutrición. [Arroyo Manzanares 2013; Pérez Ortega 2015].

#### ❖ TOXINAS DE *FUSARIUM*

Son micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium*. Son los principales contaminantes de alimentos en regiones templadas. El maíz es el producto más contaminado por este tipo de micotoxinas, pero también puede aparecer en otros cereales y en la malta de cerveza. Son más comunes en animales domésticos, pero también se conocen algunos casos en humanos. [Arroyo Manzanares 2013].

En función del moho que las produce se distinguen los siguientes subgrupos:

- ***Fusarium verticilloides*:**

Produce las conocidas fumonisinas.

**-Fumonisinias:** Son un grupo de toxinas producidas por los mohos del género *Fusarium*. Se conocen 15 tipos de ellas, pero la fumonisina B<sub>1</sub> es la más importante, la cual es producida por el hongo *Fusarium verticilloides*.

Estos hongos contaminan normalmente el maíz y todos los productos a base de maíz. Está relacionado con la aparición de cáncer de esófago e hígado, intoxicación aguda y defectos neuronales.

- ***Fusarium graminearum*:**

Produce toxinas estrogénicas y no estrogénicas.

**-Toxinas estrogénicas:** Pertenecen a este grupo la micotoxina zearalenona (ZEN) y zearalenol. Poseen estructura de lactona. A pesar de que no existe demasiada semejanza estructural con los estrógenos fisiológicos, la estructura tridimensional que tiene el anillo de lactona sitúa un -OH en una posición que es capaz de interactuar con los receptores de estrógenos.

**-Toxinas no estrogénicas:** Se incluyen en este grupo a deoxinivalenol, nivalenol, toxinas T-2 y HT-2 y a diacetoxiscirpenol. También se le conoce a este grupo como tricotecenos.

La más importante y también más frecuente es la micotoxina deoxinivalenol, también se le conoce con el nombre de “vomitoxina”, que es muy estable. Se conocen algunos casos en la India y en Japón, aunque es relativamente poco frecuente la intoxicación en humanos. En animales de experimentación no parece ser cancerígeno.

La toxina T-2 se presenta en alimentos producidos en zonas frías. La explicación podría ser que ésta se produce a una temperatura óptima bastante más baja que la de otras micotoxinas. Las toxinas T-2 y HT-2 pueden ser preocupantes para la salud según algunos estudios. Se necesita investigar más sobre ellas, que suelen aparecer en cereales y en productos a base de cereales, sobre todo en avena y productos a base de avena.

En cuanto a otros tricotecenos estudiados hasta este momento, como diacetoxicispermol, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, fusarenona-X, T2-triol, neosolaniol, monoacetoxiscirpenol y verrucol no existe mucha información ni están muy extendidos, con lo cual parecen no representar un riesgo para la salud humana.

Es de gran influencia en el contenido de estas toxinas las condiciones climáticas durante el crecimiento de la planta. Por esta razón, se puede prevenir esta contaminación con unas buenas prácticas agrícolas. [Arroyo Manzanares 2013; Pérez Ortega 2015].

## ❖ OTRAS MICOTOXINAS

Se hará referencia a las siguientes:

- **Patulina (PAT)**

La patulina es una micotoxina que se produce por varias especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Byssochyllum*. Puede penetrar principalmente en productos derivados de la manzana como jugos, zumos o sidra, debido a que es altamente soluble y muy estable en medios acuosos, y además pueden resistir el procesamiento térmico en jugos pasteurizados. Aparece en fruta, principalmente manzana, y en menor medida en pera y uva; pero también se ha detectado en vegetales y granos de cereales. Para mitigar esta toxina bastaría con lavar la fruta o eliminar las piezas que estén deterioradas, puesto que el maltrato y el pudrimiento de la fruta aumentan la probabilidad de formación de patulina.

Algo curioso es que presenta características de antibiótico y se ha probado para tratar el resfriado común, pero debido a que es un irritante estomacal y produce náuseas y vómitos no se ha insistido en seguir demostrando su efectividad.

Uno de los síntomas de intoxicación por esta toxina es hemorragia del tracto digestivo en ganado. Como dato, en 1954 se acusó de la muerte de 100 vacas en Japón a la intoxicación por patulina. [Katerere *et al.* 2008; Murillo *et al.* 2008; Rodríguez Carrasco *et al.* 2013; Víctor Ortega *et al.* 2013].

- **Citrinina (CIT)**

Es una micotoxina nefrotóxica producida por varias especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus*. Su presencia se ha detectado en alimentos como frutas, quesos y cereales, que principalmente se forma tras la recogida de la cosecha y aparece principalmente cuando los granos de cereales son almacenados; también se presenta en bellotas, nueces, zanahoria, tomate, carne, etc. Existe además en alimentos coloreados, como el arroz rojo, que es fermentado por especies del género *Monascus*.

Se caracterizó como antibiótico y demostró tener capacidad antifúngica y bacteriostática, pero más tarde se le responsabilizó de neuropatía porcina en varios países de Europa.

Tiene efectos nefrotóxicos y mutagénicos. Si se ingiere puede provocar diarrea y pérdida de peso debido a una degeneración renal. Es de resaltar el efecto sinérgico que se produce cuando se encuentra combinada junto a la ocratoxina A (OTA).

[Andersen *et al.* 2004; Arroyo Manzanares 2013; EFSA Journal 2012; Samsudin *et al.* 2013].

- **Ocratoxina A (OTA)**

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por hongos como *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*. Entre ellas se encuentran la A, la B, la C y los metil y etil ésteres derivados de las ocratoxinas A y B. La más importante es la ocratoxina A, por su toxicidad y por su gran incidencia en alimentos y es en la que se centrará este estudio.

Se presenta en varios productos vegetales, en cereales, café, cacao y frutos secos. También en productos elaborados a base de estos como vino, cerveza, pero además en algunos de origen animal como riñones de cerdo.

Estructuralmente, tiene la particularidad de contener un átomo de cloro.

Esta toxina presenta propiedades carcinógenas, nefrotóxicas, teratógenas, inmunotóxicas y neurotóxicas. Es el agente etiológico de la nefropatía porcina danesa y a veces se cita como el agente causal de los Balcanes endémicos.

Su contenido máximo se ha establecido para cereales y productos a base de ellos, uvas pasas, café, vino, zumo de uva, especias y alimentos para lactantes y niños de baja edad, grupo bastante vulnerable a esta exposición.

[Paterson *et al.* 2018; Remiro Íñigo 2011; Soriano del Castillo *et al.* 2007].

- **Esterigmatocistina (STE)**

Es una micotoxina producida por *A. versicolor*, aislada por primera vez en 1954. Es precursora de las AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>.

Se ha detectado en cereales, café, jamón, pimienta y queso, entre otros. Está relacionada con los carcinomas gástricos, hepáticos y esofágicos.

- **Ergocornina (Eco)**

Pertenece al grupo de los alcaloides ergóticos. Estos se conocen como alcaloides del cornezuelo del centeno. Se producen por hongos como *Hypocreales* y *Eurotiales*. Dentro del primero, *Claviceps purpúrea* es el hongo más extendido en Europa y éste afecta a centeno, cebada, trigo, avena, mijo y otros cereales.

Se han identificado más de 50 alcaloides ergóticos diferentes, que normalmente varían en cantidad y tipo según cepas de hongos y regiones geográficas. Este estudio sólo se centrará en la Ergocornina. [Arroyo Manzanares 2013].

En la figura 4 se muestran las estructuras de las diez micotoxinas que se han estudiado en este trabajo.

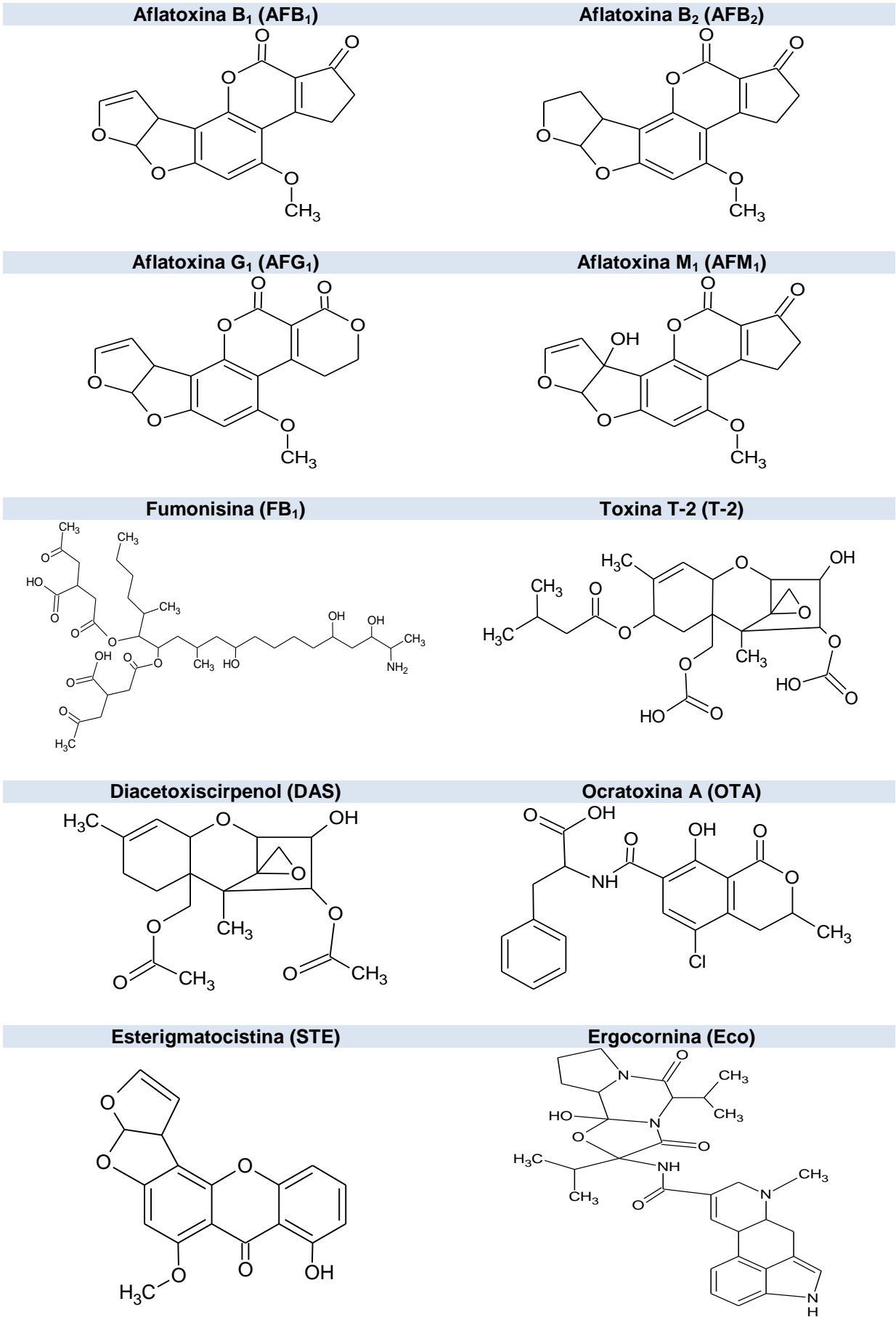


Figura 4. Estructuras de las micotoxinas estudiadas en este trabajo.

## 2.4. Antecedentes

Con anterioridad a este trabajo se pueden encontrar en bibliografía abundantes ejemplos de estudios representativos del uso de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) o Cromatografía Líquida de Ultra-Elevada Eficacia (UHPLC, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a Espectrometría de Masas tal y como puede observarse en la tabla 3.

Analito (Nº analitos)	Muestra	Tratamiento muestra	Cromatografía líquida	Técnica acoplada	Referencia
Micotoxinas (7)	Leche vaca	QuEChERS	UHPLC	QqQ	Sartori <i>et al.</i> 2015
Micotoxinas (14)	Leche vaca	Columna de inmovofinidad	UHPLC	Q-Orbitrap	Mao <i>et al.</i> 2018
Micotoxinas (9)	Vino	SPE	HPLC	TOF	Pérez Ortega <i>et al.</i> 2012
Micotoxinas (7)	Leche vegetal	Extracción L-L	UHPLC	QqQ	Hamed <i>et al.</i> 2017
Micotoxinas (25)	Cereales	QuEChERS	UHPLC	QqQ	Juan <i>et al.</i> 2001
Micotoxinas (9)	Cerveza	Desgasificación y filtración	HPLC	QTRAP	Peters <i>et al.</i> 2017
Micotoxinas (17)	Pan	Extracción en metanol con Ultra-Turrax	HPLC	QTRAP	Saladino <i>et al.</i> 2017
Micotoxinas (8)	Vino	QuEChERS	UHPLC	QqQ	Han <i>et al.</i> 2013
Micotoxinas (22)	Leche vaca	Extracción L-L	HPLC	QqQ	Flores Flores <i>et al.</i> 2018

Tabla 3. Metodologías desarrolladas para la detección de micotoxinas en alimentos.

## 2.5. Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas

### ❖ CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) es una técnica de separación en la que se utiliza una presión elevada para forzar al disolvente (fase móvil) a pasar por una columna (fase estacionaria) que contiene partículas muy finas (tamaño típico de 3-10  $\mu\text{m}$ ), que permite conseguir separaciones de gran resolución. Se emplea fundamentalmente para analizar compuestos polares no volátiles o termolábiles.

Un cromatógrafo de líquidos consta de depósitos para la fase móvil, un sistema de bombeo para proporcionar presión, un dispositivo para introducción de la muestra, una columna cromatográfica, un detector y un sistema para el tratamiento de datos llamado registrador. Algunos equipos incluyen un horno para controlar la temperatura de la columna. [Harris *et al.* 2007].

En la figura 5 se observan los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos.

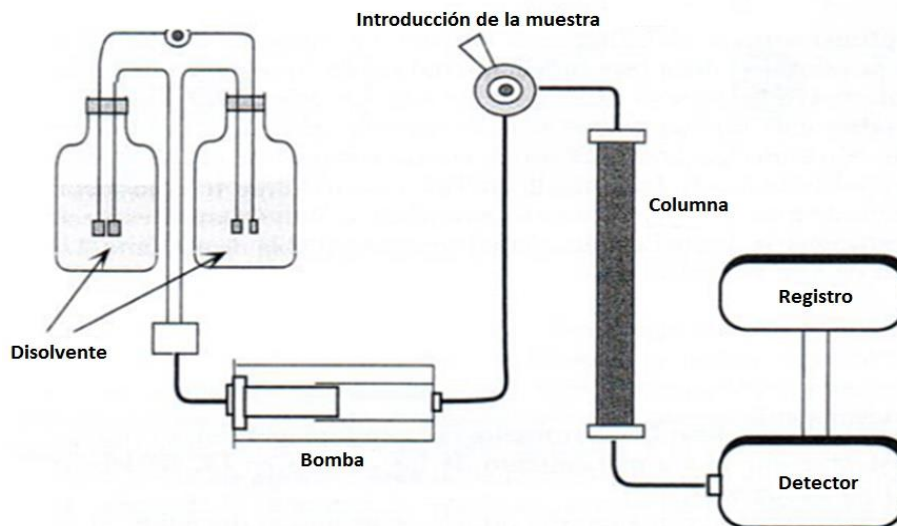


Figura 5. Componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos. [Hernández Hernández *et al.* 2002].

La separación de la mezcla se puede llevar a cabo mediante una elución isocrática, en la que la composición de la fase móvil es constante, o mediante elución por gradiente, donde la composición del disolvente varía durante el desarrollo del cromatograma. [Hernández Hernández *et al.* 2002].

La HPLC es una técnica fundamental para la mayoría de los laboratorios de ensayo. Se ha estado desarrollando continuamente y se ha conseguido una mejora en los métodos de análisis anteriores. [Moreno González 2013].

Recientemente, ha supuesto un avance introducir la Cromatografía de Ultra-Elevada Eficacia (UHPLC), no sólo por la rapidez en el análisis sino también por una consecuencia directa de este hecho como es un menor consumo de disolvente. Esto ha sido posible por el desarrollo de nuevas fases estacionarias de partícula híbrida, con un componente inorgánico y otro orgánico, y con un tamaño de partícula inferior a los 2  $\mu\text{m}$ , originando la UHPLC. Esta reducción del tamaño de partícula, disminuye la altura equivalente de plato teórico (HETP, *Height Equivalent Theoretical Plate*), lo que mejora la eficacia del proceso, con lo cual permite trabajar a caudales

más rápidos de fase móvil sin que pierda la calidad en la separación cromatográfica. [Arroyo Manzanares 2013].

Aunque el empleo de técnicas cromatográficas proporciona una gran ventaja para la determinación simultánea de varios contaminantes presentes en una muestra, si se utilizan como detectores los tradicionales como UV-visible, fluorescencia o captura electrónica se suelen obtener resultados con una gran incertidumbre, aumentando con esto el riesgo de falsos positivos y negativos. Es un problema serio puesto que un falso positivo puede derivar en la paralización de un cargamento de alimentos de manera errónea, y un falso negativo podría desembocar en que alimentos que no cumplen con la normativa lleguen al mercado con los consecuentes riesgos. La solución a este contratiempo ha sido el acoplamiento de espectrómetros de masas a los sistemas de separación cromatográfica, sobre todo el de alta resolución llamado tiempo de vuelo (TOF) y el sistema de espectrometría de masas en tándem triple cuadrupolo (QqQ), los cuales permiten identificar y cuantificar con una gran fiabilidad.

El acoplamiento de Cromatógrafo de Líquidos (LC)-Espectrómetro de Masas (MS) es complejo, pero últimamente se han logrado destacados avances de esta técnica que han permitido un gran desarrollo de la misma. Esto ha hecho posible una determinación rápida de sustancias más polares o termolábiles en los alimentos con bastante fiabilidad. [Romero González *et al.* 2007].

## ❖ ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas se basa en el hecho de que los iones originados en una fuente de ionización presentan diferente comportamiento al atravesar campos eléctricos y magnéticos: estos iones se separan en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y son detectados posteriormente.

Un espectrómetro de masas consta de una serie de componentes básicos que se nombran a continuación:

- Cámara de ionización o fuente de ionización: Es el lugar donde se generan los iones a partir de las sustancias químicas a analizar.
- Analizador: Importante componente que diferencia los iones que se generan en función de su relación  $m/z$ .

- Detector: Que amplifica la señal eléctrica para cada uno de los iones generados. [Romero González *et al.* 2007].

A continuación se describen los componentes básicos del espectrómetro de masas:

### • FUENTE DE IONIZACIÓN

La Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas ha solventado el gran problema de incompatibilidad entre ellas, debido a que la cromatografía trabaja con muestras líquidas y la espectrometría de masas con muestras en estado gaseoso. El gran desarrollo de esta técnica ha hecho posible su compatibilidad.

Se han desarrollado varias interfases que satisfacen este acoplamiento. Éstas son: el plasma de acoplamiento inductivo (empleada para átomos metálicos, siendo el uso en menor medida para no metálicos), bombardeo de átomos rápidos de flujo continuo, ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), electrospray asistido neumáticamente e ionización por electrospray o electronebulización (ESI). La última interfase nombrada es de las más empleadas y la utilizada para este trabajo. [Moreno González 2013].

La ESI ha revolucionado el campo de estos acoplamientos, para el análisis de moléculas cargadas, biomoléculas volátiles, no polares y térmicamente lábiles, en gran parte por su capacidad de formar iones mono- o multicargados. [Banerjee *et al.* 2012; Simó *et al.* 2005].

A continuación se describe el proceso de ionización del electrospray: entre el final del capilar de la fuente ESI y la entrada del espectrómetro de masas se establece una diferencia de potencial ( $\pm 1,5$  kV). Para la formación del electrospray intervienen diversos mecanismos (figura 6) y se lleva a cabo a presión atmosférica.

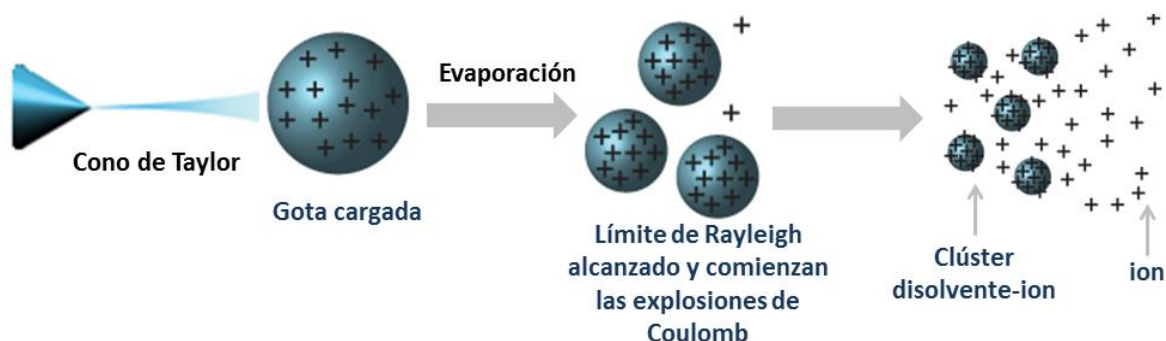


Figura 6. Esquema del proceso de formación del electrospray. [Moreno González 2013].

El primer paso para obtener iones aislados es la formación de un cono de líquido (cono de Taylor) en la punta de la aguja de la interfase como se observa en la figura

6 y desde ahí salen las gotas cargadas. Así la muestra se carga y se dispersa simultáneamente. En segundo lugar, el disolvente de la fase móvil se va evaporando gracias a un gas de secado, de esta manera aumenta la densidad de carga eléctrica dentro de las microgotas y los iones de la misma polaridad son atraídos hacia la superficie de ellas debido a la diferencia de potencial existente. Cuando la fuerza de repulsión de los iones del mismo signo son mayores que la tensión superficial que mantiene unidas las gotas de forma esférica (límite de Rayleigh) las gotas se van dividiendo en otras más pequeñas (explosiones de Coulomb) que seguirán sufriendo procesos de evaporación y explosión sucesivos hasta que se formen los iones cargados que entrarán en el analizador de masas. [Somsen *et al.* 2010].

- **ANALIZADOR**

Una vez que se ha producido la transferencia de los iones de la fase líquida procedente del capilar a la fase gaseosa, éstos se dirigen al analizador de masas.

Existen varios analizadores para MS: los cuadrupolos (Q), las trampas de iones (IT), los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) y sistemas híbridos como el Q-TOF. Los más utilizados son los Q y los IT, siendo los de cuadrupolo los de mayor uso debido a su gran robustez para análisis de rutina y a su bajo costo comparado con otros. [Moreno González 2013; Romero González *et al.* 2007].

Un analizador de cuadrupolo simple consiste en cuatro barras metálicas dispuestas paralelamente, conectadas dos a dos eléctricamente. Sobre estas barras se aplica un voltaje de compensación de corriente continua y un voltaje de radiofrecuencia. Los iones que se producen en la fuente de ionización se introducen en el analizador, en este caso en un campo cuadripolar mediante diferencia de potencial, con lo que estos empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. De esta manera, los iones describen una trayectoria que depende de su relación  $m/z$ . Los cuadrupolos tienen la capacidad de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación  $m/z$  concreta y llevarlos al detector, con lo cual los iones que contengan esa relación específica van a seguir una trayectoria estable que les dirigirá hacia el detector (iones resonantes representados en la figura 7 de color rojo), y el resto de iones presentarán una trayectoria, en este caso no estable, de tal manera que saldrán del cuadrupolo chocando con las barras metálicas, como se observa (color azul) en la figura 7, llamados iones no resonantes.

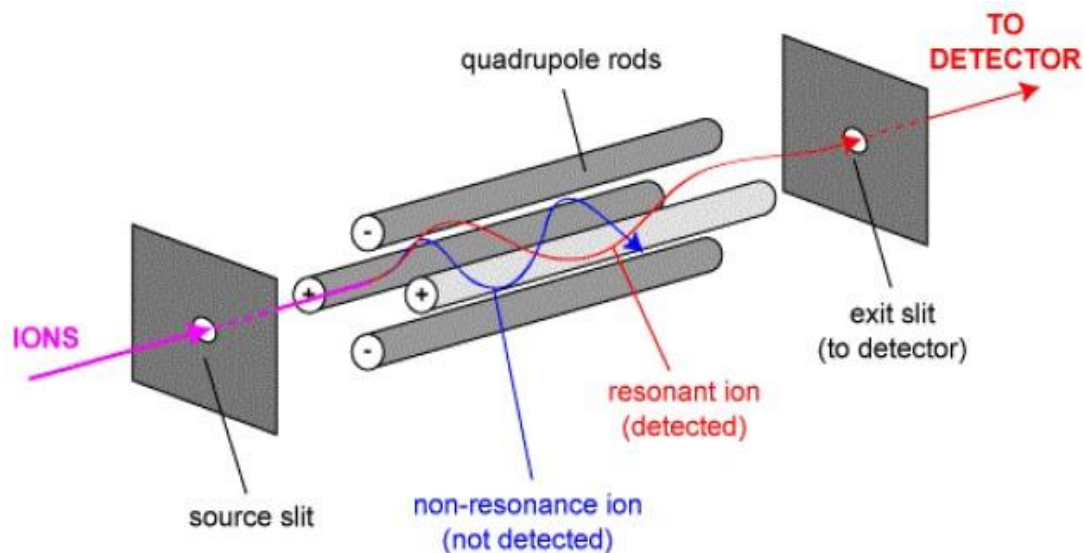


Figura 7. Trayectoria de los iones en un analizador de cuadrupolo. [Gates 2014].

La salida de los iones hacia el detector se realiza ordenadamente según la masa de los compuestos. Salen primero los compuestos con menor masa basándose en la Segunda Ley de Newton ( $F = m \cdot a$ ) puesto que al aplicar la misma fuerza para todos los iones, la aceleración será mayor cuanto menor sea su masa.

#### **-Sistemas de masas en tándem:**

Existen dos grandes grupos según los tipos de analizadores de masas involucrados.

1. **Espectrómetros de masas *tándem en tiempo (tandem-in-time)*.** Entre ellos se encuentran trampas de iones lineales y cuadrupolares, trampas orbitales (*orbitrap*) y FT-ICR-MS (*Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*). Los iones producidos en la región de ionización se atrapan, se aíslan, se fragmentan y luego se separan según su relación  $m/z$  en el mismo espacio físico. Permite un registro de iones producto sucesivos, lo que se conoce como masas a la "n",  $(MS)^n$ .
2. **Espectrómetros de masas *tándem en espacio (tandem-in-space)*.** En ellos, existen, como mínimo, dos analizadores separados en el espacio. Hace posible el estudio no sólo de iones-producto, sino también de iones-precursores, de las reacciones entre dos iones relacionados e incluso el monitoreo de la pérdida de un fragmento neutro. A este grupo pertenece el triple cuadrupolo, que es precisamente el usado en este trabajo, cuyo fundamento se describe en los siguientes párrafos.

## **Analizador Triple Cuadrupolo (QQQ o QqQ)**

La espectrometría de masas unidimensional, que tiene un solo analizador de masas, puede alcanzar su límite de resolución, de sensibilidad, de rango de masas, y sobre todo, de información que se requiera para conocer una estructura molecular.

Cuando los espectros de masas no tienen muchas señales, y además éstas están representadas por iones moleculares o iones clúster, pero no se registran iones-fragmento, es muy difícil establecer una estructura química de la molécula con fiabilidad. En muchas muestras se observa mucho ruido químico y esto hace complicado detectar e identificar los analitos de interés, más aún cuando la muestra posee muchas impurezas e interferencias.

De ahí la importancia de utilizar un sistema tándem como es MS/MS, triple cuadrupolo en este caso (QqQ).

El triple cuadrupolo consiste en tres cuadrupolos conectados en serie. El cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) consisten en dos analizadores de tipo cuadrupolo conectados en serie y el Q2 o celda de colisión, situado entre Q1 y Q3, en el que se aplica la energía de colisión para fragmentar los iones.

**Q1:** En el primer analizador de masas (MS1) se realiza un clean-up específico, ya que es capaz de distinguir, en una mezcla compleja, los iones propios del analito y los que provienen de las interferencias. Esto permitirá aumentar la relación señal/ruido (S/N) y registrar sólo las señales características del *analito-target*.

**Q2:** Celda de colisiones activadas: Es un dispositivo que se sitúa entre los dos analizadores, donde el ion seleccionado puede “activarse”, que significa que puede aumentar su energía interna para su disociación y formación de iones-fragmento (iones-producto), que son registrados en el analizador MS2. Es decir, este dispositivo provoca las disociaciones inducidas de iones estables.

**Q3:** El segundo analizador (MS2), en el que se registran sólo esas señales características del analito, permite obtener un espectro de masas del ion característico de ese *analito-target*.

En la figura 8 se puede observar un esquema del proceso de un analizador de triple cuadrupolo:



Figura 8. Esquema del proceso de analizador triple cuadrupolo. [Moreno González 2013].

Estos analizadores pueden trabajar en varios modos de adquisición:

1. **Barrido completo (*full scan*)** en el que los voltajes aplicados van a variar en función del tiempo para obtener un espectro de masas del compuesto. Esto da una idea muy precisa para la identidad del producto. El primer analizador MS1 (Q1) hace un barrido completo y registra espectros de masas de cada analito, se ionizan y se fragmentan en iones moleculares y sus iones-producto. Q2 y Q3 operan sólo en modo de transmisión de iones.
2. **Barrido de ion(es) seleccionado(s) (SIM, *Selected Ion Monitoring*)**. En este caso, el primer analizador MS1 sólo deja pasar un ion o varios iones seleccionados que sean típicos del analito-target que se busca. Q1 y Q2 sólo transmiten estos iones filtrados por el MS1. Como cada ion seleccionado se mide durante más tiempo, aproximadamente 50 ms en lugar de 50  $\mu$ s, el ruido químico se reduce y como consecuencia aumenta la relación S/N. Permite detectar analitos en cantidades del orden de pg o menos. Este modo se usa para el registro de un compuesto de interés presente en una muestra compleja, de manera que debe coincidir los tiempos de retención de este compuesto con los del compuesto-patrón certificado, además de la relación de abundancias.
3. **Barrido de ion-fragmento (*Product ion scan*)**. Consiste en la selección de un ion precursor o un ion-padre en el primer analizador MS1 (Q1), que opera en modo SIM. El ion-padre escogido se dirige a Q2 que no funciona como un filtro de masas sino como un sistema de transmisión de iones después de su activación, junto a la fragmentación. El gas de colisión (normalmente He, Ar o N<sub>2</sub>), les proporciona la energía adicional y un potencial químico aplicado en el

Q2 permite que los iones se aceleren y posean energía interna adicional. Esto conduce a los iones-fragmento que se dirigen al Q3. En este analizador Q3 se hace un barrido en el rango de masas  $m/z$  menores al ion-padre. Es el modo más utilizado en QqQ.

4. **Barrido de ion-precursor (*Parent ion scan*)**. Permite encontrar todos los iones precursores que pueden dar un ion-fragmento en un espectro de masas. El primer analizador (Q1) opera en modo de barrido completo desde la masa superior a la del ion-producto seleccionado. Estos iones atraviesan la celda de colisiones activadas, donde se fragmentan generando los iones-producto más otros. El tercero (Q3) opera en el régimen de monitoreo del ion seleccionado (SIM). El ion seleccionado es el ion-producto (daughter ion) y se buscan precisamente sus precursores.
5. **Barrido de fragmento neutro (*Constant neutral loss scan*)**. Ambos analizadores, Q1 y Q2, operan en modo de barrido (scan) simultáneo, enlazado (linked), pero se hace para iones con una diferencia fija correspondiente a la masa de un fragmento neutro seleccionado, es decir, sólo pasarán iones con una diferencia másica preestablecida ( $\Delta m$ ).
6. **Monitoreo de reacción múltiple (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*)**. Es un método de adquisición interesante, ya que puede convertirse en un detector de masas específico, altamente selectivo y sensible. Existe una probabilidad de que el ion seleccionado y una señal que proceda del ruido químico (fondo) coincidan. La consecuencia de ello es que baja la sensibilidad y el resultado es menos fiable (falsos positivos y falsos negativos). Para evitarlo, en lugar de monitorear iones característicos se registran las transiciones entre los pares de iones, precursor y producto. En Q1 se filtran iones precursores seleccionados en modo SIM y en Q3 se dejan pasar sólo iones-producto también operando en modo SIM. Esto anula casi completamente la probabilidad de que coincida con señales del fondo y así aumenta la relación S/N.

En este trabajo se ha operado en modo MRM.

#### **-MS/MS híbridas:**

Las configuraciones de MS/MS híbridas implican la combinación de varios analizadores de distinta naturaleza. Por ejemplo, un analizador de cuadrupolo (Q) o trampa de iones (IT) con uno de sector magnético (B) solo o en conjunto con un

analizador electrostático (E) o con uno de tiempo de vuelo (TOF). Esto da lugar a varios equipos tándem híbridos como Q-TOF, IT-TOF, E-B-E, Q-B-E, etc. [Moreno González 2013; Romero González *et al.* 2007; Stashenko *et al.* 2010; Yost *et al.* 1979].

- **DETECTOR**

La corriente eléctrica de estos iones que salen del analizador resonantes (corriente iónica parcial) se mide, normalmente, en un electromultiplicador. Ésta se amplifica y digitaliza para convertirse en una señal gráfica, en la intensidad o abundancia del ion-fragmento en un espectro de masas. La suma de todas las corrientes iónicas parciales obtenidas en función del tiempo dará otra gráfica en el cromatograma (corriente iónica total reconstruida), llamada TIC, *Total Ion Current*, por sus siglas en inglés. [Stashenko *et al.* 2010].

El detector utilizado en este estudio es el espectrómetro de masas mencionado en el apartado 4.3.

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar y validar una metodología para realizar un análisis residuo de un grupo de diez micotoxinas en alimentos mediante LC-MS/MS.

Los tres objetivos específicos que se persiguen son:

- 1) Poner a punto un método de análisis residuo de micotoxinas mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia (UHPLC) acoplada a un Espectrómetro de Masas con detector de Triple Cuadrupolo utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modo positivo.
- 2) Validar el método de análisis desarrollado.
- 3) Aplicar el método desarrollado y validado a muestras reales, estudiando la presencia de micotoxinas en muestras de alimentos, concretamente en este caso, vino y leche.

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1. Materiales y Reactivos

Los patrones estándar de los analitos que se determinaron fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.). A partir de disoluciones concentradas de éstos, de normalmente entre 100 y 500 mg/L, almacenadas en congelador a  $-18^{\circ}\text{C}$ , se preparó una disolución en metanol que contenía todos los analitos y en la que la concentración de cada uno en este mix era de 5 mg/L. Seguidamente, esta disolución se diluyó con MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v:v) hasta conseguir una concentración de 100 µg/L. A partir de esta última, se fueron preparando los niveles de la recta del calibrado estándar mediante diluciones sucesivas, ajustando la proporción de agua y metanol para que finalmente fuera de H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20, v:v). El metanol utilizado era de la casa comercial Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.). El agua utilizada fue de la casa comercial Merck Milipore (Milford, Massachusetts, EE.UU.).

Los niveles de las rectas de calibrado utilizadas en el estudio fueron, para todos los analitos, de: 0 µg/L (blanco), 0.001 µg/L, 0.01 µg/L, 0.1 µg/L, 1 µg/L y 10 µg/L como nivel máximo.

Para la extracción en fase sólida (SPE) se utilizaron cartuchos Oasis HLB 6 cc (200 mg) de la casa comercial Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EE.UU.).

Se usaron tubos de ensayo para recoger los extractos de leche, al igual que los de vino.

Se usaron también tubos Falcon de centrífuga de un volumen de 15 mL para realizar la dilución pertinente en el tratamiento de muestra.

Por último se utilizaron viales de vidrio de 1.5 mL de volumen para llevar a cabo el análisis mediante UHPLC-MS/MS.

Para las fases móviles se utilizó agua con un 0.1% de ácido fórmico y metanol también con un 0.1% de ácido fórmico. El ácido fórmico de la casa comercial Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.).

## 4.2. Tratamiento de Muestra

Para llevar a cabo la determinación de compuestos en alimentos se sigue el siguiente procedimiento: Tratamiento (etapa de clean-up opcional) → Extractos conteniendo los analitos → Separación (UHPLC) → Identificación y cuantificación (MS/MS).

El tratamiento de muestra es una etapa fundamental para la determinación de residuos de micotoxinas en alimentos. Tiene como objetivo: eliminar la mayor parte de interferentes en la matriz al objeto de aumentar la selectividad y poder extraer correctamente los analitos de estudio.

Las matrices utilizadas en este trabajo son vino y leche. Son matrices acuosas que no presentan especialmente problemas para este tratamiento de muestra, puesto que son líquidas.

La extracción en fase sólida es idónea para extracción de analitos presentes en muestras líquidas. El disolvente compite con los analitos por los sitios activos de adsorción del sorbente, esto quiere decir, que la elución es un desplazamiento del soluto a través del sorbente por la acción del eluyente. Así, cuanto mayor afinidad tengan los solutos por el eluyente, más fácil será la elución. Por esto es muy importante hacer una elección adecuada de los disolventes que se empleen.

Cada vez se utilizan más los cartuchos rellenos poliméricos con balance hidrofílico-lipofílico, de fase reversa, humectable en agua, conocidos como HLB, y son precisamente, los utilizados en este estudio. [Moreno González 2013].

En esta extracción en fase sólida, principalmente empleada para muestras líquidas, la muestra se pasa por un cartucho, el cual contiene un sorbente sólido, que hace que los analitos sean retenidos, para después ser eluidos con el disolvente adecuado.

El cartucho Oasis HLB utilizado es muy hidrofílico, humectable con agua con balance hidrofílico-lipofílico. De fase reversa, utilizado para analitos neutros, ácidos y básicos. [WATERS].

El procedimiento que se sigue para realizar SPE consta de 5 etapas:

Una primera etapa es de acondicionamiento del cartucho, la segunda para carga de la muestra, la tercera de lavado, la cuarta etapa de secado y la última etapa es la de elución.



Figura 9. Estructura del sorbente polimérico HLB. [WATERS].

Se describe a continuación las etapas seguidas en la práctica tanto para vino como para leche. El procedimiento fue el mismo:

1. **Acondicionamiento:** el sorbente del cartucho se acondiciona con disolvente de propiedades similares a la muestra. En este caso se añadieron 3 mL de metanol y seguidamente 3 mL de agua que actuaron por gravedad. El agua se añade en último lugar porque las matrices utilizadas son acuosas. Todo lo recogido en esta etapa fue a desecho.
2. **Carga de la muestra:** la muestra pasa por el sorbente donde quedan retenidos en el cartucho los analitos de interés, además de otros interferentes. En este estudio se añadió 3 mL de vino y 3 mL de leche para cada matriz, dejando que cayeran por gravedad. Igualmente en esta etapa lo eluido es desecho.
3. **Lavado:** para realizarlo correctamente en esta etapa se necesita pasar un disolvente o mezcla de disolventes que sean capaces de eliminar interferentes pero que no eluya los analitos de interés. Se añadieron 3 mL de una mezcla  $H_2O:MeOH$  (95:5, v:v) que cayó por gravedad. Lo recogido fue desecho.
4. **Secado:** es una fase opcional de la extracción en fase sólida. Las trazas del disolvente se eliminan haciendo pasar aire por el cartucho durante un tiempo determinado. En este caso se pasó aire ayudándose por una jeringa y un adaptador durante un tiempo de 2 minutos aproximadamente.
5. **Elución:** se pasa un disolvente apropiado para eluir los analitos de interés que se encuentran retenidos en el cartucho. Idealmente el disolvente debe tener la máxima interacción con los analitos y la mínima interacción con las demás impurezas para dejarlas retenidas en el sorbente. Se pasaron 3 mL de metanol a una velocidad de 1 mL/min, tardando en esta etapa un total de 3 min. El eluido se recogió en tubos de ensayo para su posterior tratamiento. Al añadir 3 mL de

metanol no se obtiene ninguna preconcentración, es decir, la concentración de los analitos es la misma en la muestra que en el extracto final de la SPE. Con todas estas etapas se tienen preparados los extractos de vino y de leche, en los que se encuentran los analitos ya aislados de la matriz. En la figura 10 se muestra un esquema del procedimiento.

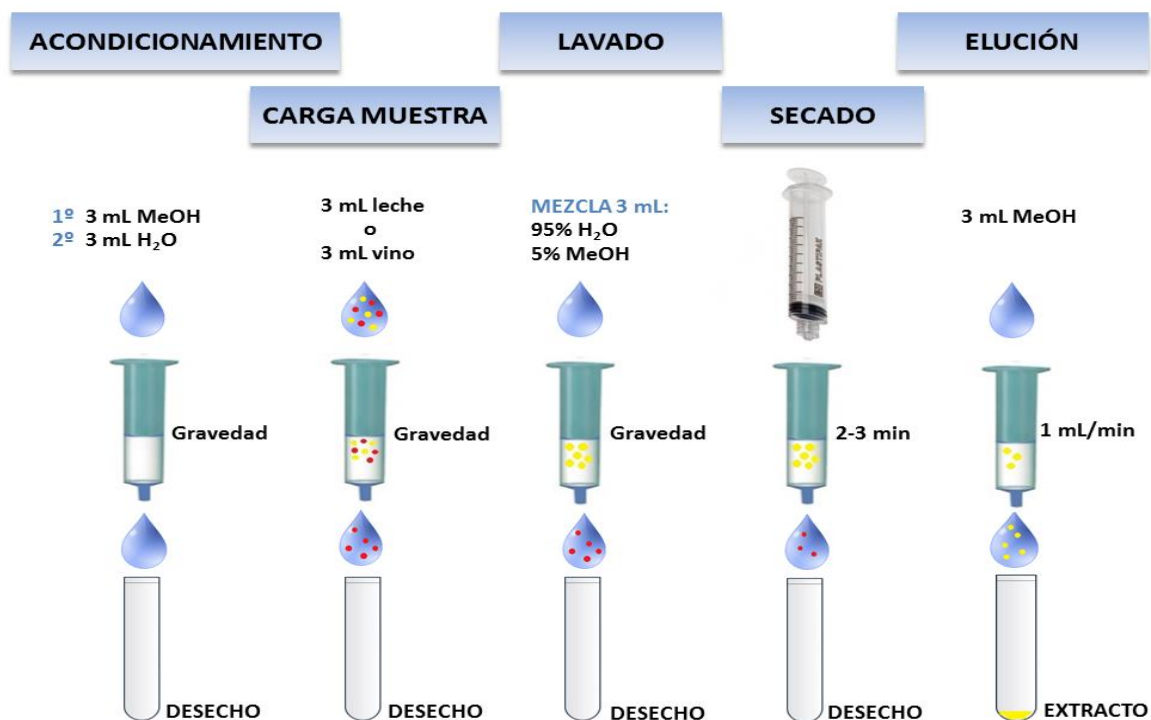


Figura 10. Extracción en fase sólida con Oasis HLB 6cc (200 mg).

### 4.3. Instrumentación

Para la separación, identificación y cuantificación de los analitos se utilizó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas. En concreto fue un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia, UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) acoplado a un Espectrómetro de Masas con detector de Triple Quadrupolo, TSQ Quantiva Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José, California, EE.UU.). El acoplamiento del cromatógrafo al espectrómetro de masas se hace

mediante una fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modo positivo.

Los parámetros de ionización fueron los siguientes: Voltaje del Capilar 3500 V, Sheath Gas 35 unidades arbitrarias, Aux Gas 10 unidades arbitrarias, Sweep Gas 0 unidades arbitrarias. La temperatura del Transfer Tube fue de 325°C y la Temperatura de Vaporización 275°C. Se trabajó con una anchura intermedia (0.7 una FWHM (*full-width at half maximum*)) de ventana de selección de valores de m/z de los iones precursores (Q1) y de iones producto (Q3).

La columna utilizada fue de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2.1 x 100 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.). Durante el análisis la temperatura de la columna fue de 25°C. La elución de los analitos se realizó en gradiente con un tiempo total de análisis de 10 minutos. El gradiente se detalla en la Tabla 4. Las fases móviles A y B fueron, respectivamente, agua con 0.1% de ácido fórmico y metanol con 0.1% de ácido fórmico. La composición inicial de la fase móvil fue del 5% de orgánico, en este caso metanol, la cual se mantuvo durante 6 minutos, tiempo en el cual la composición orgánica de la fase móvil alcanza 95% (valor máximo) y se mantiene durante medio minuto, con el objetivo de eluir todos los compuestos apolares que se encuentren retenidos en la columna; bajándose la concentración hasta 5% en el minuto 7, manteniéndose la condición inicial de 5% para orgánico durante los 3 minutos restantes, completando los 10 minutos totales de análisis, con el propósito de acondicionar la columna para el siguiente análisis. El flujo de la fase móvil se mantuvo constante en 0.2 mL/min. La inyección se hace de forma automatizada y el volumen de inyección fue de 10 µL.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% B (MeOH + 0.1% AF)
0.0	0.2	5.0
6.0	0.2	95.0
6.5	0.2	95.0
7.0	0.2	5.0
10.0	0.2	5.0

Tabla 4. Gradiente de elución.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Optimización del Método Cromatográfico

Antes de proceder a la separación cromatográfica de los analitos es necesario realizar una infusión en el espectrómetro de masas de cada uno de ellos por separado para su caracterización. Para la infusión se prepararon disoluciones individuales con metanol como disolvente de 1 mg/L a partir de las disoluciones concentradas (indicadas en el apartado 4.1) y éstas se inyectaron en el equipo. El objetivo de este procedimiento es caracterizar cada compuesto: se conoce así en cada caso la masa del ion-precursor formado en la ionización y los fragmentos que resultan en el análisis por espectrometría de masas/masas. En cada caso, el fragmento más intenso sirve para cuantificar y el segundo más intenso para confirmar que es el analito que se busca.

Una vez caracterizadas las micotoxinas en estudio se procedió a optimizar el método cromatográfico que hiciera posible una separación de los analitos, además de una buena resolución de los picos cromatográficos.

Se empleó la columna anteriormente mencionada Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD y se obtuvieron buenos resultados con ella, por lo que fue la columna empleada para todo el estudio.

Los disolventes de la fase móvil usada fueron agua y metanol. Los aditivos en las fases móviles son de gran importancia. Al hacer las infusiones se observó que el ion precursor en cada caso fue la molécula protonada ( $[M+H]^+$ ), con lo cual se necesitan fases móviles con compuestos de carácter ácido adicionados que sean capaces de donar protones a los analitos para originar los iones precursores en la fuente de ionización de electrospray (ESI). Se comenzó con 0.1% de ácido fórmico para cada analito y se observó que la separación y la resolución de los picos cromatográficos era la adecuada, como otros autores han descrito en estas condiciones. [Sun *et al.* 2016].

El volumen de inyección en primer lugar fue de 5  $\mu$ L (se probó con 5  $\mu$ L ya que un aumento excesivo del volumen de inyección puede provocar la saturación de la columna y que disminuya la eficacia de la separación). Los resultados mejoraron cuando terminó cambiándose a 10  $\mu$ L, valor que finalmente fue seleccionado.

En la tabla 5 se recogen los compuestos en estudio en este trabajo, mostrando en cada caso la masa del ion-precursor, la masa del fragmento más intenso, la masa del segundo fragmento más alto en intensidad y el tiempo de retención de cada analito.

En la figura 11 se muestra el cromatograma obtenido, en el que se indican los respectivos tiempos de retención ( $t_R$ ).

	Compuesto	Masa Ion Precursor (m/z)	Masa Fragmento Cuantificación (m/z)	Masa Fragmento Confirmación (m/z)	$t_R$ (min)
1	Aflatoxina B <sub>1</sub>	313.150	285.058	241.071	5.62
2	Aflatoxina B <sub>2</sub>	315.150	287.040	258.986	5.50
3	Aflatoxina G <sub>1</sub>	330.150	244.040	200.040	5.29
4	Aflatoxina M <sub>1</sub>	329.110	273.080	229.058	5.16
5	Ocratoxina A	404.130	239.000	358.040	6.72
6	Toxina T-2	489.212	245.111	387.111	6.36
7	Diacetoxiscirpenol	384.200	307.111	247.111	5.55
8	Fumonisina B <sub>1</sub>	722.390	334.262	352.262	5.94
9	Esterigmatocistina	325.120	281.071	310.000	6.93
10	Ergocornina	562.300	268.111	544.276	5.26

Tabla 5. Caracterización de los compuestos de estudio.

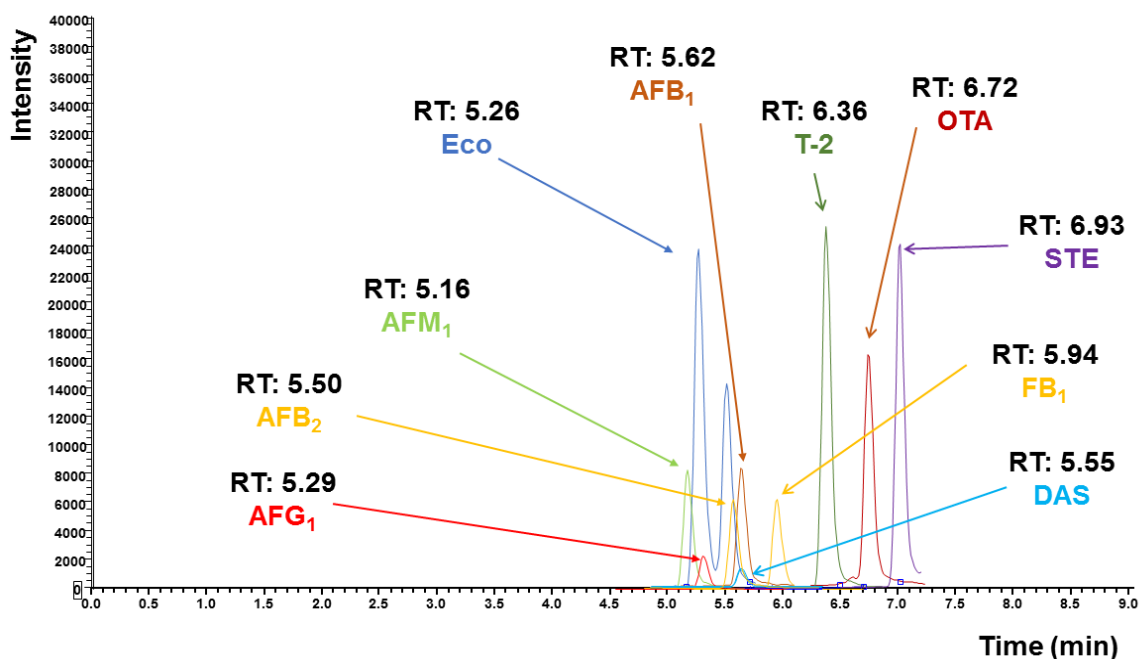


Figura 11. Cromatograma obtenido de todos los analitos.

## 5.2. Validación del método

La validación de un método analítico se define como el proceso que demuestra si los resultados producidos por él son fiables, si son reproducibles y si se puede utilizar para el fin que se propone.

Se tiene en cuenta la linealidad, la precisión del método (reproducibilidad usando la desviación estándar relativa, RSD en %), el límite de cuantificación (LOQ), el límite de detección (LOD) y el efecto matriz.

- **Linealidad**

Se estudiaron cinco niveles de concentración distintos (10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 µg/L) para calibración en disolvente y en cada muestra y se realizaron rectas de calibrado sobre las dos matrices, dado que se detectó efecto matriz en algunos casos, como se verá en el apartado correspondiente. Se representaron los valores del área de pico frente a la concentración. En la tabla 6 se puede observar el rango lineal junto con su coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ).

Compuesto	Rango lineal Disolvente	$r^2$ Disolvente	Rango lineal Vino	$r^2$ Vino	Rango lineal Leche	$r^2$ Leche
Aflatoxina B <sub>1</sub>	0.1-10	1.0000	0.1-10	1.0000	0.1-10	1.0000
Aflatoxina B <sub>2</sub>	0.1-10	1.0000	-	-	0.1-10	1.0000
Aflatoxina G <sub>1</sub>	0.1-10	1.0000	0.1-10	1.0000	0.1-10	1.0000
Aflatoxina M <sub>1</sub>	0.01-10	0.9999	0.1-10	1.0000	0.01-10	1.0000
Ocratoxina A	0.1-10	0.9999	0.1-10	0.9999	0.1-10	0.9999
Toxina T-2	0.01-10	0.9999	0.01-10	1.0000	0.01-10	1.0000
Diacetoxiscirpenol	0.1-10	1.0000	0.1-10	1.0000	0.1-10	1.0000
Fumonisina B <sub>1</sub>	0.01-10	0.9998	0.01-10	0.9999	0.01-10	0.9999
Esterigmatocistina	0.01-10	1.0000	0.1-10	1.0000	0.01-10	1.0000
Ergocornina	0.01-10	1.0000	0.1-10	0.9999	0.1-10	1.0000

Tabla 6. Rango lineal (µg/L) y coeficiente de regresión lineal para cada micotoxina en estudio.

La linealidad obtenida es perfecta a tenor de los valores obtenidos para los coeficientes de regresión.

Para la aflatoxina B<sub>2</sub> en vino no fue posible obtener una recta de calibrado válida debido a las interferencias del efecto matriz, con lo cual, los demás parámetros no se van a considerar para vino.

- **Reproducibilidad**

Este parámetro evalúa la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, un mismo aparato y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en el mismo día.

Se hicieron 10 inyecciones sucesivas del nivel 1 µg/L de la curva de calibrado estándar, calibrado matriz de vino y calibrado matriz de leche (n=10).

De los 10 datos obtenidos para cada analito se obtuvo la media y se calculó la desviación estándar relativa (RSD, %), de la siguiente forma:

$$RSD (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$$

El valor de RSD (%) para todos los compuestos estudiados tanto para los estándares, como para los dos alimentos, vino y leche, se encuentran recogidos en la tabla 7.

Compuesto	RSD (%) Estándar	RSD (%) Vino	RSD (%) Leche
Aflatoxina B <sub>1</sub>	6.47	4.09	3.78
Aflatoxina B <sub>2</sub>	5.65	-	3.69
Aflatoxina G <sub>1</sub>	5.70	3.99	4.33
Aflatoxina M <sub>1</sub>	4.01	1.53	2.41
Ocratoxina A	5.56	5.83	2.10
Toxina T-2	2.44	2.17	2.45
Diacetoxiscirpenol	9.11	5.17	6.35
Fumonisina B <sub>1</sub>	2.75	2.61	3.31
Esterigmatocistina	3.80	5.61	0.92
Ergocornina	1.71	2.21	2.22

Tabla 7. Reproducibilidad para todos los compuestos estudiados.

Según las cifras, se observa que existe una buena reproducibilidad con valores de RSD que en general están por debajo del 5%. Esto quiere decir que la dispersión entre los resultados de las medidas repetidas es pequeña y los valores del RSD son muy aceptables.

- **Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)**

Se define el Límite de Detección (LOD) como la mínima concentración de analito que proporciona una señal que puede ser distinguida del ruido de fondo. Éste es tres veces la relación señal/ruido (S/N).

Se define al Límite de Cuantificación (LOQ) como la menor concentración de analito que puede cuantificarse de manera fiable. Éste es diez veces la relación S/N.

El cálculo de estos parámetros se realizó a través del software Xcalibur mediante el valor de la relación S/N y los resultados, expresados en µg/L están recogidos en la tabla 8 junto con los MRLs establecidos por la legislación vigente para cada analito en las matrices de vino y de leche. [Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión].

Compuesto	LOD vino (µg/L)	LOQ vino (µg/L)	MRL vino (µg/L)	LOD leche (µg/L)	LOQ leche (µg/L)	MRL leche (µg/L)
Aflatoxina B <sub>1</sub>	0.019	0.063	-	0.008	0.026	-
Aflatoxina B <sub>2</sub>	-	-	-	0.006	0.020	-
Aflatoxina G <sub>1</sub>	0.001	0.003	-	0.015	0.050	-
Aflatoxina M <sub>1</sub>	0.014	0.048	-	0.002	0.007	0.050
Ocratoxina A	0.007	0.022	2.0	0.005	0.017	-
Toxina T-2	0.002	0.005	-	0.001	0.004	-
Diacetoxiscirpenol	0.015	0.050	-	0.013	0.042	-
Fumonisina B <sub>1</sub>	0.001	0.002	-	0.001	0.002	-
Esterigmatocistina	0.001	0.002	-	0.000	0.002	-
Ergocornina	0.010	0.033	-	0.006	0.020	-

Tabla 8. Parámetros analíticos del método (LOD y LOQ) para vino y para leche. (\*)

(\*): No se encuentran valores regulados para vino y para leche de las demás micotoxinas, siendo las que sí tienen establecido dicho límite, las más importantes para cada matriz: la ocratoxina A para vino y la aflatoxina M<sub>1</sub> para leche.

Puede observarse como el LOQ para ocratoxina A y para aflatoxina M<sub>1</sub> son muy inferiores a los MRLs establecidos en la legislación vigente, por lo que el método desarrollado es apto para alcanzar los niveles de concentración exigidos. [Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión].

- **Efecto matriz**

Es una perturbación de la señal analítica como consecuencia de la presencia de otros componentes en la muestra distintos al analito. Se puede apreciar un aumento (efecto matriz positivo) o una disminución de la señal analítica (efecto matriz negativo). En análisis de matrices complejas esto es debido a la coelución de otros compuestos presentes en la matriz con el analito en cuestión, por lo que la señal en las matrices, en este caso vino y leche, serán distintas a la señal del analito en disolvente puro. El efecto matriz es una de las mayores fuentes de interferentes en

el análisis de trazas en alimentos y esto provoca un error sistemático importante. Es de interés, por tanto, evaluar este efecto en el presente estudio.

Para evaluar el efecto matriz se compara la pendiente de una recta de calibrado estándar (analitos en disolvente) con la pendiente de una recta de calibrado (analitos en presencia de matriz), de la siguiente forma:

$$\text{Efecto matriz (\%)} = \left( \frac{\text{pendiente calibrado matriz}}{\text{pendiente calibrado estándar}} - 1 \right) \cdot 100$$

Cuando el efecto matriz se encuentra entre 10-20%, se considera que existe un efecto matriz suave, si está entre 20-50% se dice que existe efecto matriz medio y cuando está por encima del 50% se considera que el efecto matriz es fuerte.

Para la evaluación del efecto matriz en vino se recogió el extracto obtenido en el tratamiento de muestra (extracción en fase sólida) y se diluyó a 1:10 manteniendo la proporción de disolvente de H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20, v:v). Este extracto de vino fue dopado con los analitos en concentraciones de 0.001 µg/L, 0.01µg/L, 0.1 µg/L, 1 µg/L y 10 µg/L, manteniendo también la proporción de disolvente utilizada. Además, se preparó una curva de calibrado utilizando las mismas concentraciones de analitos de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 µg/L, pero sin extracto de vino, solamente en disolvente, respetando la proporción del disolvente de igual forma.

El mismo procedimiento fue seguido para la leche, pero realizando la curva de calibrado matriz con el extracto de leche obtenido en el tratamiento de muestra.

Después de realizar el análisis cromatográfico para la curva estándar, para la curva matriz de vino y la curva matriz de leche, se obtuvieron las pendientes de cada curva para cada analito y se compararon mediante la fórmula para el efecto matriz. Se pueden observar los resultados tanto para vino como para leche en la tabla 9.

A partir de estos resultados, se puede ver como existe un efecto matriz fuerte para la esterigmatocistina en vino. Para la aflatoxina B<sub>1</sub>, la aflatoxina G<sub>1</sub> y la ergocornina existe un efecto matriz medio en el vino. Los demás analitos sufren un efecto matriz tan suave que no merece la pena tenerlo en consideración. Cabe destacar que la esterigmatocistina presenta para el vino fuerte efecto matriz y sin embargo carece del mismo en leche, en la cual, ningún analito sufre efecto matriz digno de consideración.

Compuesto	Efecto Matriz Vino (%)	Efecto Matriz Leche (%)
Aflatoxina B <sub>1</sub>	-40.79	-1.04
Aflatoxina B <sub>2</sub>	-	-1.42
Aflatoxina G <sub>1</sub>	-44.43	1.40
Aflatoxina M <sub>1</sub>	-15.04	1.53
Ocratoxina A	-2.14	0.98
Toxina T-2	-18.23	-5.48
Diacetoxiscirpenol	5.97	-2.60
Fumonisina B <sub>1</sub>	6.42	4.21
Esterigmatocistina	-50.00	0
Ergocornina	-27.21	-8.89

Tabla 9. Efecto matriz calculado para cada compuesto.

### 5.3. Aplicación al estudio de muestras reales

Por último, se procedió a la aplicación del método al análisis de muestras reales. Se realizó un estudio de residuos de micotoxinas en muestras reales de vino y de leche de vaca, obtenidas de supermercados locales. Se adquirieron distintas marcas (normalmente blancas a excepción de algunas tradicionales que también fueron incluidas en el estudio). En el caso de la leche se incluye leche entera, semidesnatada y desnatada, con distinto contenido graso, además de incluir leche sin lactosa o enriquecida con nueces.

En la tabla 10 se detalla la relación de marcas de vino y leche utilizadas, así como el número de muestra asignado a cada una. Así, por ejemplo, tanto al vino Don Simón Cabernet Sauvignon como a la leche entera Hacendado le corresponderán el número de muestra asignado 1, distinguiéndose entre ambas como V1 y L1, respectivamente.

Como se refleja en la tabla se estudiaron 5 muestras distintas de vino y 11 de leche. Cada una de las muestras fue sometida al tratamiento de extracción en fase sólida descrito con cartuchos Oasis HLB 6 cc (200 mg). Los extractos obtenidos se diluyeron 1:10 manteniendo la composición inicial del disolvente H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20, v:v). Se analizó mediante el método desarrollado por UHPLC-MS/MS (QqQ) referido en la sección 4.3.

Nº muestra asignado	Marca Vino	Marca Leche
1	Don Simón Cabernet Sauvignon	Hacendado Entera
2	Castillo de Velasco	Hacendado Sin Lactosa Semidesnatada
3	Carrefour (Vino de la Tierra de Extremadura)	Milsani Entera
4	Bonus	Eliges Entera
5	Covirán	Carrefour Entera
6	-	Covirán Entera
7	-	Adarve Semidesnatada
8	-	Puleva Omega 3 Nueces
9	-	Xoia Entera
10	-	Día Desnatada
11	-	Día Entera

Tabla 10. Relación de marcas de vino y leche utilizadas.

ANALITOS										
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFM <sub>1</sub>	OTA	T-2	DAS	FB <sub>1</sub>	STE	Eco
<b>VINO</b>										
1	-	-	-	-	-	0.290	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	0.280	-	0.280	-	-
3	-	-	-	-	-	0.280	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	0.300	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	0.290	-	-	-	-
<b>LECHE</b>										
1	-	-	-	-	-	0.280	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	0.240	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	0.260	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	0.250	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	0.350	0.440	-	-	0.470
6	-	-	-	-	-	0.280	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	0.290	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	0.270	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	0.280	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	0.250	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	0.280	-	-	-	-

Tabla 11. Concentración de los analitos positivos encontrados en vino y en leche en µg/L.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se aplicaron los criterios de identificación y cuantificación descritos anteriormente. Así, para cada caso se tuvo en cuenta el tiempo de retención de cada analito y, además, es necesaria la presencia de los fragmentos de cuantificación y de confirmación y su relación de intensidades.

Teniendo en cuenta estos aspectos se encontraron los positivos mostrados en la tabla 11, donde se recoge la concentración encontrada para cada uno de ellos a partir de las rectas de calibración y teniendo en cuenta la dilución del extracto.

En todas las muestras se ha encontrado la micotoxina T-2, pero a muy bajos niveles (máximos valores de 0.300 µg/L en vino y 0.350 µg/L en leche). Por otro lado, se encuentran como máximo dos micotoxinas en una misma muestra de vino (V2) y tres en una de leche (L5). También en estos casos las concentraciones se mantienen en valores muy bajos (<0.500 µg/L).

Como ejemplo de resultado positivo, se muestra en la figura 12, el pico correspondiente al diacetoxiscirpenol (DAS) ( $t_R = 5.52$  min) para la muestra de leche L5 y el espectro de masas del ion precursor ( $m/z = 384.200$ ), con los dos fragmentos respectivos: el fragmento de cuantificación (de mayor intensidad, con  $m/z = 307.11$ ), el de confirmación ( $m/z = 247.11$ ), datos que coinciden como puede apreciarse con los del patrón DAS, lo que confirma su presencia en la muestra.

## 6. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Grado se ha desarrollado una metodología completa para la detección y cuantificación de diez residuos de micotoxinas en vino y en leche y se han conseguido los objetivos concretos que se pretendían:

- 1) Se ha desarrollado y validado un método analítico UHPLC-MS/MS para determinar residuos de micotoxinas en estas dos matrices. La utilización de este equipo cromatográfico de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem (QqQ) hace posible la detección y cuantificación de estos compuestos, a niveles de varias unidades o decenas de ng/L.
- 2) Previamente se optimizó un método de tratamiento de las muestras para extracción de los analitos basado en extracción en fase sólida.

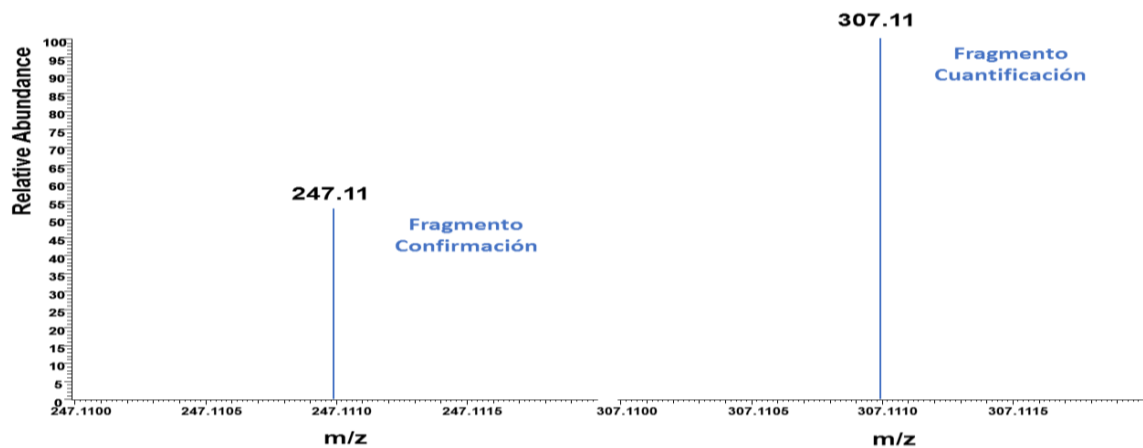
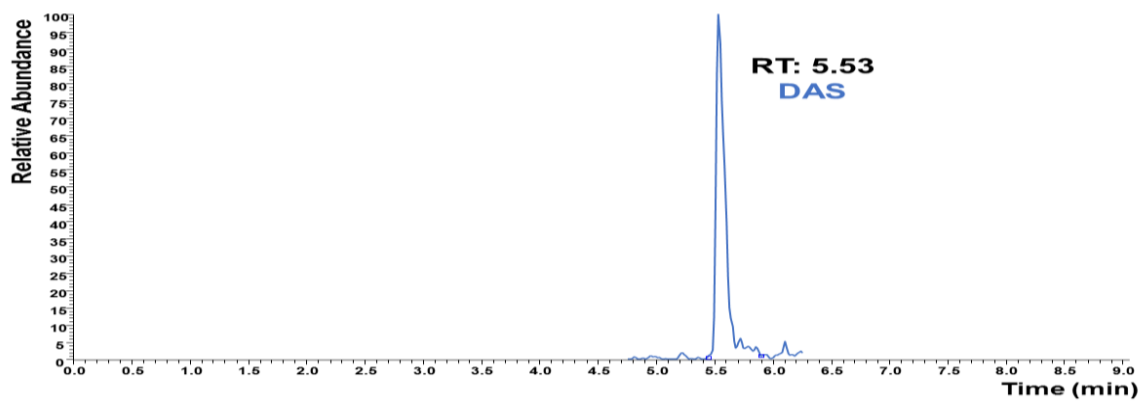


Figura 12-A. Cromatograma y espectro de masas del patrón DAS.

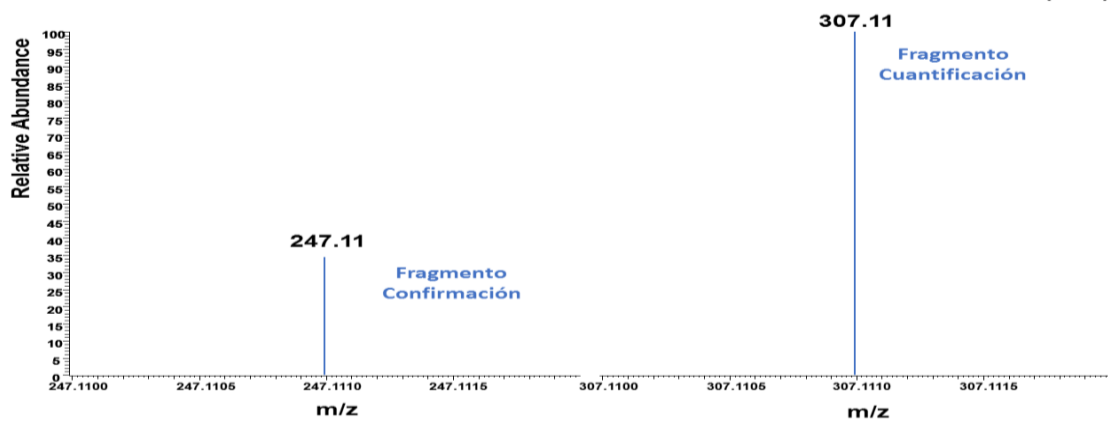
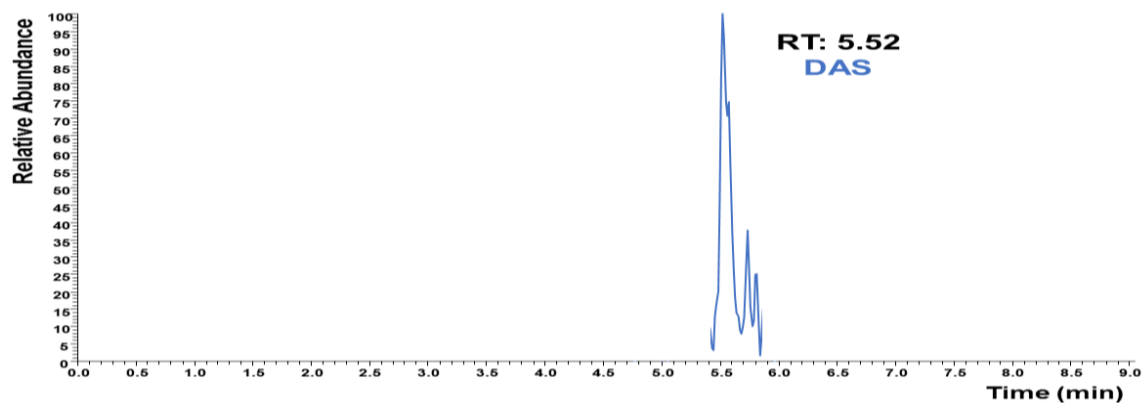


Figura 12-B. Cromatograma y espectro de masas de la muestra de leche L5 para DAS.

3) Con el método desarrollado se han analizado diferentes muestras de vino y leche presentes en los supermercados. Los resultados indican que todas las muestras, tanto de vino como de leche, dan positivo en T-2, pero a niveles tan bajos que no son preocupantes para la salud humana. La muestra de vino V2 dio positivo, además, para la micotoxina FB<sub>1</sub>; y para la muestra de leche L5 los resultados positivos, además de T-2, son los de DAS y Eco, pero también se encuentran a niveles tan bajos que no cabe esperar que representen peligro para el consumidor.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AECOSAN: Seguridad Alimentaria. Micotoxinas.  
([http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm)).
- Andersen, B.; Smedsgaard, J.; Frisvad, J. C. (2004). *Penicillium expansum: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products*. J. Agric. Food Chem. 52, 2421.
- Arroyo Manzanares, N. (2013) *Micotoxinas: Aproximaciones Analíticas y Metabólicas*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Banerjee, S.; Mazumdar, S. (2012). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: a Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*. Intern. J. Anal. Chem. Article ID 282574.
- Carlile, M. J.; Watkinson, S. C.; Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. Academia Press. 2ª Ed. Londres, Reino Unido. p. 11.
- EFSA Journal (2012): *Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed*. European Food Safety Authority J. 10, 2605.
- ELIKA (2005): *Aflatoxina M<sub>1</sub> en leche*. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria.  
(<http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo10/AFLATOXINA%20M1%20LECHE.pdf>)
- FAO Nutrición: (<http://www.fao.org/nutrition/es/>);  
Portal lácteo (<http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>);

Infografía: La leche en cifras.

(<http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/273897/>).

- FAO (2011). *Seguridad Alimentaria y Nutricional*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 3, 2–8. (<http://www.fao.org/3/a-at772s.pdf>).
- FAO-ONU. (2004). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones*. Estudio FAO. Alimentación Y Nutrición, 45.
- Faustman, E. M.; Ommenn, F. S. (2005). *Fundamentos de Toxicología*. McGraw Hill Interamericana. Madrid. p. 50.
- Flores Flores, M. E.; González-Peñas, E. (2018). *Short communication: Analysis of mycotoxins in Spanish milk*. J. Dairy Sci. 101, 113.
- FOOD SAFETY MAGAZINE (2011): Chemical Contamination. October/November. (<https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/octobernovember-2011/chemical-contaminants-preparing-for-the-unexpected/>).
- Gates, P. (2014). *Quadrupole Mass Analysis*. University of Bristol. School of Chemistry. Mass Spectrometry facility. (<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml>).
- Gómez Bravo, C.; Rivera Chacón, R. (2018). *Control de micotoxinas en la alimentación del vacuno lechero*. Actualidad Ganadera. (<http://www.actualidadganadera.com/articulos/micotoxinas-en-la-alimentacion-del-vacuno-lechero.html>).
- Hamed, A. M.; Arroyo Manzanares, N.; García Campaña, A. M.; Gámiz Gracia, L. (2017). *Determination of Fusarium toxins in functional vegetable milks applying salting-out-assisted liquid–liquid extraction combined with ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 34, 2033.
- Han, S.; Liu, Y.; Wang, P.; Wang, J. (2013). *Simultaneous and Sensitive Determination of Multiple Mycotoxins in Wines by UHPLC Triple Quadrupole Mass*. (<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-3337EN.pdf>)
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis*. 7ª Ed. W. H. Freeman and Company. New York. 42.
- Hernández Hernández, L.; González Pérez, C. (2002). *Introducción al análisis instrumental*. 1ª Ed. Ariel. Barcelona.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. Mycotoxins classification. (<http://www.iarc.fr>).

- Juan, C.; Soriano, J. M.; Burdaspal, P. (2001). *Micotoxinas en alimentos*. Díaz Santos. Madrid. p. 167.
- Katerere, D. R.; Stockenström, S.; Shephard, G. S. (2008). *HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings*. Food Control. 19, 389.
- Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria. Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas, 12-1-2000. COM (1999) 719 final.
- Mao, J.; Zheng, N.; Wen, F.; Guo, L.; Fu, C.; Ouyang, H.; Lei, S. (2018). *Multi-mycotoxins analysis in raw milk by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry*. Food Control. 84, 305.
- Martínez Larrañaga, R. M.; Anadón, A. (2006). *Toxicología Alimentaria*. Díaz de Santos. Madrid. p. 289.
- Martínez Miranda, M. M.; Vargas del Río, L. M.; Gómez Quintero, V. M. (2013). *Aflatoxinas: Incidencia, Impactos en la salud, Control y Prevención*. Biosalud. 12, 89.
- Moreno González, D. (2013) *Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de carbamatos en alimentos y aguas*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Murillo, M.; González Peñas, E.; Amézqueta, S. (2008). *Determination of patulin in commercial apple juice by micellar electrokinetic chromatography*. Food Chem. Toxicol. 46, 57.
- Paterson, R. R. M.; Venâncio, A.; Lima, N.; Guilloux Bénatier, M.; Rousseaux, S. (2018). *Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine*. Food Res. Int. 103, 478.
- Pérez Ortega, P. (2015). *Desarrollo de bases de datos de masas exactas de iones para el control exhaustivo y automatizado de contaminantes en alimentos mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de alta resolución*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Pérez Ortega, P.; Gilbert López, B.; García Reyes, J. F.; Ramos Martos, N.; Molina Díaz, A. (2012). *Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A. 1249, 32.
- Peters, J.; Van Dam, R.; Van Doorn, R.; Katerere, D.; Berthiller, F.; Haasnoot, W.; Nielen, M. W. F. (2017). *Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer*. PLOS ONE. 12, 1.

- Real Decreto 475/1988, de 13 de Mayo de 1988, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en alimentos para consumo humano. "BOE" nº 121, de 20 de mayo de 1988, páginas 15329 a 15329.
- Reglamento 178/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. "DOCE" nº 31, de 1 de febrero de 2002, páginas 1 a 24.
- Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 364/5.
- Remiro Íñigo, R. (2011). *Incidencia y niveles de ocratoxina A y cinco análogos en vino tinto*. Tesis doctoral. Universidad de Navarra.
- Rodríguez Carrasco, Y.; Ruiz, M. J.; Font, G.; Berrada, H. (2013). *Exposure estimates to Fusarium mycotoxins through cereals intake*. *Chemosphere*. 93, 2297.
- Romero González, R.; Fernández Moreno, J. L.; Plaza Bolaños, P.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L. (2007). *Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria*. *Rev. Esp. Salud Public.* 81, 5.
- Samsudin, N. I.; Abdullah, N. (2013). *A preliminary survey on the occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins contaminating red rice at consumer level in Selangor, Malaysia*. *Mycotoxin. Res.* 29, 89.
- Saladino, F.; Quiles, J. M.; Mañes, J.; Fernández Franzón, M.; Luciano, F. B.; Meca, G. (2017). *Dietary exposure to mycotoxins through the consumption of commercial bread loaf in Valencia, Spain*. *Food Sci. Tech.* 75, 697.
- Simó, C.; Cifuentes, A. (2005). *Electroforesis capilar: aproximación según la técnica de detección*. 1ª Ed. Universidad de Granada.
- Sartori, A. V.; Swensson de Mattos, J.; de Moraes, M. H. P.; Da Nóbrega, A. W. (2015). *Determination of Aflatoxins M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. *Food Anal. Method.* 8, 2321.
- Somsen, G. W.; Mol, R.; De Jong, G. J. (2010). *On-line coupling of electrokinetic chromatography and mass spectrometry*. *J. Chromatogr.* 1217, 3978.

- Soriano del Castillo, J. M. et al. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. España.
- Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. (2010). *GC-MS: más de un analizador de masas, ¿para qué?* Scientia Chromatogr. 2, 23.
- Sun, J.; Zhang, Y.; Hu, X.; Wu, L.; Wang, B. (2016). *QuEChERS Purification combined with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Quantification of 25 Mycotoxins in Cereals*. Toxins. 8, 375.
- Víctor Ortega, M. D.; Lara, F. J.; García Campaña, A. M.; Del Olmo Iruela, M. (2013). *Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of patulin in apple juices using micellar electrokinetic capillary chromatography*. Food Control 31, 353.
- WATERS casa comercial. ([http://www.waters.com/waters/es\\_ES/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=es\\_ES](http://www.waters.com/waters/es_ES/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=es_ES)).
- Yost, R. A.; Enke, C. G. (1979). *Triple Quadrupole Mass Spectrometry*. Anal. Chem. 51, 1251A.