

# Control de micotoxinas en alimentos

NATALIA ARROYO-MANZANARES, JOSÉ F. HUERTAS-PÉREZ, LAURA GÁMIZ-GRACIA  
y ANA M. GARCÍA-CAMPAÑA\*

UNIVERSIDAD DE GRANADA, Departamento de Química Analítica, Grupo de Investigación  
FQM-302-Calidad en Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica  
([www.ugr.es/~fqm302/](http://www.ugr.es/~fqm302/)), Campus de Fuentenueva s/n, 18071 Granada  
E-mail: [amgarcia@ugr.es](mailto:amgarcia@ugr.es)

## 1. Introducción

Las alarmas alimentarias en Europa han generado un gran interés y preocupación en los consumidores respecto a los productos y su suministro, siendo cada vez más necesario el establecimiento de medidas adecuadas de control que garanticen un consumo seguro del alimento. En la Unión Europea (EU) se han implantado estrategias prioritarias para asegurar la inocuidad de los alimentos, recogidas en el Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria [1].

El Libro Blanco establece que el análisis del riesgo debe ser la base política de la seguridad alimentaria, mediante sus tres componentes: evaluación del riesgo (asesoramiento científico y análisis de datos), gestión del riesgo (reglamentación y control) y comunicación del riesgo. Los alimentos pueden contener organismos o sustancias peligrosas, que formen parte del mismo o hayan sido introducidas durante las operaciones de procesamiento, que se denominan **agentes químicos de riesgo**. Su presencia puede deberse a, entre otras causas, residuos procedentes de la adición intencionada de sustancias (como los plaguicidas, los medicamentos veterinarios y otros productos utilizados en la producción primaria) o sustancias tóxicas presentes naturalmente en los alimentos (como las **micotoxinas**). Las **micotoxinas** son metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos por ciertos hongos que se desarrollan en productos agrícolas y cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reducen la actividad, hacen enfermar o

incluso causan la muerte de animales y personas [2].

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que las micotoxinas afectan a una cuarta parte de los cultivos a nivel mundial, incluyendo alimentos básicos, piensos o cultivos de gran valor como el café. Según datos publicados por el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) [3], las micotoxinas son las sustancias tóxicas o contaminantes que mayor número de notificaciones presentan, seguidos por los de origen biológico y los plaguicidas. Esto ocasiona importantes pérdidas económicas debido a sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. En los países en desarrollo, donde los alimentos básicos (como el maíz y frutos secos) son susceptibles de contaminación, la población puede verse también afectada de forma significativa por la morbilidad y las muertes prematuras relacionadas con las micotoxinas si no se toman medidas.

En la actualidad hay más de 300 micotoxinas conocidas de muy diferentes estructuras químicas y diferentes modos de acción en los seres vivos, siendo las más importantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria las toxinas producidas por mohos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, entre las que se encuentran las aflatoxinas, ocratoxina A, las fumonisinas y los tricotecenos. En la **Tabla 1** se encuentra una clasificación de los distintos tipos de micotoxinas en función del hongo productor y del alimento en el que su aparición es frecuente.

**Tabla 1.** Principales tipos de micotoxinas, hongo productor y alimentos afectados

Tipo de hongo	Micotoxinas producidas	Alimentos afectados
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Maíz, sorgo, arroz, trigo, semillas oleaginosas, especias y frutos secos (almendras, pistacho, nuez, coco, nuez de Brasil, etc.)
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>	Idem
Metabolito de aflatoxina B1 en mamíferos	Aflatoxina M <sub>1</sub>	Leche y productos lácteos
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxinas T-2 y HT-2	Cereales y derivados
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol (o nivalenol) Zearalenona	Cereales y derivados
<i>Fusarium moniliforme</i> ( <i>F. verticillioides</i> )	Fumonisinias B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>	Maíz y derivados, sorgo, espárrago
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A	Cereales, vino, frutas, café
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina	Manzana, zumos y derivados
<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Monascus</i>	Citrinina	Cereales, arroz rojo, frutas y quesos
<i>Aspergillus versicolor</i>	Esterigmatocistina	Cereales, café, jamón, pimienta y queso
<i>Hypocreales</i> ( <i>Claviceps purpúrea</i> ), <i>Eurotiales</i>	Alcaloides ergóticos (o del cornezuelo de centeno)	Cereales

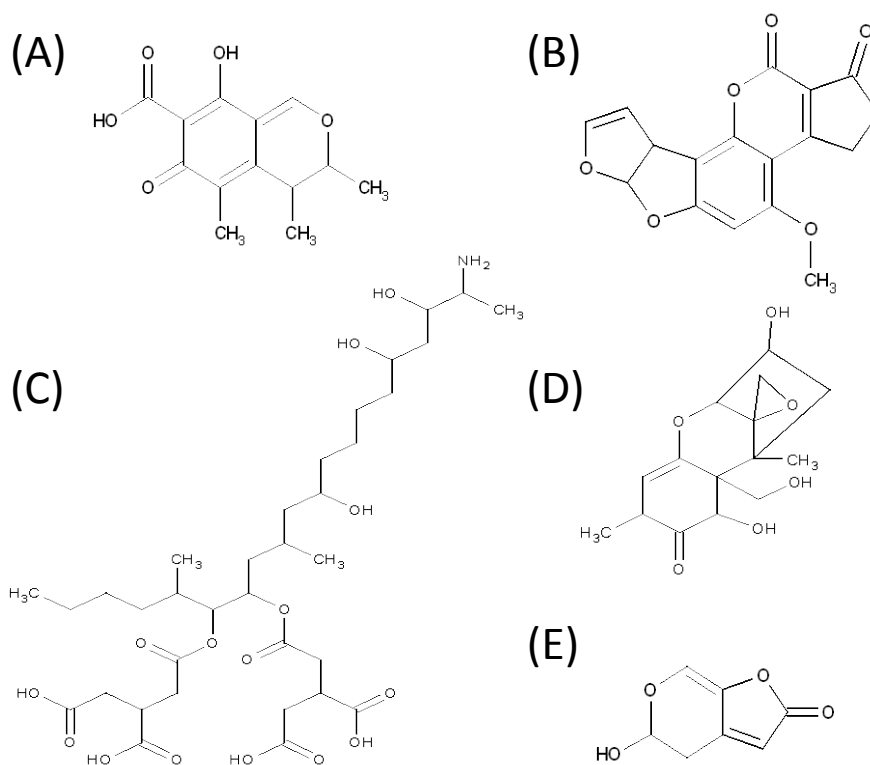
La presencia de estas micotoxinas en los alimentos puede ser individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en su acción sobre el organismo, aumentando así su toxicidad. Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos o crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de especies animales, afectando a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario. Los síntomas causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas [4] (**Figura 1**). En cuanto a la toxicidad crónica, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) [5] clasifica varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre, siendo las aflatoxinas las que presentan un mayor riesgo como agentes carcinógenos. Dentro de las aflatoxinas se han

identificado unos 16 compuestos, pero sólo las aflatoxinas 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>) se analizan rutinariamente, siendo la más peligrosa de todas la AFB<sub>1</sub> [6]. Los animales que consumen alimentos contaminados por aflatoxinas B son capaces de metabolizarlas, hidroxilándolas en una posición determinada. Así, a partir de la AFB<sub>1</sub> se forma la AFM<sub>1</sub>, y a partir de la AFB<sub>2</sub> se forma la aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) y estos metabolitos son secretados en la leche.

Instituciones nacionales y organizaciones internacionales, como la Comisión Europea, la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE.UU., la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la FAO han reconocido los potenciales riesgos para la salud de los animales y humanos que plantea la contaminación de alimentos por micotoxinas, abordando este problema mediante la adopción de límites reglamentarios para los compuestos más relevantes. Así, la EU tiene establecidos unos contenidos máximos

permitidos de determinados contaminantes en diversos alimentos a través del Reglamento Nº 1881/2006 [7]. Concretamente están incluidos en ese reglamento los contenidos máximos para aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFM<sub>1</sub>) en frutos secos, cereales, leche y alimentos infantiles; ocratoxina A (OTA) en cereales, uvas pasas, cafés, vino, zumo de uva, alimentos a base de cereales, alimentos dietéticos, para lactantes y niños de corta edad; patulina en zumos de frutas, bebidas espirituosas elaboradas con manzana, alimentos infantiles y productos sólidos elaborados con manzana; deoxinivalenol (DON) en cereales, pasta, pan y alimentos infantiles a base de cereales; zearalenona (ZEN) en cereales, aperitivos y alimentos infantiles a base de cereales; y fumonisinas en cereales y alimentos elaborados a base de maíz. Generalmente los contenidos máximos se encuentran entre 2-200 µg kg<sup>-1</sup>, siendo en algunos casos inferiores, como para las aflatoxinas o la OTA, o superiores, como para DON, ZEN o fumonisinas y existiendo diversas modificaciones posteriores específicas para toxinas de *Fusarium*, aflatoxinas y OTA en

diversos productos. Además, y dado que las estimaciones de la ingesta han indicado que la presencia de T-2 y HT-2 y alcaloides del cornezuelo del centeno puede ser preocupante para la salud pública, se está estudiando la pertinencia de establecer un nivel máximo para estas micotoxinas. Actualmente existen dos recomendaciones europeas para el control de alcaloides del cornezuelo del centeno en piensos y alimentos [8], y de la T-2 y HT-2 en cereales y productos a base de cereales [9]. Además de la legislación establecida para alimentos, la Farmacopea Europea establece límite para la AFB<sub>1</sub> en plantas medicinales, donde queda establecido que, a no ser que la monografía correspondiente especifique lo contrario, el contenido máximo de AFB<sub>1</sub> no debe superar los 2 µg kg<sup>-1</sup> en estos productos botánicos. Asimismo, establece que la autoridad competente podrá requerir la especificación de que el producto no supera un contenido máximo de 4 µg kg<sup>-1</sup> en la suma de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> [10]. Para el resto de micotoxinas, la Farmacopea Europea no hace ningún tipo de recomendación ni establece ningún contenido máximo permitido.



**Figura 1.** Ejemplos de micotoxinas comunes demostrándose su diversidad estructural. (A) citrinina, (B) aflatoxina B<sub>1</sub>, (C) fumonisina B<sub>1</sub>, (D) deoxinivalenol y (E) patulina.

## 2. Métodos de análisis

La obligación de aplicar los límites reglamentarios ha impulsado el desarrollo de métodos analíticos para la identificación y cuantificación de micotoxinas en alimentos, piensos y matrices biológicas. Esto implica el empleo de métodos de análisis contrastados que cumplan con unos requerimientos de calidad establecidos y con los sistemas de control de seguridad alimentaria con el fin de preservar la salud de la población [11]. Existen diversos métodos de análisis recomendados para la determinación de micotoxinas en alimentos, como los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) [12] donde se pueden encontrar más de cincuenta métodos validados para la determinación de diversas micotoxinas en gran variedad de alimentos, o los métodos normalizados propuestos por la Organización Internacional para la Normalización (ISO) y el Comité Europeo de Normalización (CEN). Los análisis requieren un alto grado de exactitud y por esta razón se usan métodos recomendados o se lleva a cabo la validación de los nuevos métodos propuestos a través de procedimientos que garanticen la calidad de los resultados, incluido el uso de materiales de referencia certificados, o de comparaciones interlaboratorio.

Los métodos analíticos publicados en la última década para la determinación de micotoxinas en alimentos y sus principales aplicaciones, han sido recopilados en diversos artículos de revisión [13-20], siendo los más numerosos los que emplean cromatografía de líquidos (HPLC) con detección UV o fluorescencia (FL), ya que ciertas micotoxinas (OTA, aflatoxinas) presentan fluorescencia nativa y este tipo de detección ofrece ciertas ventajas, como mayor sensibilidad y selectividad. Existen numerosos métodos HPLC-FL para la determinación de OTA sin derivatización previa en distintas matrices, principalmente en vinos, café o cerveza. En el caso de las aflatoxinas, su fluorescencia se muestra atenuada en presencia de ciertos disolventes, siendo necesaria su derivatización bien precolumna con ácido trifluoroacético, o

postcolumna mediante una disolución de yodo o bromo, o mediante hidrólisis por fotodegradación usando una lámpara UV y un reactor [21-24]. Otras micotoxinas que no presentan fluorescencia nativa también se han determinado usando HPLC-FL con derivatización, como es el caso de las fumonisinas [25,26] o T-2 y HT-2 [27]. El acoplamiento de HPLC y la espectrometría de masas (MS) mediante técnicas de ionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*, API), como la ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI) o la ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*, APCI), ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de micotoxinas [28].

Algunos artículos de revisión recogen los métodos de determinación de micotoxinas mediante HPLC-MS [15,29]. Además, mediante el empleo de MS en tándem (MS/MS), usando detectores como la trampa de iones (*Ion Trap*, IT) y el triple cuadrupolo (QqQ), es posible la identificación y cuantificación de los analitos en mezclas complejas, siendo imprescindibles para la confirmación de resultados positivos obtenidos con otras detecciones. HPLC-MS/MS ha permitido también el establecimiento de métodos multiresiduo, que abarquen micotoxinas de diferentes familias. En este contexto, recientemente se han propuesto métodos HPLC-MS/MS para, por ejemplo, la determinación simultánea de OTA, ácido micofenólico y fumonisina B2 (FB<sub>2</sub>) en productos cárnicos [30], 27 micotoxinas y otros metabolitos secundarios en maíz [31], 49 micotoxinas diferentes en diversos alimentos [32] o 21 micotoxinas en alimentos infantiles [33]. En los últimos años el empleo de fases estacionarias con un tamaño de partícula inferior a los 2 µm ha originado el desarrollo de la cromatografía de líquidos de ultra resolución (UHPLC), mejorando la eficacia del proceso cromatográfico al trabajar a altos flujos de la fase móvil sin pérdida de la calidad de la separación cromatográfica, reduciendo notablemente el tiempo de análisis para la determinación simultánea de un elevado número de compuestos. Son cada

vez más numerosas las aplicaciones de esta técnica acoplada a detección MS/MS; como ejemplo, la determinación simultánea de micotoxinas de varias familias en cerveza [34,35]. En nuestro grupo de investigación hemos aplicado esta técnica al control de micotoxinas en productos botánicos [36], frutos secos [37], cereales y pseudocereales [38] y melazas de cereal [39].

Además, en los últimos años las técnicas de separación miniaturizadas han cobrado gran interés debido a las numerosas ventajas que presentan, tales como la reducción del consumo de disolventes, bajo volumen de muestras requerido, incremento en la resolución e incluso una mejorada sensibilidad. Dentro de los sistemas miniaturizados se incluyen los que utilizan columnas de reducido diámetro interno (HPLC capilar) o capilares de sílice fundida (electroforesis capilar, CE). A pesar de las ventajas de la HPLC capilar respecto a la HPLC convencional la única aplicación de este tipo de cromatografía en el análisis de micotoxinas es la desarrollada en nuestro grupo usando la detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) para la determinación de OTA en vinos [40,41]. En cuanto al empleo de la CE, los bajos límites de detección requeridos para la determinación de estos contaminantes en alimentos hacen que la LIF sea igualmente una técnica ideal para su detección, empleándose por ejemplo, en la determinación de ZEN en maíz [42], en la determinación semicuantitativa (*screening*) de aflatoxinas [43] o para su cuantificación en arroz, sin necesidad de procesos de derivatización previos y con límites de detección comprendidos entre 0.04 y 0.52  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  [44].

### 3. Extracción de micotoxinas y purificación de extractos

Las micotoxinas en los alimentos presentan una distribución poco uniforme por lo que se requiere, además de un proceso de toma de muestra adecuado, una cuidadosa homogeneización de ésta, previa a la extracción de estos residuos que además se suelen encontrar en concentraciones muy

bajas. Por otra parte, la complejidad de los alimentos, donde se encuentran presentes cantidades importantes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y otros componentes minoritarios, requiere generalmente una purificación de los extractos, para eliminar las sustancias interferentes antes de realizar la medida analítica.

El empleo de columnas de inmovilización de inmunoadfinidad (*Immuno Affinity Column*, IAC) [45] constituye el método de extracción más común hoy en día en los laboratorios de rutina para la extracción y purificación de micotoxinas [46], siendo además el seleccionado por la mayoría de los métodos recomendados, incluido el de la Farmacopea, para la determinación de AFB<sub>1</sub> [10]. Esta técnica consiste en el empleo de columnas empaquetadas con un relleno en el que se inmoviliza un anticuerpo específico frente al analito que se quiere determinar. La carga de la muestra en la columna da lugar a la captura selectiva del analito gracias a la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo, mientras que otros componentes de la muestra eluyen sin retenerse en la columna. Posteriormente pueden eliminarse restos de extracto indeseables mediante un disolvente de lavado adecuado, y por último la etapa de elución permitirá obtener el analito aislado para su determinación. Las micotoxinas tienen, por lo general, un peso molecular bajo, comportándose como haptenos. Los anticuerpos producidos (monoclonales) requieren una unión a distintos transportadores tales como la agarosa, sefarosa o dextrano (soporte), para fijarlo en la fase estacionaria. Actualmente se comercializan IACs para aflatoxinas del grupo B, G y M, OTA, DON, fumonisinas, T-2 y ZEN. También se han desarrollado IACs que permiten la extracción y la purificación simultánea de varias micotoxinas, como la OchraAflaprep para aflatoxinas y OTA. Sin embargo, las IACs presentan como principales inconvenientes su elevado coste, lentitud y, en ocasiones, bajas recuperaciones, además de su limitado uso en determinaciones multirresiduo.



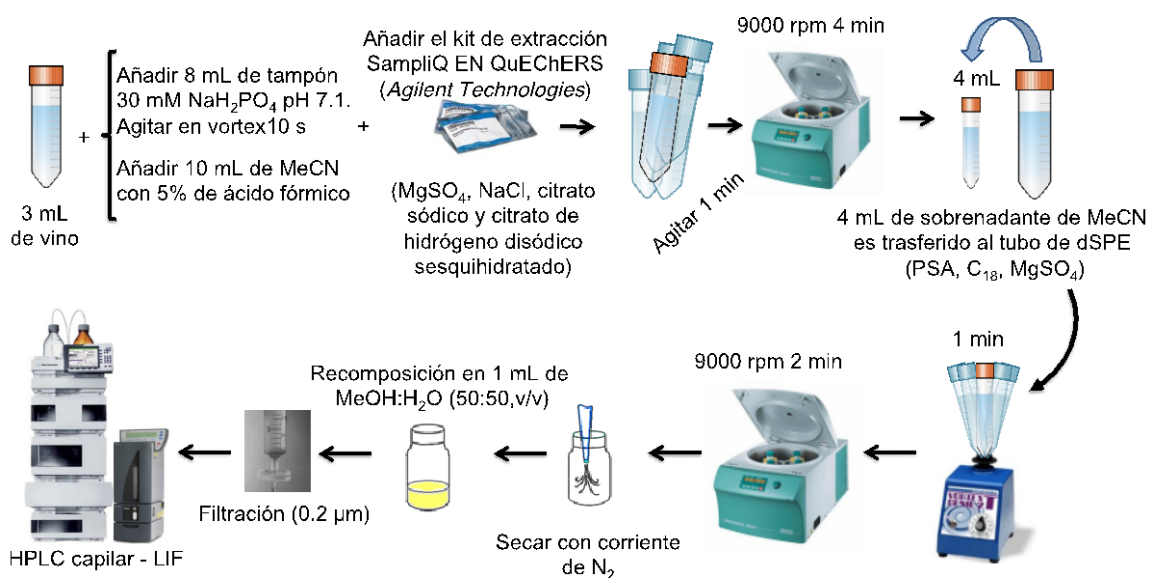
Dadas las limitaciones de las IACs, en los últimos años se han propuesto tratamientos de muestra alternativos para mejorar la eficacia de los procedimientos de extracción de micotoxinas y limpieza de los extractos, considerando las tendencias actuales en cuanto a simplificación y miniaturización de los sistemas de tratamiento de muestra, introduciendo disolventes menos contaminantes y disminuyendo en lo posible las cantidades de disolventes orgánicos utilizados, en línea con los principios de la llamada Química Verde, que implican una mayor seguridad y un menor coste en relación a los procesos convencionales. Además, se han propuesto procedimientos de extracción genérica multiresiduo que permitan su posible automatización y/o aumentar la rapidez de tratamiento. A continuación se describen algunos de los tratamientos de muestras propuestos en los últimos años para el análisis de micotoxinas.

### 3.1. Extracción en fase sólida dispersiva (dSPE)-QuEChERS

QuEChERS es una metodología rápida y barata de tratamiento de muestra muy aplicada durante los últimos años, introducida para la determinación de pesticidas, pero que está siendo empleada para la extracción y purificación de otros compuestos, como antibióticos y micotoxinas [47]. Esta metodología QuEChERS presenta varias ventajas, como su simplicidad y su eficiencia en la limpieza de muestras complejas para análisis multiresiduo [48]. Este tratamiento

consta de dos etapas: la primera etapa consiste en una extracción con disolvente orgánico y reparto de la fase acuosa y orgánica mediante *salting-out*, seguido de una limpieza usando extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) con diferentes sorbentes (C18, amina primaria y secundaria, PSA, carbón grafitizado, etc.).

Recientemente se ha empleado en la determinación de micotoxinas de *Fusarium* [49] y en el desarrollo de métodos multiresiduo en cereales [38, 50-54] y en melazas de cereales [39]. Esta metodología también ha sido utilizada en métodos multiresiduo para la determinación conjunta de distintas familias de contaminantes, entre las que se incluyen micotoxinas [55-57]. En nuestro laboratorio se ha comparado este tratamiento con otros aplicados a la extracción de OTA en vino [41]. En la **Figura 2** se muestra el esquema de tratamiento de muestra y la naturaleza de los disolventes y sales usados para la extracción. Para su determinación se empleó HPLC capilar con detección por LIF (láser He-Cd con excitación a 325 nm), añadiendo a la fase móvil un medio micelar aniónico para aumentar la intensidad de fluorescencia y mejorar la eficacia. El límite de cuantificación (LOQ) fue 286 ng L<sup>-1</sup>, la desviación estándar relativa (DER) fue inferior al 6.0 % y se obtuvieron recuperaciones por encima del 81% para vinos blanco, rosado y tinto.



**Figura 2.** Esquema del tratamiento de muestra mediante la metodología QuEChERS para la determinación de OTA en vinos mediante HPLC Capilar-LIF.

### 3.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Siguiendo la tendencia actual de disminuir el consumo de disolventes, recientemente se han propuesto diversas técnicas de extracción miniaturizadas, entre las que se encuentra la microextracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Micro Extraction*, LLME) [58], una técnica simple y económica en la que se requieren sólo unos microlitros de disolvente para concentrar a los analitos a partir de las muestras, y que es compatible con cromatografía de gases (GC), HPLC y CE. Una de las modalidades de este tipo de extracción es la microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*, DLLME), que se basa en la inyección de un volumen reducido de una mezcla de disolvente extractante y disolvente dispersante en el seno de una muestra acuosa que contiene los analitos [59-61]. Las ventajas de esta técnica radican en su simplicidad de operación, rapidez, bajo coste, altas recuperaciones, elevados factores de enriquecimiento y alta compatibilidad con el medio ambiente, debido al reducido volumen de disolventes orgánicos requerido. Hasta la fecha son pocas las aplicaciones de la DLLME para la determinación de micotoxinas en alimentos, como ejemplo, se ha determinado

OTA en vinos [40,62] y cereales [63], aflatoxinas en cereales [64] y ZEN en cerveza [65]. La **Figura 3** muestra la aplicación de este tratamiento para la determinación de patulina en zumos de manzana mediante CE con detección UV/Vis [66], alcanzando un LOQ de  $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$  y unas recuperaciones entre 75.2–80.0% con DER inferiores al 9%. El método se aplicó a 19 muestras comerciales de zumos de manzana (estándar, ecológico y destinado a consumo infantil) de diferentes proveedores, obteniendo que más del 50% de las muestras analizadas superaban los límites máximos establecidos por la legislación europea.

Recientemente, la DLLME también se ha empleado en la determinación de  $\text{AFM}_1$  en muestras de leche usando UHPLC-MS [67]. El método se basa en la precipitación de proteínas y extracción de  $\text{AFM}_1$  de manera simultánea con acetonitrilo (MeCN, disolvente de extracción y desnaturizante) en presencia de NaCl. En una segunda etapa el extracto se limpia mediante DLLME usando cloroformo y agua y tras agitación y centrifugación se recoge la fase orgánica depositada para su posterior secado y recomposición. El límite de cuantificación del método es de  $2.0 \text{ ng kg}^{-1}$ , lo que supone una alternativa simple y económica para la cuantificación de  $\text{AFM}_1$  en

leche, por debajo del contenido máximo

permitido por la legislación vigente.

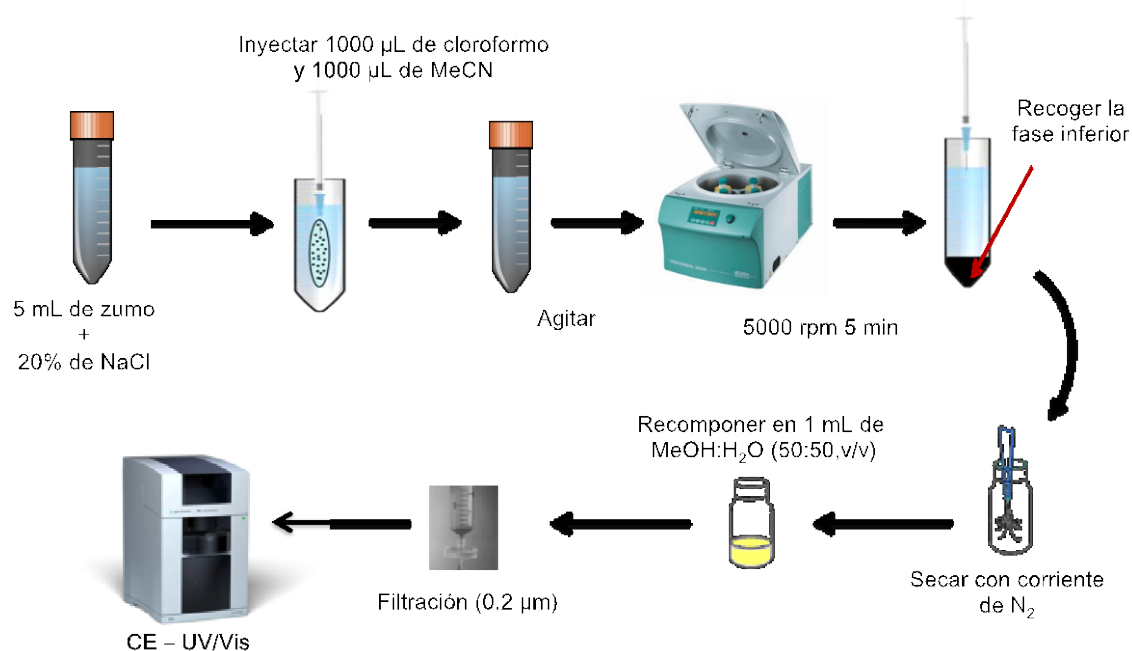


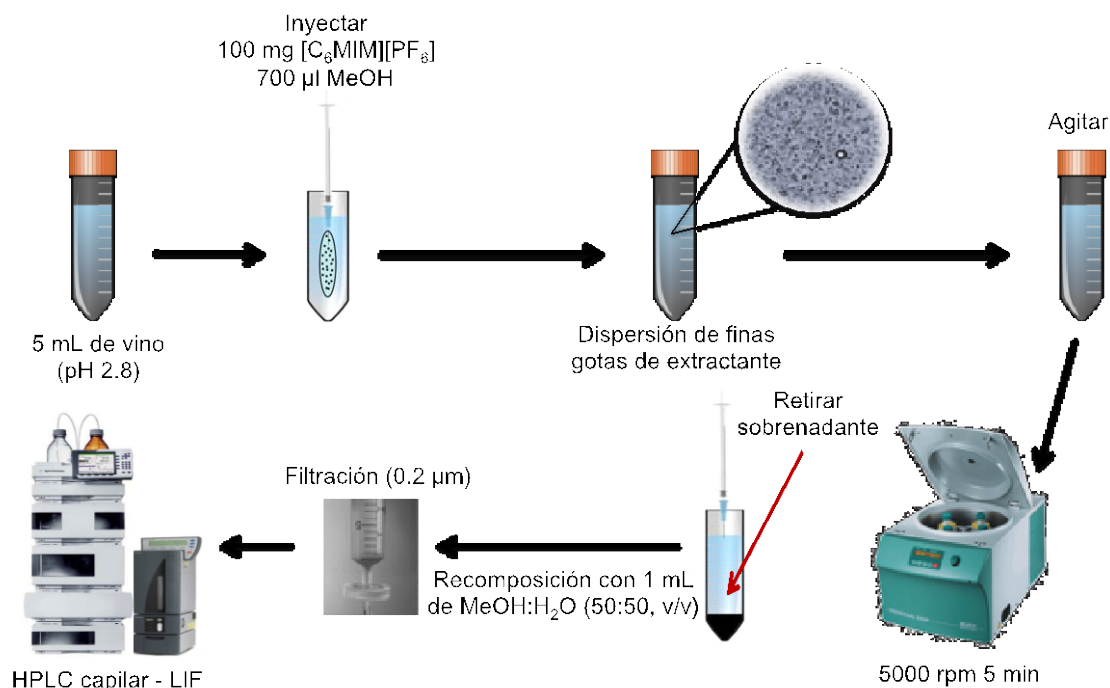
Figura 3. Esquema del tratamiento DLLME para la determinación de patulina en zumos mediante CE-UV/Vis.

### 3.3. Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos (IL-DLLME)

Los líquidos iónicos (IL) son un grupo de compuestos orgánicos formados exclusivamente por un catión y un anión y que son líquidos a temperaturas moderadas, ya que su punto de fusión oscila entre -81 a 125 °C. En la mayoría de los casos, los cationes tienen naturaleza aromática con átomos de nitrógeno en el anillo (imidazol, pirrolidina, piridina, etc.), mientras que los aniones suelen ser moléculas que contienen diferentes grupos químicos que confieren distinto grado de miscibilidad con el agua. Los IL presentan importantes características,

como elevada estabilidad térmica y química, no inflamabilidad, amplio rango de viscosidad, conductividad electrolítica y capacidad de disolver compuestos orgánicos, inorgánicos e incluso materiales poliméricos, debido a su naturaleza iónica y a su composición orgánica. Estas características hacen de los IL una excelente alternativa como disolventes en los procesos de tratamientos de muestras y extracción [68] o en técnicas separativas [69,70]. Los IL pueden reemplazar a los disolventes extractantes en DLLME (IL-DLLME), incorporándose directamente en el sistema cromatográfico con una simple dilución, obteniéndose así métodos más rápidos y menos contaminantes [71].





**Figura 4.** Esquema del tratamiento IL-DLLME para la determinación de OTA en vinos mediante HPLC capilar-LIF

Actualmente son escasas aplicaciones de la IL-DLLME en la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos [72,73] y, por lo que sabemos, la única aplicación existente para micotoxinas ha sido la desarrollada en nuestro grupo de investigación para la determinación de OTA en vinos usando HPLC capilar con detección LIF [41], donde se emplea como extractante el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil-imidazolio ([C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]) (**Figura 4**). El método ha sido aplicado satisfactoriamente en tres tipos de vinos (blanco, rosado y tinto), obteniendo recuperaciones entre 81 y 94%, con una DER por debajo de 8.5%. El LOQ fue 17.5 ng L<sup>-1</sup>, por lo tanto este método es una alternativa eficaz para la determinación de OTA en vinos a niveles de concentración muy por debajo de los contenidos máximos permitidos.

### 3.4. Metodologías combinadas

En ocasiones, estos tratamientos de muestra no son adecuados para un análisis adecuado de micotoxinas, fundamentalmente cuando se intenta realizar una determinación simultánea de diversas familias y tipos y además las matrices son complejas. Una alternativa relativamente simple consiste en la combinación de estas metodologías. En

concreto en nuestro grupo de investigación se ha propuesto un tratamiento de muestra que comprende un primer paso basado en la metodología QuEChERS, seguido de la DLLME para la determinación de micotoxinas en frutos secos [37] y en cardo mariano (*Silybum marianum*) [36], una planta medicinal usada en el tratamiento de problemas hepáticos. La **Figura 5** describe en detalle el acoplamiento de estas dos metodologías para la determinación de 14 micotoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, OTA, fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), FB<sub>2</sub>, DON, fusarenona-X (F-X), toxinas T-2 y HT-2, citrinina (CIT), esterigmatocistina (STE) y ZEN en frutos secos. El uso del primer paso de extracción de la metodología QuEChERS permitía la separación y cuantificación de las micotoxinas estudiadas, excepto de las aflatoxinas a bajas concentraciones, probablemente debido al alto contenido en grasa de este tipo de matrices, lo que implica un elevado efecto matriz e interferencias. Por ello se probó el segundo paso de limpieza de esta metodología (basado en dSPE), que tuvo que ser descartado por las bajas recuperaciones ofrecidas. Así, propusimos como método de extracción de las aflatoxinas y de limpieza de la matriz la DLLME, usando cloroformo como extractante y MeCN como dispersante.

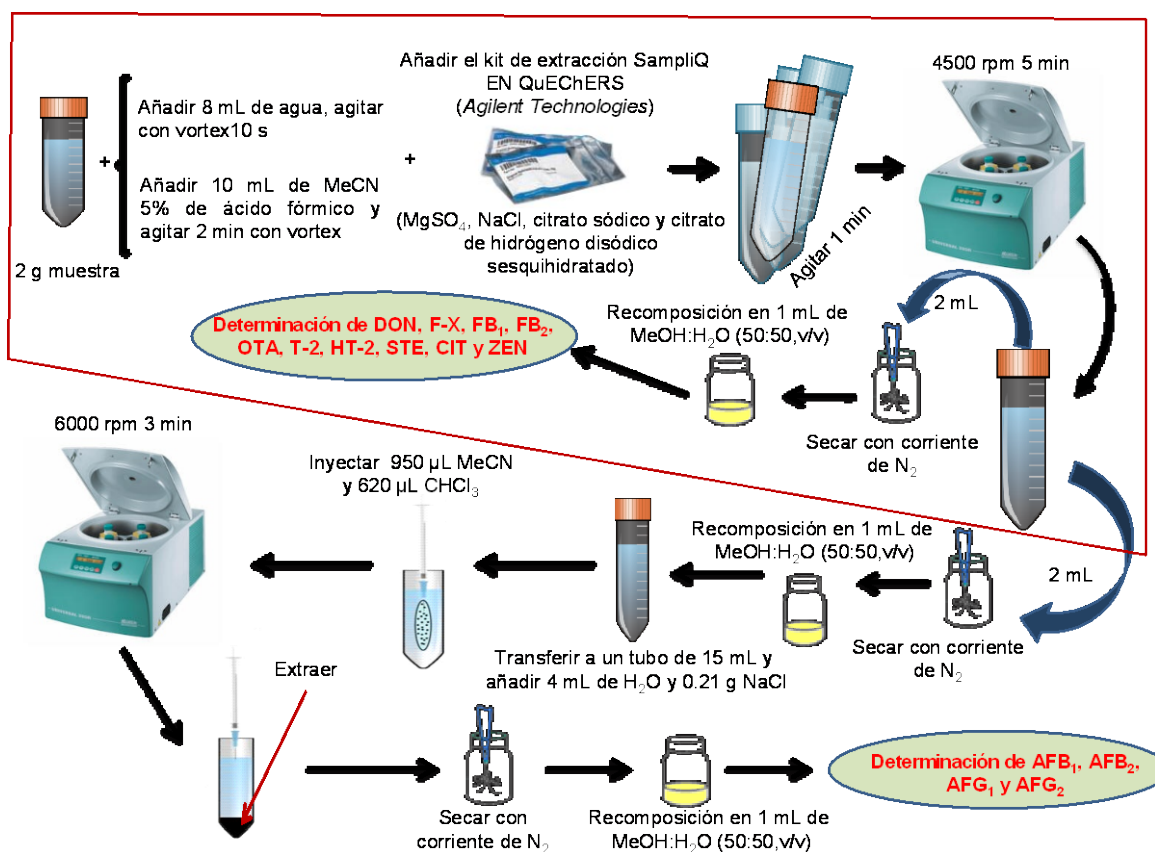
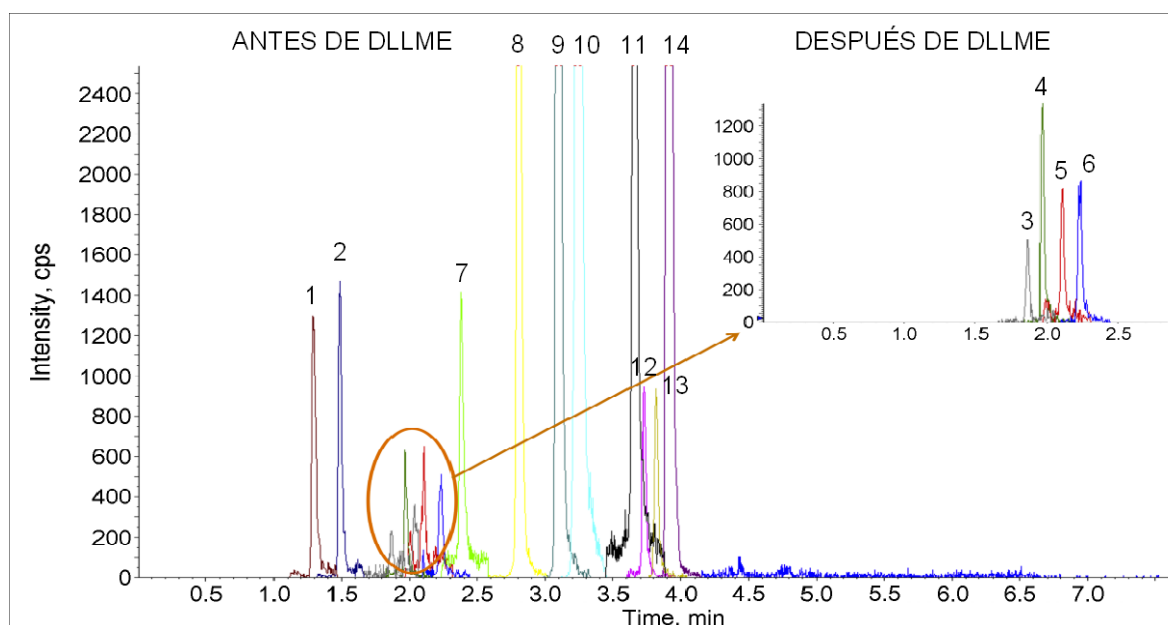


Figura 5. Tratamiento de muestra para la determinación de micotoxinas en frutos secos mediante UHPLC-MS/MS.

En la **Figura 6** se muestra un cromatograma de una muestra de cacahuete sometida al tratamiento de muestra, antes y después de la DLLME en el que se aprecia la dificultad de cuantificar las aflatoxinas sin este segundo procedimiento. Con el tratamiento propuesto se obtuvieron recuperaciones entre 60.7% y 104.3% para frutos secos, LOQs para las aflatoxinas (las únicas legisladas en este tipo de matrices), por debajo de los contenidos máximos permitidos y para el resto de micotoxinas LOQs que permitían su determinación a concentraciones por debajo de los contenidos máximos legislados para otras matrices alimentarias. La DER se mantuvo por debajo del 11% en todos los casos. Cabe destacar que, entre todas las muestras analizadas se encontraron positivos de T-2, HT-2 y ZEN en cardo mariano; F-X en

nueces de macadamia, ZEN y DON en nueces y STE en pipas de girasol. Recientemente se ha desarrollado un método para la determinación de tricotecenos (T-2, HT-2, DON, NIV) en piensos y cereales combinando también la metodología QuEChERS y DLLME [74]. La detección se realizó mediante GC acoplado a un detector por captura de electrones. Después de la extracción con MeCN la etapa de limpieza mediante dSPE se llevó a cabo empleando conjuntamente PSA, C18 y carbón activo. Posteriormente se llevó a cabo la derivatización de los analitos con ácido trifluoroacético y se empleó diclorometano y agua para realizar la DLLME, necesaria para eliminar interferentes de la muestra. El método proporciona recuperaciones en torno al 90% con una DER de repetibilidad menor del 5%.



**Figura 6.** Cromatogramas de una muestra de cacahuets dopada y analizada bajo las condiciones óptimas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, OTA y STE: 5 µg kg<sup>-1</sup>; CIT: 10 µg kg<sup>-1</sup>; FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, T-2, HT-2 y ZEN: 250 µg kg<sup>-1</sup>; DON: 1000 µg kg<sup>-1</sup> y F-X: 2500 µg kg<sup>-1</sup>). 1: DON; 2: F-X; 3: AFG<sub>2</sub>; 4: AFG<sub>1</sub>; 5: AFB<sub>2</sub>; 6: AFB<sub>1</sub>; 7: CIT; 8: HT-2; 9: FB<sub>1</sub>; 10: T-2; 11: ZEN; 12: OTA; 13: STE; 14: FB<sub>2</sub>.

#### 4. Tendencias en el control de micotoxinas

Actualmente el análisis de micotoxinas presenta diversos retos que aún no han encontrado una solución definitiva. Así, uno de los problemas de gran interés que afecta al consumidor hoy en día es la presencia de micotoxinas en piensos, ya que éstas pueden transferirse a los tejidos y fluidos biológicos (carne, leche, huevos) de los animales alimentados con piensos contaminados y destinados a consumo humano. En algunos animales, las micotoxinas sufren procesos metabólicos que los convierten en otros compuestos de diversa toxicidad, como se ha mencionado anteriormente en el caso de la AFM<sub>1</sub>, metabolito de la AFB<sub>1</sub>, que pasa a la leche, mientras que las aves de corral la transforman en metabolitos hidroxilados tóxicos que pueden pasar al huevo [75]. Por tanto, dado que la alimentación animal constituye el primer eslabón de la cadena alimentaria, la obtención de alimentos seguros dependerá del cumplimiento de la legislación aplicable por parte de los fabricantes así como del uso de piensos seguros por parte de los ganaderos, tanto en composición como frente al riesgo de contaminación durante su almacenamiento.

Además de las buenas prácticas agrícolas para intentar disminuir el efecto de las micotoxinas en piensos se ha propuesto el empleo de compuestos secuestrantes o detoxificantes (considerados como nueva categoría de aditivos), que reducen la absorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal del animal (adsorbentes) o que modifican su estructura (biotransformadores) [76]. Los primeros (distintos tipos de arcillas y silicatos) están más extendidos y testados que los segundos (enzimas o microorganismos capaces de detoxificar algunas micotoxinas). No obstante, las diversas propiedades de las micotoxinas hacen que un adsorbente pueda ser eficaz contra una micotoxina pero no contra el resto. Actualmente se están investigando diversos extractos naturales, como productos derivados de la miel [77] y compuestos organosulfurados derivados de las aliáceas, como el ajo [78], que podrían ser interesantes alternativas naturales a los secuestrantes habituales, abriendo un campo de investigación muy interesante.

Cabe además destacar que el metabolismo de algunas plantas (que poseen mecanismos naturales de detoxificación) y el procesado de alimentos, pueden dar lugar a compuestos conjugados conocidos como **micotoxinas enmascaradas**, que presentan generalmente

comportamientos químicos muy diferentes a las micotoxinas de origen, no siendo detectadas en los análisis de rutina. Este fenómeno ocurre fundamentalmente en las toxinas de *Fusarium* (tricotecenos, ZEN y fumonisinas), aunque se han descrito también para otras micotoxinas. Así, como mecanismo detoxificador, algunas plantas son capaces de convertir los relativamente apolares tricotecenos y ZEN en derivados más polares a través de conjugación con azúcares, aminoácidos o grupos sulfato, con objeto de compartimentarlos en vacuolas. No obstante, estas formas podrían ser hidrolizadas a sus precursoras en el tracto digestivo de los animales, pudiendo presentar efectos tóxicos comparables a los de las micotoxinas libres.

Igualmente los procesos tecnológicos tienen un papel importante en los mecanismos de enmascaramiento, fundamentalmente en productos derivados de cereales, ya que pueden inducir reacciones con macromoléculas tales como azúcares, proteínas o lípidos, o la liberación de las formas nativas por descomposición de los derivados enmascarados. Los datos toxicológicos relativos a micotoxinas enmascaradas son escasos, pero varios estudios ponen de relieve la amenaza potencial que supone la presencia de estos compuestos para la seguridad de los consumidores. En particular, la posible hidrólisis de la micotoxina enmascarada (generando la micotoxina inicial) durante la digestión de los mamíferos sería un factor de riesgo a tener en consideración. Así, productos con una aparentemente baja contaminación por micotoxinas, han inducido efectos tóxicos debido a la presencia de fumonisinas "ocultas", liberadas tras la hidrólisis. De este modo, las micotoxinas enmascaradas pueden contribuir cuantitativamente a la cantidad total de micotoxinas presentes en matrices como el maíz y sus productos derivados. Por lo tanto, es prioritario que se desarrollen métodos analíticos para la determinación multiclase de micotoxinas que incluyan a sus distintos productos de transformación, con objeto de evaluar el riesgo que suponen para la salud del consumidor [79,80].

Otro aspecto de gran interés es la evaluación de la presencia en los alimentos de las llamadas **micotoxinas emergentes** derivadas de hongos del género *Fusarium*, como fusaproliferina, moniliformina, beauvericina y eniaticinas, cuya presencia es frecuente en alimentos procedentes del norte de Europa y países del Mediterráneo. A diferencia de otras micotoxinas mucho más estudiadas, actualmente no existen contenidos máximos permitidos para estas micotoxinas debido fundamentalmente a la escasez de datos relacionados con su presencia en alimentos, nivel de contaminación y toxicidad. Aunque no hay descritos casos de micotoxicosis debidos a la ingesta de estas micotoxinas, algunos estudios (la mayoría *in vitro*) revelan la posible toxicidad de estos compuestos, que podría verse aumentada como consecuencia de la interacción de varias micotoxinas presentes en el mismo alimento. En este sentido la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha emitido diversos informes sobre su posible riesgo en alimentos y piensos [81]. Es por ello que, con el fin de evaluar mejor el riesgo que suponen para la salud pública estas micotoxinas emergentes, será necesario disponer de métodos analíticos sensibles y selectivos para distintas matrices de alimentos [82,83].

## Referencias

- [1] Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria. Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas, 12-1-2000. COM (1999) 719 final.
- [2] J.M. Soriano del Castillo (Ed.). "Micotoxinas en alimentos". Díaz de Santos, Madrid, 2007.
- [3] [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm)
- [4] E. M. Faustman, G. S. Ommenn, en: C. D. Klassen (Ed.), Casarett y Doull, Fundamentos de Toxicología, McGraw Hill Interamericana, Madrid, 2005, pp. 50.
- [5] International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012). Disponible en: <http://www.iarc.fr>
- [6] G. S. Shephard, Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1215-1214.
- [7] Reglamento (CE) Nº 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DOUE L364 (2006) 5-24.
- [8] Recomendación 2012/154/UE sobre el control de la presencia de alcaloides de cornezuelo en los piensos y los alimentos. DOUE L77 (2012) 20-21.

- [9] 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. DOUE L91 (2013) 12-15.
- [10] European Pharmacopoeia 6.0. "01/2008:20818. Determination of Aflatoxin B1 in herbal drugs", pp. 256-257.
- [11] Comité Europeo de Normalización. Food analysis-Biotoxins-criteria of analytical method of mycotoxins. CEN Report CR 13505, 1999, Bruselas.
- [12] W. Horwitz, Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, 17th ed., 2002.
- [13] M. W. Trucksess, A. E. Pohland, Methods and method evaluation for mycotoxins. *Molecular Biotechnology* 22 (2002) 287-292.
- [14] R. Krska, E. Welzing, F. Berthiller, A. Molinelli, B. Mizaikoff, Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 345-353.
- [15] P. Zöllner, B. Mayer-Helm, Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1136 (2006) 123-169.
- [16] G. S. Shephard, Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 2468-2477.
- [17] G. S. Shephard, F. Berthiller, J. Dorner, R. Krska, G. A. Lombaert, B. Malone, C. Maragos, M. Sabino, M. Solfrizzo, M. W. Trucksess, H. P. van Egmond, T. B. Whitaker, Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007-2008. *World Mycotoxin J.* 2 (2009) 3-21.
- [18] N. W. Turner, S. Subrahmanyam, S. A. Piletsky, Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 168-180.
- [19] R. Köppen, M. Koch, D. Siegel, S. Merkel, R. Maul, I. Nehls, Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 1595-1612.
- [20] G. S. Shephard, F. Berthiller, P. A. Burdaspal, C. Crews, M. A. Jonker, R. Krska, S. MacDonald, R. J. Malone, C. Maragos, M. Sabino, M. Solfrizzo, H. P. Van Egmond, T. B. Whitaker, Developments in mycotoxin analysis: An update for 2010-2011. *World Mycotoxin J.* 5 (2012) 3-30.
- [21] J. Stroka, E. Anklam, U. Joerissen, J. Gilbert, Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 83 (2000) 320-340.
- [22] A. E. Walting, D. Wilson, Liquid chromatographic analysis of aflatoxin using post-column photochemical derivatization: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 89 (2006) 678-692.
- [23] M. J. O' Riordan, M. G. Wilkinson, Comparison of analytical methods for aflatoxin determination in commercial chilli spice preparations and subsequent development of an improved method. *Food Control* 20 (2009) 700-720.
- [24] P. Afshar, M. Shokrzadeh, S. Kalhori, Z. Babaee, S. S. Saeedi Saravi, Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran. *Food Control* 31 (2013) 525-529.
- [25] L. Ma, W. Xu, X. He, K. Huang, Y. Wang, Y. Luo, Determination of fumonisins B1 and B2 in Chinese rice wine by HPLC using AQC precolumn derivatisation. *J. Sci. Food Agr.* 93 (2013) 1128-1133.
- [26] W. Kong, T. Xie, J. Li, J. Wei, F. Qiu, A. Qi, Y. Zheng, M. Yang, Analysis of fumonisins B1 and B2 in spices and aromatic and medicinal herbs by HPLC-FLD with on-line post-column derivatization and positive confirmation by LC-MS/MS. *Analyst* 137 (2012) 3166-3174.
- [27] G. J. Soleas, J. Yan, D. M. Goldberg, Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2733-2740.
- [28] A. K. Malik, C. Blasco, Y. Picó, Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4018-4040.
- [29] S. Sforza, C. Dall'asta, R. Marchelli, Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 54-76.
- [30] L. M. Sørensen, J. Mogensen, K. F. Nielsen, Simultaneous determination of ochratoxin A, mycophenolic acid and fumonisin B2 in meat products. *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1535-1542.
- [31] R. R. Rasmussen, I. M. L. D. Storm, P. H. Rasmussen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 765-776.
- [32] M. Sulyok, R. Krska, R. Schuhmacher, Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chem.* 119 (2010) 408-416.
- [33] J. Rubert, C. Soler, J. Mañes, Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chem.* 133 (2012) 176-183.
- [34] R. Romero-González, J.L. Martínez Vidal, M.M. Aguilera-Luiz, A. Garrido Frenich, Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beers by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 9385-9392.
- [35] A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, R. Romero-González, M.M. Aguilera-Luiz, Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 117 (2009) 705-712.



- [36] N. Arroyo-Manzanares, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1282 (2013) 11-19.
- [37] N. Arroyo-Manzanares, J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta* 115 (2013) 61-67.
- [38] N. Arroyo-Manzanares, J. F. Huertas-Pérez, A. M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. *Food Control* 36 (2014) 94-101.
- [39] N. Arroyo-Manzanares, J. F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A. M. García-Campaña, Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups. *Food Chem.* (en revisión)
- [40] N. Arroyo-Manzanares, L. Gámiz-Gracia, A. M. García-Campaña, Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chem.* 135 (2012) 368-372.
- [41] N. Arroyo-Manzanares, A. M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in wine by capillary HPLC with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2987-2994.
- [42] C. M. Maragos, M. Appell, Capillary electrophoresis of the mycotoxin zearalenone using cyclodextrin-enhanced fluorescence. *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 252-257.
- [43] R. Peña, M. C. Alcaraz, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 303-314.
- [44] N. Arroyo-Manzanares, L. Gámiz-Gracia, A. M. García-Campaña, J. J. Soto-Chinchilla, L. E. García-Ayuso, On-line preconcentration for the determination of aflatoxins in rice samples by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 31 (2010) 2180-2185.
- [45] M. Castegnaro, M. Tozlovanu, C. Wild, A. Molinié, A. Sylla, A. Pfohl-Leszkowicz. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 480-487.
- [46] P. M. Scott, M. W. Trucksess, Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J. AOAC Int.* 80 (1997) 941-949.
- [47] S. J. Lehotay, M. Anastassiades, R. E. Majors, QuEChERS, a sample preparation technique that is "catching on": An up-to-date interview with the inventors. *LC-GC North America* 28 (2010) 504-516.
- [48] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431.
- [49] M. Zachariasova, O. Lacina, A. Malachova, M. Kostelanska, J. Poustka, M. Godula, J. Hajslova, Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 51-61.
- [50] J. Rubert, Z. Dzuman, M. Vaclavikova, M. Zachariasova, C. Soler, J. Hajslova, Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta* 99 (2012) 712-719.
- [51] A. Desmarchelier, J. M. Oberson, P. Tella, E. Gremaud, W. Seefelder, P. Mottier, Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 58 (2010) 7510-7519.
- [52] S. C. Cunha, J. O. Fernande, Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 600-609.
- [53] I. Sospedra, J. Blesa, J. M. Soriano, J. Mañes, Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1437-1440.
- [54] L. Vaclavik, M. Zachariasova, V. Hrbek, J. Hajslova, Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta* 82 (2010) 1950-1957.
- [55] H. G. J. Mol, P. Plaza-Bolaños, P. Zomer, T. C. de Rijk, A. A. M. Stolker, P. P. J. Mulder, Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9450-9459.
- [56] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, S. Piovesana, R. Samperi, A. Laganà, Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. *J. Chromatogr. A* 1268 (2012) 84-90.
- [57] O. Lacina, M. Zachariasova, J. Urbanova, M. Vaclavikova, T. Cajka, J. Hajslova, Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil



- seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 8-18.
- [58] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, Liquid-phase microextraction. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1-14.
- [59] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.
- [60] A. V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, M. A. Rodríguez-Delgado, Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 728-751.
- [61] V. Andruch, I. S. Balogh, L. Kocúrová, J. Sandrejšová, Five years of dispersive liquid-liquid microextraction. *Appl. Spectrosc. Rev.* 48 (2013) 161-259.
- [62] L. Anna, L. Piccinelli, L. Rastrelli, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the identification and the accurate quantification by isotope dilution assay of ochratoxin A in wine samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2010) 1279-1286.
- [63] L. Campone, A. L. Piccinelli, R. Celano, L. Rastrelli, pH-Controlled dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. *Anal. Chim. Acta* 754 (2012) 61.
- [64] L. Campone, A. L. Piccinelli, R. Celano, L. Rastrelli, Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereal products. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7648-7654.
- [65] H. M. Antep, M. Merdivan, Development of new dispersive liquid-liquid microextraction technique for the identification of zearalenone in beer. *Anal. Meth.* 4 (2012) 4129-4134.
- [66] M. D. Víctor-Ortega, F. J. Lara, A. M. García-Campaña, M. del Olmo-Iruela, Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of patulin in apple juices using micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Control* 31 (2013) 353-358.
- [67] L. Campone, A.L. Piccinelli, R. Celano, M. Russo, L. Rastrelli, Rapid analysis of aflatoxin M1 in milk using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 8645-8652.
- [68] L. Ruiz-Aceituno, M. L. Sanz, L. Ramos, Use of ionic liquids in analytical sample preparation of organic compounds from food and environmental samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 121-141.
- [69] B. Buszewski, S. Studzinska, A review of ionic liquids in chromatographic and electromigration techniques. *Chromatographia* 68 (2008) 1-10.
- [70] A. Berthod, M. J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, Ionic liquids in separation techniques. *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6-18.
- [71] D. Han, B. Tang, Y. Ri Lee, K. Ho Row, Application of ionic liquid in liquid phase microextraction technology. *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2949-2961.
- [72] L. M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, M. Asensio-Ramos, M. A. Rodríguez-Delgado, Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7336-7345.
- [73] L. M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, A. V. Herrera-Herrera, M. A. Rodríguez-Delgado, Pesticide extraction from table grapes and plums using ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2387-2395.
- [74] V. G. Amelin, N. M. Karaseva, A. V. Tret'yakov, Combination of the QuEChERS method with dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization in the determination of mycotoxins in grain and mixed feed by gas-liquid chromatography with an electron capture detector. *J. Anal. Chem.* 68 (2013) 552-557.
- [75] L. Afsah-Hejri, S. Jinap, P. Hajeb, S. Radu, Sh. Shakibazadeh, A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 12 (2013) 629-651.
- [76] G. Jard, T. Liboz, F. Mathieu, A. Guyonvarc'h, A. Lebrihi, Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam.* 28 (2011) 1590-1609.
- [77] C. Siddoo-Atwal, A.S. Atwal, A possible role for honey bee products in the detoxification of mycotoxins. *Acta Hort.* 963 (2012) 237-245.
- [78] *Fusarium* species in grains: dry matter losses, mycotoxin contamination and control strategies using Ozone and chemical compounds. Tesis Doctoral. Dr. Kalliopi Mylona, Cranfield University. 2012.
- [79] G. Galaverna, C. Dall'Asta, M. Mangia, A. Dossena, R. Marchelli, Masked mycotoxins: an emerging issue for food safety. *Czech J. Food Sci.* 27 (2009) S89-S92.
- [80] F. Berthiller, C. Crews, C. Dall'Asta, S. De Saeger, G. Haesaert, P. Karlovsky, I.P. Oswald, W. Seefelder, G. Speijers, J. Stroka, Masked mycotoxins: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (2013) 165-186.
- [81] <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins.htm>
- [82] M. Jestoi, Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48 (2008) 21-49.
- [83] A. Santini, G. Meca, S. Uhlig, A. Ritieni, Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: occurrence in food – A review. *World Mycotoxin J.* 5 (2012) 71-81.

## INVESTIGACIÓN GRASEQA: SEGURIDAD ALIMENTARIA

	<p><b>Natalia Arroyo Manzanares</b> obtuvo su grado en Ingeniería Química en 2008 por la Universidad de Granada, y durante su último curso comenzó su labor investigadora en el grupo FQM-302 (Departamento de Química Analítica, UGR), con una beca de colaboración. En 2009 comenzó sus estudios de Doctorado gracias a la obtención de una beca predoctoral de la Junta de Andalucía, y un año más tarde finalizó el Máster Oficial en Tecnología y Calidad de los Alimentos (UGR). En 2013 defendió su tesis doctoral con mención internacional. Ha realizado una estancia predoctoral en la facultad de Ciencias Farmacéuticas en la Universidad de Gante (Bélgica). Actualmente disfruta de un contrato posdoctoral de la Junta de Andalucía, continuando su investigación en el análisis de micotoxinas y antibióticos en alimentos.</p>
	<p><b>José Fernando Huertas Pérez</b> es Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Granada (2008) realizando su tesis doctoral en el Departamento de Química Analítica, en el grupo FQM-302. Posteriormente se incorporó al Instituto Europeo de Materiales y Medidas de Referencia del Centro Común de Investigación – Comisión Europea (2008-2011), donde trabajó en la validación de metodologías para determinar PAHs y pesticidas mediante GC-MS y LC-MS/MS y su aplicación en los estudios de viabilidad, estabilidad y caracterización de materiales de referencia. Actualmente es contratado post-doctoral Juan de la Cierva en el mismo grupo de la Universidad de Granada, donde trabaja en el desarrollo, validación e implementación de metodologías analíticas para la determinación de micotoxinas y pesticidas en alimentos y piensos, mediante la optimización de tratamientos de muestra alternativos y la aplicación de LC-FLD y LC-MS/MS.</p>
	<p><b>Laura Gámiz Gracia</b>, es Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada desde 2011. Se licenció en Químicas en esta misma universidad, y defendió su Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba (1999), incorporándose definitivamente a la Universidad de Granada con un contrato de reincorporación de doctores, para conseguir en 2006 un contrato Ramón y Cajal. Durante su etapa de formación doctoral y post-doctoral realizó estancias en el Instituto di Analisi e Technologie Farmaceutiche e Alimentari (Universidad de Génova, Italia), Departamento de Química Analítica (Universidad de Almería), Instituto de Química Orgánica General (CSIC, Madrid), Faculté de Pharmacie (Universidad de Montpellier) y en la School of Natural &amp; Applied Scinces (Faculty of Health, Life and Social Sciences, Lincoln, Inglaterra). Es miembro del grupo FQM-302 y su labor investigadora está centrada en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de residuos de contaminantes (micotoxinas, antibióticos y plaguicidas) en alimentos, empleando técnicas de separación miniaturizadas (electroforesis capilar y HPLC capilar) y de ultra-resolución (UHPLC), y tratamientos de muestra alternativos.</p>
	<p><b>Ana M. García Campaña</b> es Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada. Se doctoró en Química en la misma Universidad en 1995 obteniendo Premio Extraordinario. Ha realizado diversas estancias posdoctorales o como profesora invitada en las Universidades de Gante (Bélgica), Paris VII, Montpellier, Lyon (Francia) y Virginia (EEUU), en relación con la aplicación de técnicas quimioluminiscentes, electroforesis capilar y sistemas miniaturizados. Desde el año 2000 es responsable del grupo de investigación FQM-302 - "Calidad en Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica", cuyas líneas están relacionadas con la calidad y seguridad alimentaria mediante el control de contaminantes en alimentos y muestras medioambientales y la determinación de fármacos y drogas en análisis forense y clínico, empleando electroforesis capilar, HPLC y UHPLC con diversas detecciones (UV-Vis, quimioluminiscencia, fluorescencia, LIF y MS). Ha sido responsable de diversos proyectos de investigación y ha dirigido 10 tesis doctorales, siendo coeditora del libro "Chemiluminescence in Analytical Chemistry" (Marcel Dekker) y coautora de 15 capítulos de libro y 150 publicaciones indexadas. Junto con su grupo organizó en 2002 el "X International Symposium on Luminescence Spectrometry", y en 2007 la "VII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines" y el "I Workshop de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas".</p>