

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

EVALUACIÓN DEL PELIGRO POTENCIAL Y REAL DE LA PRESENCIA DE OCRATOXINA A, TRICOTECENOS B Y PATULINA EN TRIGO Y MANZANA MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y CROMATOGRÁFICAS.

FRANCISCO MANUEL VALLE ALGARRA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 d'octubre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Francisco Bosch Reig
- Dra. M^a Teresa González Jaén
- Dr. Roberto Sebastiano
- Dra. Covadonga Vázquez Estévez
- Dra. Rosa M^a Montes Estellés

Va ser dirigida per:

Dr. José Vicente Gimeno Adelantado

Dr. Rufino Mateo Castro

Dra. Misericordia Jiménez Escamilla

©Copyright: Servei de Publicacions
Francisco Manuel Valle Algarra

Dipòsit legal: V-3432-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7979-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**Evaluación del peligro potencial y real
de la presencia de ocratoxina A,
tricotecenos B y patulina en trigo y
manzana mediante técnicas
microbiológicas y cromatográficas**

Tesis Doctoral

**Presentada:
Francisco Manuel Valle Algarra**

**Directores:
Dr. José Vicente Gimeno Adelantado
Dr. Rufino Mateo Castro
Dra. Misericordia Jiménez Escamilla**



Department of Analytical Chemistry



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**Evaluation of potential and real hazard of the occurrence
of ochratoxin A, type B trichothecenes and patulin in
wheat and apple by microbiological and chromatographic
techniques.**

Memory presented by
Francisco Manuel Valle Algarra
to reach the Ph.D. degree in Chemistry
by the University of Valencia

Supervisors
Dr. Jose Vicente Gimeno Adelantado
Dr. Rufino Mateo Castro
Dra. Misericordia Jiménez Escamilla

Valencia 2010

Departamento de Química Analítica



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

El Dr. Jose Vicente Gimeno Adelantado, Catedrático del Departamento de Química Analítica, la Dra. Misericordia Jiménez Escamilla, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología y el Dr. Rufino Mateo Castro, Profesor Asociado del Departamento de Química Analítica, todos de la Universidad de Valencia, como directores de la Tesis Doctoral: **“Evaluación del peligro potencial y real de la presencia de ocratoxina A, tricotecenos B y patulina en trigo y manzana mediante técnicas microbiológicas y cromatográficas”** realizada por Francisco Manuel Valle Algarra, autorizan la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, en julio de 2010.

Fdo. Dr. Jose V. Gimeno Adelantado Dr. Rufino Mateo Castro Dra. Misericordia Jiménez Escamilla

Lista de acrónimos / Abbreviations

15-ADON	15-acetildeoxinivalenol / 15-acetyldeoxynivalenol
3-ADON	3-acetildeoxinivalenol / 3-acetyldeoxynivalenol
A	<i>Aspergillus</i>
a.C.	antes de Cristo / before Christ
AABS	disolución tampón ácido acético / acetic acid buffer solution
ADA	medio de cultivo manzana-glucosa-agar / apple-dextrose-agar medium
AFB1	aflatoxina B ₁ / aflatoxin B ₁
AFB2	aflatoxina B ₂ / aflatoxin B ₂
AFG1	aflatoxina G ₁ / aflatoxin G ₁
AFG2	aflatoxina G ₂ / aflatoxin G ₂
AME	alternariol monometil eter / alternariol monomethyl ether
ANOVA	análisis de la varianza / analysis of variance
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos / Association of Official Analytical Chemists
AOH	alternariol
APCI	ionización química a presión atmosférica / atmospheric pressure chemical ionization
API-ES	ionización a presión atmosférica-electronebulización / atmospheric pressure ionization-electrospray
APPCC	análisis de peligros y puntos críticos de control / hazard analysis and critical control point
APPI	fotoionización a presión atmosférica / atmospheric pressure photoionization
ATP	trifosfato de adenosina / Adenosine triphosphate
a _w	actividad de agua / water activity
BEN	nefropatía endémica de los Balcanes / Balkan endemic nephropathy
BSA	bis(trimetilsilil) acetamida / N, O-bis(trimethylsilyl)acetamide
BSTFA	N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida / N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
BYDV	virus del enanismo amarillo / barley yellow dwarf virus
C	concentración de suspensión de esporas / concentration of spore suspension
CE	Comisión Europea / European Commission
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo / Spanish Collection of Type Cultures

CEN	Comité Europeo de Estandarización / European Committee for Standardization
CIN	nefropatía intersticial crónica / chronic interstitial nephropathy
D	diámetro / diameter
d.f.	grados de libertad / degrees of freedom
DAD	detector de espectrofotometría de red de diodos / diode-array detector
DAS	diacetoxiscirpenol / diacetoxyscirpenol
DMAP	4-dimetilaminopiridina / 4-dimethylamino-pyridine
DNA	ácido desoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid
DON	deoxinivalenol / deoxynivalenol
Ec. / Eq.	ecuación / equation
ECD	detector de captura electrónica / electron capture detector
EEUU	Estados Unidos / United States of America
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria / European Food Safety Authority
EI	impacto electrónico / electron impact
EIA	inmunoensayos enzimáticos / enzymatic immuno assay
ELISA	ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas / enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionización por electronebulización / electrospray ionization
Esp	esporas / spores
EtAc	acetato de etilo / ethyl acetate
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Food and Agriculture Organization of the United Nations
FB1	fumonisina B ₁ / fumonisin B ₁
FB2	fumonisina B ₂ / fumonisin B ₂
FBs	fumonisinas / fumonisins
FCC	diseño compuesto de caras centradas / face-centered central design
FID	detector de ionización de llama / flame ionization detector
FLD	detector de fluorescencia / fluorescence detector
FusX	fusarenona X / fusarenon X
HFBA	anhídrido heptafluorobutírico / hexafluorobutyric anhydride

HFBI	heptafluorobutiril imidazol / heptafluorobutylimidazole
HT-2	toxina HT-2 / HT-2 toxin
IAC	columna de inmunoafinidad / immunoaffinity column
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer / International Agency for Research on Cancer
IgA	inmunoglobulina A / immunoglobulin A
ISO	Organización Internacional de Estandarización / International Organization for Standardization
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada / International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios / Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LC	cromatografía líquida / liquid chromatography
LDH	lactato deshidrogenasa / lactate dehydrogenase
LLE	Extracción líquido-líquido / liquid-liquid extraction
LOD	límite de detección / limit of detection
LOQ	límite de cuantificación / limit of quantification
LSD	dietilamida de ácido lisérgico / lysergic acid diethylamide
MAL	límite máximo permitido / maximum allowable level
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona/ 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone
MECC	cromatografía capilar micelar electrocinética / micellar electrokinetic capillary chromatography
MLR	regresión lineal múltiple / multiple linear regression
MRM	monitorización de reacción múltiple / multiple reaction monitoring
MS	detector de espectrometría de masas / mass selective detector
NEO	neosolaniol
NH ₄ Ac	acetato de amonio / ammonium acetate
NICI	ionización química en modo negativo / negative ion chemical ionization
NIR	espectroscopia de infrarrojo cercano / near-infrared absorption spectroscopy
NIV	nivalenol
OPA	o-ftaldehído / o-phthaldehyde
OTA	ocratoxina A / ochratoxin A
OTB	ocratoxina B / ochratoxin B
OTC	ocratoxina C / ochratoxin C

OT α	ocratoxina α / ochratoxin α
OT β	ocratoxina β / ochratoxin β
OWLS	espectroscopía óptica de ondulación de la luz / optical waveguide lightmode spectroscopy
<i>P</i>	<i>Penicillium</i>
PAT	patulina / patulin
PCI	ionización química en modo positivo / positive chemical ionization
PCR	reacción en cadena de la polimerasa / polymerase chain reaction
PDA	medio de cultivo patata–glucosa–agar / potato–dextrose–agar medium
PEG	polietilenglicol 8000 / polyethylenglicol 8000
PFPA	anhídrido pentafluoropropiónico / pentafluoropropionic anhydride
PFPI	pentafluoropropionil imidazol / pentafluoropropylimidazole
Phe	fenilalanina / phenylalanine
PTDI	ingesta diaria tolerable provisional / provisional tolerable daily intake
RFLP	polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción / restriction fragment length polymorphisms
RMSE	raíz cuadrada del error cuadrático medio / root mean squared error
RNA	ácido ribonucleico / ribonucleic acid
RP	fase reversa / reversed phase
RS	superficie de respuesta / response surface
RSD	desviación estándar relativa / relative standard deviation
RSM	modelo de superficie de respuesta / response surface methodology
s.	siglo / century
SAX	columna de intercambio iónico / ion exchange column
SCF	Comité Científico de Alimentación Humana de la Unión Europea / Scientific Committee on Food of the European Commission
SEP	error estándar de la predicción / standard error prediction
SFC	cromatografía de fluidos supercríticos / supercritical fluid chromatography
SIM	monitorización de ión seleccionado / selected ion monitoring

SPE	extracción en fase sólida / solid-phase extraction
T	temperatura / temperature
T-2	toxina T-2 / T-2 toxin
TDI	ingesta diaria tolerable / tolerable daily intake
TFAA	anhídrido trifluoroacético / trifluoroacetic anhydride
TLC	cromatografía de capa fina / thin layer chromatography
TMCS	trimetilclorosilano / trimethylchlorosilane
TMSI	trimetilsilil imidazol / trimethylsilylimidazole
TQD®	Tandem Quadrupole Detector
t_r	tiempo de retención / retention time
TWI	ingesta semanal máxima tolerable / tolerable weekly intake
UE	Unión Europea / European Union
UPLC®	Ultra Performance Liquid Chromatography
URSS	Unión Soviética / Union of Soviet Socialist Republics
UV	espectrofotometría de ultravioleta / ultraviolet spectrophotometry
WHO	Organización Mundial de la Salud / World Health Organization
YES	medio de cultivo de extracto de levadura y sacarosa / yeast extract-sucrose medium
ZEA	zearalenona / zearalenone
ZUA	medio de cultivo a base de zumo de uva tinta-agar / black grape juice-agar medium

Índice general

I INTRODUCCIÓN	1
1. Consideraciones históricas previas	1
2. Hongos.....	6
2.1 Situación taxonómica.....	6
2.2 Biogeografía.....	6
2.3 Morfología	6
3. Micotoxinas y hongos productores.....	7
3.1 Micotoxinas: definición y generalidades.....	7
3.2 Hongos productores de micotoxinas	9
3.3 Factores que influyen en la producción de micotoxina.....	11
3.3.1 Factores abióticos	11
3.3.1.1 Sustrato	11
3.3.1.2 Actividad de agua	12
3.3.1.3 Temperatura.....	12
3.3.1.4 pH.....	13
3.3.1.5 Atmósfera	13
3.3.1.6 Tratamientos con fungicidas	13
3.3.1.7 Otros factores abióticos.....	14
3.3.2 Factores bióticos	14
3.4 Clasificación de las micotoxinas	15
3.5 Contaminación por micotoxinas en alimentos y piensos. Micotoxicosis.	16
3.5.1 Medidas preventivas y de reducción. Análisis de peligros y puntos críticos de control.....	17
3.6 Evaluación de riesgos y regularización y control de las micotoxinas	19
4. Principales fuentes de micotoxinas en la dieta	20
5. Métodos analíticos para la detección y cuantificación de micotoxinas	21
5.1 Métodos de muestreo	21
5.2 Métodos de análisis.....	22
5.3 Validación de métodos analíticos.....	22
6. Ocratoxinas	23
6.1 Estructura química.....	23
6.2 Metabolismo y efectos tóxicos de la ocratoxina A.....	24
6.2.1 Nefrotoxicidad.....	25
6.2.2 Carcinogenicidad.....	26
6.2.3 Genotoxicidad	26
6.2.4 Inmunotoxicidad.....	26
6.2.5 Neurotoxicidad.....	27
6.2.6 Efectos sobre la fertilidad	27
6.2.7 Toxicidad en el desarrollo.....	27

6.3 Hongos productores	27
6.3.1 Especies de <i>Aspergillus</i> productoras de ocratoxina A	28
6.3.1.1 <i>Aspergillus ochraceus</i>	29
6.3.1.2 <i>Aspergillus carbonarius</i>	30
6.3.1.3 <i>Aspergillus niger</i>	30
6.3.2 Especies de <i>Penicillium</i> productoras de ocratoxina A	31
6.3.2.1 <i>Penicillium verrucosum</i>	31
6.4 Presencia de ocratoxina A en alimentos.....	32
6.5 Metodología para la determinación de ocratoxina A	33
7. Tricotecenos	36
7.1 Estructura química.....	37
7.2 Propiedades físicas y químicas	39
7.3 Hongos productores	39
7.4 Patogenicidad en las plantas e incidencia en alimentos	40
7.5 Toxicidad de los tricotecenos	42
7.5.1 Toxicidad general	42
7.5.2 Toxicidad de deoxinivalenol	43
7.5.3 Toxicidad de 3- y 15-ADON.....	44
7.5.4 Toxicidad de nivalenol	45
7.6 Determinación de los tricotecenos.....	45
7.6.1 Muestreo	45
7.6.2 Extracción.....	46
7.6.3 Purificación	46
7.6.4 Detección y cuantificación.....	46
7.6.5 Determinación de tricotecenos tipo B	47
8. Patulina.....	49
8.1 Generalidades: Estructura química y propiedades.....	49
8.2 Metabolismo y efectos tóxicos de la patulina	50
8.3 Hongos productores y presencia de PAT en alimentos	51
8.4 Metodología para la determinación de patulina	54
8.4.1 Extracción y purificación.....	54
8.4.2 Separación y detección	55
8.4.3 Metodologías analíticas	55
9. Otras micotoxinas.....	57
9.1 Aflatoxinas	58
9.2 Zearalenona	60
9.3 Fumonisinias	61
9.4 Alternarios.....	63

10. Legislación.....	64
II OBJETIVOS	71
III EXPERIMENTAL	73
1. Estudio de la micobiota contaminante de trigo y manzana.....	73
1.1 Reactivos y estándares.....	73
1.2 Toma de muestras	73
1.2.1 Trigo.....	73
1.2.2 Manzana	74
1.3 Medios de cultivo	74
1.4 Aislamiento de hongos contaminantes de trigo.....	74
1.5 Aislamiento de hongos contaminantes de la manzana	75
1.6 Identificación de hongos potencialmente productores de micotoxinas	75
2. Estudio crítico y puesta a punto de métodos cromatográficos para la determinación de ocratoxinas, tricotecenos B y patulina en los cultivos <i>in vitro</i> de las especies fúngicas productoras	77
2.1 Cultivos de <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Penicillium</i> <i>expasum</i>	77
2.2 Reactivos y estándares.....	78
2.3 Preparación de disoluciones estándar de las micotoxinas.....	79
2.4 Instrumentación	79
2.5 Determinación de micotoxinas en medios de cultivo	80
2.5.1 Determinación de tricotecenos tipo B en cultivos de grano de trigo	80
2.5.1.1 Extracción y purificación.....	80
2.5.1.2 Derivatización de tricotecenos por GC–ECD	80
2.5.1.3 Determinación de tricotecenos mediante GC–ECD.....	81
2.5.2 Determinación de tricotecenos tipo B en cultivos de grano de maíz	81
2.5.3 Determinación de ocratoxina A en cultivos de grano de trigo.....	81
2.5.3.1 Extracción y purificación.....	81
2.5.3.2 Análisis por cromatografía líquida con detector de fluorescencia	81
2.5.4 Extracción, purificación y determinación de ocratoxina A en medio de cultivo YES suplementado con polen de abeja	82
2.5.5 Determinación de ocratoxina A en medio de cultivo ZUA	82
2.5.6 Determinación de patulina en medio de cultivo YES.....	83
2.5.7 Determinación de patulina en medios de cultivo PDA y ADA.....	83
3. Quimiotipado de los aislados de las especies potencialmente productoras de ocratoxinas, tricotecenos tipo B y patulina	85
3.1. Especies fúngicas y medios de cultivo empleados.	85
3.2 Extracción, purificación y determinación de las micotoxinas	86
4. Estudio de la influencia de los factores fisicoquímicos en el crecimiento de los hongos y en la producción de las micotoxinas	87
4.1 Aislados fúngicos.....	87
4.2 Fungicidas: Formulación de la carbendazima y del sulfato de imazalil	87
4.3 Medios de cultivo y estudios de crecimiento	88

4.3.1 Para <i>Aspergillus carbonarius</i>	88
4.3.2 Para <i>Penicillium expansum</i>	89
4.4 Determinación de micotoxinas	90
4.4.1 Ocratoxina A en los cultivos del aislado de <i>A. carbonarius</i>	90
4.4.2 Patulina en los cultivos del aislado de <i>P. expansum</i>	90
4.5 Análisis estadístico.....	91
5. Diseño y aplicación de modelos de superficie de respuesta para la predicción de la producción de deoxinivalenol por <i>Fusarium graminearum</i> y de ocratoxina A por <i>Aspergillus ochraceus</i> en trigo	92
5.1 Aislados fúngicos.....	92
5.2 Medios de cultivo y estudios de crecimiento	93
5.2.1 Para <i>Fusarium graminearum</i>	93
5.2.2 Para <i>Aspergillus ochraceus</i>	93
5.3 Diseño experimental para la aplicación del modelo de superficie de respuesta.....	94
5.3.1 Factores ecofisiológicos y tratamiento matemático.....	94
5.3.2 Tratamiento de los datos.....	95
5.3.3 Modelo de superficie de respuesta basado en la función de Baranyi (RS–Baranyi)	95
5.3.4 Modelo de superficie de respuesta basado en regresión lineal múltiple (RS–MLR)	97
5.3.5 Validación de modelos.....	98
5.4 Determinación de micotoxinas	98
5.4.1 Deoxinivalenol en los cultivos del aislado de <i>F. graminearum</i>	98
5.4.2 Ocratoxina A en los cultivos del aislado de <i>A. ochraceus</i>	98
5.5 Análisis estadístico.....	98
6. Optimización de la metodología para la determinación de ocratoxina A y tricotecenos B en trigo y derivados, y de patulina en manzana y derivados. Aplicación al estudio de la incidencia de las micotoxinas en estos productos consumidos en España.....	99
6.1 Colección de muestras	99
6.2 Reactivos y estándares.....	100
6.3 Instrumentación	101
6.4 Determinación de tricotecenos tipo B en trigo	101
6.4.1 Extracción.....	101
6.4.2 Purificación con SPE	102
6.4.2.1 Columna de MycoSep 225®.....	102
6.4.2.2 Cartucho de Florisil®	102
6.4.2.3 Mezcla de Celite 545–alúmina–carbón activo	102
6.4.2.3.1 Con desgrasado.....	103
6.4.2.3.2 Sin desgrasado	103
6.4.2.4 Alúmina–carbón activo.....	103
6.4.2.5 Alúmina–carbón activo–C18.....	103
6.4.2.6 Alúmina–carbón activo–sílica	104

6.4.3	Derivatización de los tricotecenos tipo B.....	104
6.4.4	Análisis por GC–ECD.....	104
6.4.5	Confirmación de los tricotecenos por GC–MS.....	105
6.4.5.1	Derivatización de los tricotecenos tipo B.....	105
6.4.5.2	Determinación GC–MS.....	105
6.5	Determinación de tricotecenos tipo B en pan.....	105
6.6	Determinación de ocratoxina A en harina de trigo.....	106
6.6.1	Extracción y purificación para la OTA.....	106
6.6.1.1	Método por inmunofinidad.....	106
6.6.1.2	Método por SPE con mecanismo de intercambio iónico y fase reversa.....	106
6.6.1.3	Método con acetato de cinc y extracción líquido–líquido.....	107
6.6.1.4	Método de SPE con sílica.....	107
6.6.2	Análisis por cromatografía líquida con detector de fluorescencia.....	108
6.6.3	Evaluación de la recuperación y límites de detección.....	108
6.7	Determinación de ocratoxina A en pan.....	108
6.8	Determinación de patulina en zumos y compotas de manzana.....	109
6.8.1	Extracción y Purificación.....	109
6.8.1.1	Procedimiento con extracción líquido–líquido–NaHCO ₃	110
6.8.1.2	Procedimiento con SPE con cartucho C18.....	110
6.8.1.3	Procedimiento de Arranz modificado.....	110
6.8.1.4	Procedimiento de MacDonalld.....	111
6.8.1.5	Procedimiento con extracción líquido–líquido y NaH ₂ PO ₄	111
6.8.1.6	Procedimiento con extracción líquido–líquido y NaH ₂ PO ₄ y SPE de sílica.....	112
6.8.1.7	Procedimiento extracción líquido–líquido y NaH ₂ PO ₄ y SPE de C18.....	112
6.8.2	Determinación de patulina por cromatografía líquida.....	112
6.8.3	Validación de métodos analíticos.....	113
7.	Estudio de la estabilidad de los tricotecenos tipo B y ocratoxina A en el proceso de elaboración del pan.....	114
7.1	Reactivos y estándares.....	114
7.2	Preparación de disoluciones estándar.....	115
7.3	Proceso de contaminación de las muestras.....	115
7.4	Preparación de la masa y horneado del pan.....	116
7.5	Determinación de tricotecenos.....	116
7.6	Determinación de ocratoxina A.....	116
7.7	Estadística.....	116
8.	Método de multidetección de micotoxinas mediante LC–MS en harina de trigo..	117
8.1	Reactivos y estándares.....	117
8.2	Preparación de disoluciones estándar.....	117
8.3	Extracción.....	118
8.4	Análisis por cromatografía líquida y espectrometría de masas.....	118

8.4.1 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de simple cuadropolo y trampa de iones	118
8.4.1.1 Sistema cromatográfico.....	118
8.4.1.2 Detección por espectrometría de masas	119
8.4.2 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de triple cuadropolo	120
8.4.2.1 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de triple cuadropolo	120
8.4.2.2 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de triple cuadropolo de última generación.....	120
8.5 Tratamiento de datos.....	121
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	123
1. Estudio de la microbiota presente en trigo y manzana.....	123
1.1 Microbiota del trigo.....	123
1.2 Microbiota de la manzana	127
2. Estudio crítico y puesta a punto de métodos cromatográficos para la determinación de ocratoxinas, tricotecenos B y patulina en cultivos <i>in vitro</i> de las especies fúngicas productoras.....	130
3. Quimiotipado de los aislados de las especies potencialmente productoras de ocratoxinas, tricotecenos tipo B y patulina	133
3.1 Ocratoxinas en medio YES suplementado con polen de abeja.....	133
3.2 Tricotecenos tipo B en los cultivos en granos de maíz.....	135
3.3 Patulina en medio YES	136
4. Estudio de la influencia de los factores fisicoquímicos en el crecimiento de los hongos y en la producción de las micotoxinas.	137
4.1 Crecimiento de <i>Aspergillus carbonarius</i> y producción de OTA	137
4.1.1 Fase de inicio (fase lag).....	137
4.1.2 Velocidad de crecimiento	138
4.1.3 Acumulación de OTA.....	140
4.2 Crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> y producción de PAT.....	143
4.2.1 Fase de inicio del crecimiento.....	143
4.2.2 Velocidad de crecimiento	146
4.2.3 Acumulación de PAT.....	150
5. Diseño y aplicación de modelos de superficie de respuesta para la predicción de la producción de deoxinivalenol por <i>Fusarium graminearum</i> y de ocratoxina A por <i>Aspergillus ochraceus</i> en trigo	159
5.1 Producción de deoxinivalenol en trigo por <i>F. graminearum</i>	159
5.1.1 Análisis de la varianza	159
5.1.2 Modelos predictivos para la acumulación de deoxinivalenol en trigo	159
5.1.2.1 Modelo de RS–Baranyi	159
5.1.2.2 Modelo de RS–MLR.....	167
5.1.2.3 Validación de modelos predictivos para la acumulación de deoxinivalenol.....	168
5.2 Acumulación de ocratoxina A en trigo por inoculación de <i>A.</i> <i>ochraceus</i>	170

5.2.1	Análisis de la varianza	170
5.2.2	Modelos predictivos para la acumulación de ocratoxina A en trigo	170
5.2.2.1	Modelo de RS–Baranyi	170
5.2.2.2	Modelo de RS–MLR.....	179
5.2.2.3	Validación de modelos predictivos para la acumulación de ocratoxina A.....	181
6.	Optimización de la metodología para la determinación de ocratoxina A, tricotecenos B y de patulina en cereales y frutas. Análisis de muestras alimentarias	183
6.1	Determinación de tricotecenos tipo B en trigo	183
6.1.1	Procedimientos de purificación por SPE	183
6.1.2	Derivatización y condiciones de GC	186
6.2	Determinación de ocratoxina A en harina de trigo	189
6.3	Incidencia de los tricotecenos tipo B y ocratoxina A en trigo y harina de trigo.....	194
6.3.1	Incidencia de tricotecenos tipo B.....	194
6.3.2	Incidencia de ocratoxina A en trigo y harina de trigo	197
6.4	Determinación e incidencia de tricotecenos tipo B y ocratoxina A en pan	199
6.4.1	Límites de detección y valores de recuperación.....	199
6.4.2	Incidencia de micotoxinas en pan.....	199
6.5	Comparación y optimización de métodos para de determinación de patulina en zumo y puré de manzana	202
6.5.1	Comparación de procedimientos de análisis de zumo de manzana.....	202
6.5.2	Comparación de procedimientos para el análisis de puré y compota de manzana	208
6.5.3	Incidencia de patulina en muestras de manzana.....	209
7.	Estudio de la estabilidad de los tricotecenos tipo B y ocratoxina A en el proceso de elaboración del pan	212
7.1	Efecto de la fermentación de la masa del pan.....	212
7.2	Efecto del horneado de la masa del pan	214
7.3	Efecto del horneado sobre el contenido de micotoxinas en el interior y exterior del pan.....	218
8.	Multidetección de micotoxinas mediante LC–MS en harina de trigo	221
8.1	Determinación de micotoxinas mediante LC y espectrometría de masas de trampa de iones	221
8.2	Determinación de micotoxinas mediante LCy espectrometría de masas simple cuadrupolo.....	224
8.3	Determinación de micotoxinas mediante LC y espectrometría de masas de triple cuadrupolo.....	228
8.4	Determinación de micotoxinas mediante LC y espectrometría de masas de triple cuadrupolo de última generación	232
V	SUMMARY	237
1.	Introduction	237
1.1	Fungi.....	237

1.2 Type–B trichothecenes	239
1.3 Ochratoxins	241
1.4 Patulin	243
1.5 Legislation	244
2. Aims	245
3. Results and discussion	246
3.1 Mycobiota study in wheat and apple	246
3.1.1 Related mycobiota in wheat grains	246
3.1.2 Related mycobiota in apple	246
3.2 Critical study and optimization of chromatographic methods for ochratoxin, type–B trichothecene and patulin determination <i>in vitro</i> culture media of the main producing fungal species.....	246
3.3 Evaluation of the potentially producing species of ochratoxins, type–B trichothecenes and patulin	247
3.3.1 Ochratoxins in YES medium supplemented with bee pollen.....	247
3.3.2 Type–B trichothecenes in grains of maize.....	247
3.3.3 Patulin in YES medium	248
3.4 Study of the influence of the physicochemical factors on the mycelial growth and mycotoxin production.....	248
3.4.1 Growth of <i>Aspergillus carbonarius</i> and OTA production.....	248
3.4.1.1 Lag phase.....	248
3.4.1.2 Growth rate	248
3.4.1.3 OTA accumulation.....	249
3.4.2 Growth of <i>Penicillium expansum</i> and PAT production	250
3.4.2.1 Lag phase.....	250
3.4.2.2 Growth rate	250
3.4.2.3 PAT accumulation.....	251
3.5 Design and application of response surface models to predict deoxynivalenol accumulation by <i>Fusarium graminearum</i> and ochratoxin A accumulation by <i>Aspergillus ochraceus</i> in wheat.....	252
3.5.1 Deoxynivalenol accumulation in wheat by <i>Fusarium graminearum</i> inoculation. Predictive models	252
3.5.1.1 RS–Baranyi Model	252
3.5.1.2 RS–MLR model	254
3.5.1.3 Validation of predictive models for the deoxynivalenol accumulation	254
3.5.2 Ochratoxin A accumulation in wheat by <i>Aspergillus ochraceus</i> inoculation. Predictive models	254
3.5.2.1 RS–Baranyi model.....	254
3.5.2.2 RS–MLR Model.....	256
3.5.2.3 Validation of predictive models for the ochratoxin A accumulation	257
3.6 Optimization of the methodology for determining ochratoxin A and type–B trichothecenes in wheat and wheat products, and patulin in apple and apple products. Analysis of foodstuffs in Spain	257

3.6.1	Analysis of type-B trichothecenes in wheat	257
3.6.1.1	SPE clean-up procedures	257
3.6.1.2	Derivatization and GC conditions.....	258
3.6.2	Analysis of ochratoxin A in wheat flour	258
3.6.3	Occurrence of type-B trichothecenes and ochratoxin A in wheat grain and wheat flour	259
3.6.4	Analysis and occurrence of type-B trichothecenes and ochratoxin A in bread.....	259
3.6.5	Comparison and optimization of methods for patulin determination in apple juices and apple purees	259
3.6.5.1	Comparison of procedures for apple juice	259
3.6.5.2	Comparison of procedures for solid products of apple.....	260
3.6.5.3	Occurrence of patulin in apple samples.....	260
3.7	Stability study of OTA and type-B trichothecenes for baking process	261
3.7.1	Effect of the dough fermentation process	261
3.7.2	Effect of the baking process	261
3.7.3	Effect of the baking process inside and outer of the bread	261
3.8	Mycotoxin multi-detection method in wheat flour by LC-MS.....	261
3.8.1	Determination by LC-ion trap MS	261
3.8.2	Determination by LC-Single quadrupole MS.....	262
3.8.3	Determination by LC-triple quadrupole MS.....	262
3.8.4	Determination by last generation of LC-triple quadrupole MS	263
VI	CONCLUSIONS / CONCLUSIONES	265
VII	BIBLIOGRAFÍA	271

I INTRODUCCIÓN

1. Consideraciones históricas previas

“La mañana es algo fría, pero el tiempo está mejorando, de hecho, hemos dejado atrás la época invernal y empieza el tiempo de lluvias donde nuestras cosechas comienzan a florecer. Pero para comer algo durante el próximo invierno las cosechas deberán de ser abundantes y estar en buenas condiciones. Hoy es el día en que las plegarias y los sacrificios al dios Robigus deben de dar su fruto y sirvan para proteger a los granos y árboles que nos mantienen”. Aunque este relato sea ficticio ya en los siglos VII y VIII a.C. se instauró en Roma el festival de la Robigalia en honor al dios Robigus, a quien era necesario hacer un sacrificio para que no atacara los campos de mieses y que en su lugar protegiera el grano y los árboles. Según parece se celebraba el 25 de abril, por ser la época del año en la que era más probable que las cosechas resultaran atacadas por las royas o el mildiu (Smith 1875).

Desde el principio de los tiempos los seres humanos y los animales han estado expuestos a riesgos relacionados con su alimentación. Y desde el principio de los tiempos se han tomado medidas para minimizar estos riesgos. En la actualidad entre otras sustancias tóxicas, son las micotoxinas las que atraen una especial atención. Pero, ¿qué son las micotoxinas? Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos, que producen efectos perjudiciales en seres humanos y animales. Dichos efectos sobre la salud se conocen como micotoxicosis, su gravedad depende de la micotoxina, de la vía y grado de exposición, de la edad y el estado nutricional del individuo y de los posibles efectos sinérgicos o antagónicos entre diferentes micotoxinas u otros agentes químicos a los que este expuesto. Si bien hay más investigaciones sobre micotoxicosis en animales, la evidencia existente es suficiente para reconocer que las micotoxinas están involucradas como agentes etiológicos en enfermedades y síndromes en humanos y animales de diversa gravedad. Las micotoxicosis pueden manifestarse en forma aguda o crónica, desde una muerte rápida hasta la formación de un tumor generalmente en órganos del sistema digestivo; también pueden producir otras enfermedades, como neuropatías, nefropatías, afecciones cutáneas, alteración de la fertilidad y de procesos relacionados con el sistema inmunológico, tornando a los pacientes más susceptibles a las enfermedades infecciosas.

La mejor manera de conocer el nivel de las diferentes micotoxinas que se ingieren en la dieta es la determinación de estas micotoxinas en las materias primas y alimentos derivados listos para el consumo. Para la determinación adecuada de estos compuestos tóxicos es necesaria la utilización de métodos analíticos sensibles, fiables y reproducibles. El

diseño de estos métodos y su validación es un compromiso de la comunidad científica para con la sociedad. Las autoridades sanitarias deben velar por su aplicación a través de estrictas medidas legislativas y reglamentaciones que garanticen el consumo de alimentos libres de micotoxinas.

Las micotoxinas como agentes asociados a eventos de enfermedades en humanos se remontan a la antigüedad. Marr y Malloy, postulan que algunas de las 10 plagas mencionadas en La Biblia pueden haberse producido por micotoxinas, incluso la última de esas plagas, que señala la muerte de los primogénitos de las familias, pudo haberse producido por el consumo de cereal altamente contaminado con tricotecenos (un grupo de micotoxinas) producidos por la especie *Stachybotrys chartarum*. Por razones culturales primeramente se permitía el acceso al alimento a los hombres e hijos varones, consumiendo éstos altas dosis de toxinas que pudieron haber provocado hemosiderosis y hemorragias letales (Marr y Malloy 1996).

Las intoxicaciones causadas por el cornezuelo de centeno son tristemente famosas sobre todo por el ergotismo. Los testimonios más antiguos se remontan a la época de los asirios (s. VI a.C.). Algunos investigadores sostienen que el brebaje consumido por los participantes en los antiguos misterios griegos de los eleusinos, llamado “*kykeon*” y elaborado a partir de poleo y cebada, podría haber producido en los participantes diversos efectos alucinógenos atribuibles al cornezuelo de centeno.

En la Edad Media, cuando surgían epidemias del ergotismo (Murray *et al.* 1992), también se observaban multitud de abortos en las mujeres embarazadas. De este hecho, las comadronas dedujeron que las contracciones uterinas eran causadas por el cornezuelo del centeno y comenzaron a usarlo para aumentar la contracción del útero. Se obtenía de moler los granos visiblemente contaminados con el hongo para administrarlo en forma de polvo, llegándose a denominar *pulvis ad partum* (el polvo del nacimiento). Se utilizó extensamente por las comadronas de Alemania, y fue primeramente descrito por Adán Lonicer en su libro de herbario en 1582 (Moir 1995). Aunque una ingesta limitada del cornezuelo de centeno proporcionaba valores medicinales, sin embargo el consumo excesivo demostró ser fatal, de hecho el ergotismo, ha matado a miles de personas en Europa. Durante mucho tiempo, la gente detestó el cornezuelo de centeno. La mayoría creía que el cornezuelo de centeno era, de hecho, un núcleo malformado del grano del centeno. Correlacionaron un aumento en cornezuelo de centeno con un aumento de la lluvia y pensaron que quizás ocurría un cierto tipo de proceso de fermentación. El correr de los tiempos, hizo variar las teorías referentes al cornezuelo de centeno. Hasta que, en 1815, Augustin Pyramus de Candolle (1778–1841) de Ginebra identificó el cornezuelo de centeno como un hongo, aunque la controversia continuo existiendo durante muchos años.

El ergotismo era conocido como fuego sagrado o fuego de San Antonio. San Antonio Abad vivió desde 251 hasta 356 de nuestra era en Egipto. Era un ermitaño y fue el fundador de la vida monástica. No deseó nunca ser incomodado, incluso pidió que sus seguidores (tenía dos discípulos) lo

enterraran en una tumba anónima. Sus discípulos hicieron lo pedido y su emplazamiento continuó siendo secreto durante más de doscientos años. Por una supuesta revelación divina se encontró el lugar donde descansaban las reliquias de San Antonio y sus restos se trasladaron a varios lugares hasta que terminaron en Francia. San Antonio era considerado como milagroso porque a la sazón, se creía que una peregrinación al santuario santo (s. XIII–XVI) aliviaría la intensa sensación de quemazón asociada a la gangrena que padecían las personas afectadas, siendo probable que el alivio fuera real, pues los peregrinos no consumían centeno contaminado durante el camino (Hardman *et al.* 1996). El cornezuelo del centeno puede producir necrosis, de ahí esa sensación de quemazón que podía llevar a la pérdida de extremidades, hecho documentado en la pintura “Los Mendigos” (Figura 1) de Pieter Bruegel “El Viejo”, que actualmente está expuesta en el Museo del Louvre.

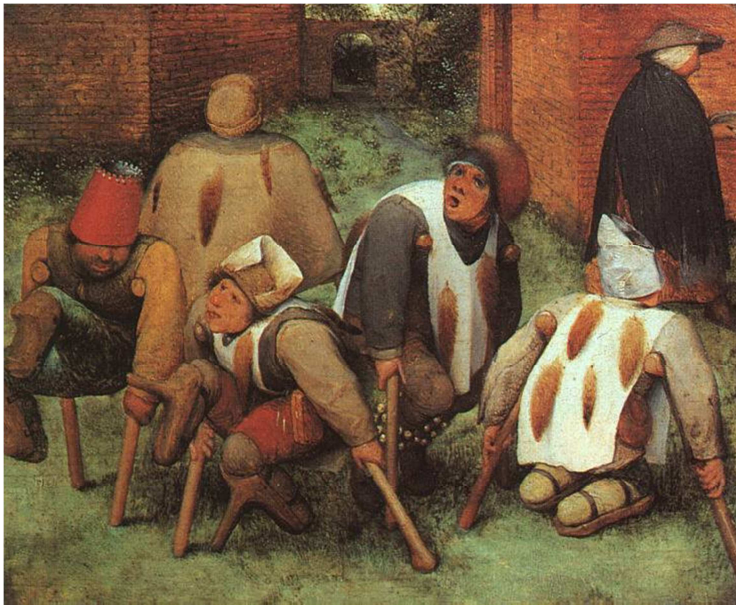


Figura 1. “Los Mendigos” (Pieter Bruegel, 1568).

Incluso, se especula que los “Juicios de las brujas de Salem” en la antigua colonia británica de Nueva Inglaterra en 1692 pudieron ser desencadenados por algunas jóvenes que habían consumido centeno contaminado. Se ha sugerido que las víctimas de estos ensayos sufrían realmente de ergotismo. Según la historiadora Mary Matossian, los síntomas que presentaban las jóvenes que incluían sensaciones de picor o de hormigueo por la piel, distorsiones de la cara, parálisis, alucinaciones, asimientos convulsivos y demencia concuerdan con los síntomas de ergotismo (Matossian 1982).

Más recientemente, también han habido casos de ergotismo: en 1926 en la URSS y en 1951 en Francia (caso del “pan maldito” en el pueblo de Pont

Saint Esprit). En todos los casos, se trataba de envenenamientos masivos que alcanzan a toda una población.

El cornezuelo de centeno es un hongo parásito de la especie *Claviceps purpurea*. Aparece comúnmente en el centeno, aunque también se ha encontrado en otros cereales como una excrescencia de color púrpura oscura (Figura 2). El cornezuelo, entre otros compuestos, contiene alcaloides del grupo ergolina. Todas estas sustancias tienen un amplio espectro de acción en el cuerpo, incluido efecto vasoconstrictor a nivel circulatorio o de neurotransmisión, que ocasionan la gangrena de las extremidades. Hay que añadir la toxicidad sobre el sistema nervioso central que se manifiesta por convulsiones, estados depresivos, vómitos, temblores y alucinaciones similares a las observadas con el LSD (derivado de la ergotamina, un componente del cornezuelo) (Robinson 1981).



Figura 2. Cornezuelo del centeno (esclerocios).

Probablemente el más reciente brote de ergotismo afectando a humanos ocurrió en China durante el período 1984–1985 (Coker 2000).

Otro hecho histórico relacionado con micotoxinas se encuentra en los tricotecenos producidos por el género *Fusarium*. Fue un episodio acaecido en los años 30 y años 40 del siglo XX en la URSS en donde, por ejemplo en 1944 en el distrito de Orenburg (Rusia), la mortalidad alcanzó hasta el 80% de la población afectada por aleucia tóxica alimentaria, caracterizada por una atrofia total de la médula (Mongi 1987).

Otros episodios importantes asociados a enfermedades en humanos en poblaciones geográficamente definidas fueron el síndrome de beri beri cardíaco agudo producido por la citreoviridina (síndrome del arroz amarillo o *shoshin-kakke* en japonés), que desapareció tras suprimirse de los mercados el arroz mohoso. La citreoviridina es un producto metabólico de la especie *Penicillium citreonigrum*, que crece rápidamente en el arroz

almacenado tras la cosecha, sobre todo en las regiones más frías de Japón (Calvo 2007). Otro episodio fue la nefropatía endémica de los Balcanes, relacionada con la micotoxina ocratoxina A, con ocurrencia en la región homónima (Radic *et al.* 1997).

El interés general por las micotoxinas aumentó en 1960, cuando se declaró una enfermedad hepática en animales de granja en Gran Bretaña que diezmó a la población de pavos por una micotoxicosis transmitida por el pienso. La misteriosa enfermedad denominada "Enfermedad X de los Pavos" causó la muerte de más de cien mil pavos, de la que más tarde se comprobó que era causada por aflatoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*. Los inspectores oficiales británicos trazaron la fuente de la micotoxina en un embarque de harina de cacahuete de Brasil. Se descubrió ulteriormente que estas toxinas son hepatocarcinogénicas en animales y seres humanos, lo que fomentó la investigación sobre las micotoxinas. Después del descubrimiento de la aflatoxina (acrónimo de *Aspergillus flavus* toxin) en 1961, los métodos de cultivo confirmaron que solamente el 30 % de las cepas de *Aspergillus flavus* son toxigénicas y por lo tanto los métodos microbiológicos no sirven para confirmar la presencia de las micotoxinas (Bradburn 1994).

Uno de los últimos hechos relacionados con la contaminación masiva con micotoxinas tuvo lugar en 2004 en Kenia donde 125 personas murieron y casi otras 200 se trataron después de comer maíz contaminado con aflatoxinas. Las muertes se asociaron principalmente al maíz de cosecha propia que no había sido tratado con fungicidas ni había sido secado correctamente antes de almacenarse. Debido a las escaseces del alimento en ese momento, los granjeros pudieron haber cosechado el maíz antes de lo normal para prevenir hurtos en sus campos, de modo que el grano no estaría lo suficientemente maduro y sería más susceptible a la infesta por el hongo (Lewis *et al.* 2005).

A pesar de todo lo indicado hasta ahora, de los hongos también se obtienen beneficios, por ejemplo existe una larga tradición de usos de algunos hongos para producir queso y salami, así como en la fermentación de cerveza y vino. También se emplean en la fabricación de fármacos (antibióticos como la penicilina, cloranfenicol, estreptomycin, anfotericina B) (Arenas 1993). La clasificación de los metabolitos de los hongos como antibióticos o como micotoxinas se basa en su toxicidad o en sus efectos terapéuticos. Algunos metabolitos de los hongos considerados inicialmente como antibióticos, por ejemplo la citrinina resultaron luego ser muy tóxicos, y en la actualidad se clasifican como toxinas. Todavía hoy se utilizan los alcaloides del cornezuelo del centeno, entre otras aplicaciones terapéuticas, en el parkinsonismo, como inhibidores de la prolactina, en la insuficiencia cerebro vascular, la migraña, la insuficiencia venosa, las trombosis y embolias, como estimulantes del metabolismo cerebral y periférico, como estimulantes uterinos y como agonistas dopaminérgicos (Peraica *et al.* 1999).

2. Hongos

2.1 Situación taxonómica

El estudio de su estructura celular, así como los análisis bioquímicos y la descripción de sus vías metabólicas y ciclos de reproducción, revelan una serie de características distintivas particulares que llevó a proponer que en su clasificación se le considerara como un reino aparte, el *Fungi*. Este reino está formado por varios grupos de seres vivos entre los que se incluyen setas, royas, tizones, bejines, trufas, morillas, mohos y levaduras, así como muchos organismos menos conocidos (Alexopoulos *et al.* 1996). Los organismos del Reino *Fungi* constituyen un variado grupo de seres vivos ampliamente distribuidos en la naturaleza, cuyo número descrito se estima en cerca de setenta mil especies; sin embargo, algunas estimaciones de números totales sugieren que pueden existir 1.5 millones de especies (Hawksworth *et al.* 1995). En ocasiones, la identificación de los hongos filamentosos a nivel de especie se puede llevar a cabo mediante el estudio de sus características morfológicas, pero por lo general, es necesario el estudio de características fisiológicas y genéticas. Estas últimas están siendo empleadas cada vez con mayor frecuencia permitiendo detectar identificaciones erróneas que pueden llevar consigo una reclasificación general, especialmente de las especies productoras de micotoxinas.

2.2 Biogeografía

En los lugares donde la humedad, temperatura, y los sustratos orgánicos son adecuados, los hongos están presentes. Aunque se piensa normalmente en el crecimiento de hongos en bosques cálidos y húmedos, muchas especies sobreviven en los hábitats que son fríos, periódicamente áridos, o de otra manera aparentemente inhospitalaria. Es importante, sin embargo, reconocer que las condiciones óptimas para el crecimiento y la reproducción varían extensamente con cada especie fúngica. La diversidad de la mayoría de los grupos de hongos tiende a aumentar en regiones tropicales (Isaac *et al.* 1993).

2.3 Morfología

Los hongos son organismos pluricelulares, rara vez unicelulares, formados por células eucariotas carentes de cilios, flagelos y clorofila, de forma filamentosas o levaduriformes, siendo su característica, como organismos pluricelulares, el que su célula sea alargada (hifa), rodeada ésta, por una pared celular constituida por quitina, un polisacárido complejo aminado presente también en el esqueleto externo de los insectos y crustáceos (Alexopoulos *et al.* 1996).

La célula filamentosas, originada a partir de una espora, en su inicio presenta crecimiento por un extremo, detrás del cual suele ramificarse

llegando a formar una red de hifas que reciben el nombre de micelio (Figura 3).

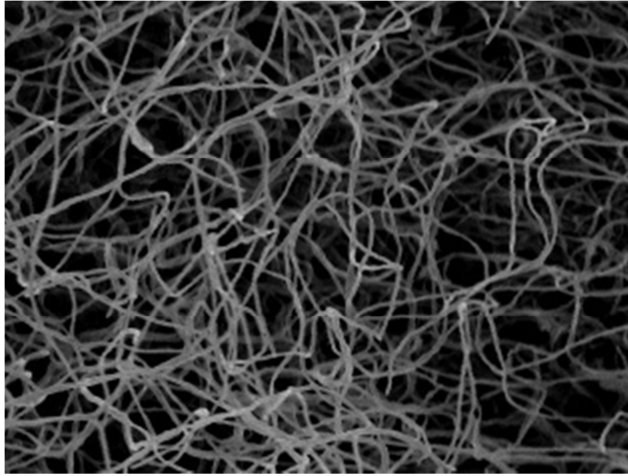


Figura 3. Micelio fúngico observado por microscopía electrónica de barrido.

El micelio extendido por el sustrato constituye una colonia que se puede apreciar como una malla floja de hifas, en el caso de los mohos, o bien de forma muy compacta como un cuerpo fructífero como en los hongos superiores. Esta disposición del micelio, así como sus estructuras reproductoras, el tipo de esporas, las ornamentaciones y la coloración que presentan se emplean en las tareas de clasificación de las diversas especies de hongos que hay en la naturaleza.

3. Micotoxinas y hongos productores

3.1 Micotoxinas: definición y generalidades

Como se ha comentado anteriormente las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por numerosas especies fúngicas. Como definición se puede indicar que las micotoxinas son productos naturales producidos por los hongos que provocan una respuesta tóxica cuando son administrados en baja concentración en vertebrados y otros animales por una ruta natural, siendo el envenenamiento por sustancias tóxicas de origen fúngico denominado micotoxicosis (Bennet 1987, Swanson 1987). Algunos hongos pueden producir más de una micotoxina y algunas micotoxinas son producidas por más de una especie de hongo, en consecuencia, varias micotoxinas a menudo se encuentran simultáneamente en un mismo producto. Además, existen ciertos sustratos que evidentemente son más adecuados para la producción de estas toxinas (Bhat 1991).

El metabolismo primario de los mohos es similar al de la mayoría de organismos eucarióticos. Los metabolitos secundarios son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario. Sólo algunos hongos tienen capacidad de producir micotoxinas, y las generan cuando no cuentan con los nutrientes adecuados por lo que necesitan competir por los mismos con las bacterias y otros hongos, normalmente la mayor producción se produce bajo condiciones sub-óptimas y de estrés (Swanson 1987), debido por ejemplo al agotamiento de los nutrientes principales, por lo que el hongo para sobrevivir, necesita utilizar los metabolitos resultantes. Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de parámetros nutricionales y ambientales, sino también de la historia previa del desarrollo del moho. La formación de micotoxinas refleja que el moho ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y a veces morfológica (Moss 1991b).

La mayoría de las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas con una estructura química y actividad biológica muy diversa (Abarca 2000). Se conocen entre 350 a 400 metabolitos de los hongos con características toxigénicas, de los cuales aproximadamente una docena de grupos se les presta mayor atención por su incidencia y toxicidad para la salud humana y animal (Cole y Cox 1981). Las primeras de las que se tienen referencias en cuanto a sus características estructurales son las aflatoxinas (Betina 1989).

Mientras que todas las micotoxinas son de origen fúngico, no todos los compuestos tóxicos producidos por los hongos se denominan micotoxinas. El objetivo y la concentración del metabolito son importantes. Los productos fúngicos que son principalmente tóxicos para las bacterias (tales como penicilina) generalmente se llaman antibióticos. Los productos fúngicos que son tóxicos para las plantas son llamados fitotoxinas por los patólogos de plantas (confusamente, del término phytotoxin puede también referirse a las toxinas producidas por las plantas) (Graniti 1972). Las micotoxinas son tóxicas para los vertebrados y para otros grupos animales en concentraciones bajas. Otros metabolitos fúngicos de bajo peso molecular como el etanol que son tóxicos solamente en altas concentraciones no se consideran micotoxinas (Bennett 1987). Finalmente, aunque los componentes tóxicos de setas venenosas son definitivamente metabolitos fúngicos que pueden causar enfermedad y muerte en seres humanos y otros animales, se excluyen arbitrariamente de discusiones de micotoxicología. Los hongos filamentosos (mohos) producen micotoxinas; las setas venenosas y otros hongos macroscópicos producen compuestos venenosos. La distinción entre una micotoxina y un veneno de la seta se basa no solamente en el tamaño del hongo que la produce, sino también en la intención humana. La exposición a la micotoxina es casi siempre accidental. En contraste, a excepción de unas pocas muertes logradas de manera intencionada, los venenos de la seta son generalmente ingeridos por los recolectores aficionados que recogen, cocinan, y comen setas que se interpretaron equivocadamente como especies deliciosas (Moss 1996a).

Las micotoxinas con mayor interés para la salud pública y con mayor importancia agroeconómica incluyen las aflatoxinas, las ocratoxinas, los tricotecenos, la zearalenona, las fumonisinas y los alcaloides del cornezuelo de centeno (Hussein y Brasel 2001, IARC 1993). Sin embargo, recientemente, otras toxinas han atraído la atención como la patulina (Galvano *et al.* 2001). Esta lista aunque aparentemente corta implica una vasta gama de problemas científicos así como desafíos debidos a la naturaleza del hongo, especies cultivadas y las toxinas implicadas.

Además, los problemas sobre la salud provocados por las micotoxinas implican una serie pérdidas económicas en diversas áreas de la vida debido a un incremento del cuidado médico y de los costes veterinarios, reducción en la producción ganadera y de productos cultivados, así como un suplemento adicional de medios y mano de obra, una disminución del valor nutricional del alimento, una disposición del alimento contaminado, e inversión en la investigación para reducir el problema de las micotoxinas (Boutrif y Canet 1998, Charmley *et al.* 1995, Hussein y Brasel 2001, Shane 1994).

3.2 Hongos productores de micotoxinas

La presencia de hongos en los cultivos puede dar lugar a la aparición de toxinas, cuyas especies más peligrosas pueden afectar en forma grave a los animales y a los seres humanos. Estos hongos incluyen especies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y otros hongos endofíticos que son potencialmente productores de micotoxinas (Galán Alejo y Rodríguez Jerez 2003).

Las micotoxinas son específicas de la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, cuanto más compleja es ésta, más restringido es el número de especies de hongos productores de micotoxinas. Las esporidesminas son producidas solamente por *Pithomyces chartarum*. La aflatoxina B₁ es producida por tres especies estrechamente relacionadas *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius* y *A. flavus*. La patulina es producida por unas once especies de *Penicillium*, tres de *Aspergillus* y dos de *Byssoschlamys* (Hocking 1997, Moss 1991b).

La variabilidad en la producción de metabolitos secundarios por una especie dada es enorme (Kale 1992). *Penicillium roqueforti* produce algunas micotoxinas en las condiciones de laboratorio pero no en los quesos madurados. Los rendimientos de toxina T-2 por cepas de *Fusarium sporotrichioides* varían considerablemente cuando crecen en el laboratorio, y no todas las cepas de *A. flavus* son aflatoxinogénicas (Moss 1991b).

La presencia de los hongos toxigénicos en cultivos ha sido históricamente dividida en dos grupos bien definidos. El primero incluye a los hongos que invaden y producen las toxinas antes de la propia cosecha, que son conocidos como hongos de campo, y los que invaden los cultivos, pero la producción de toxinas es posterior a la cosecha según las condiciones de almacenamiento, son los denominados hongos de almacenamiento (Miller 1995).

Tabla 1. Algunas micotoxinas y principales especies fúngicas productoras.

Micotoxinas	Algunas especies productoras
Ácido penicílico	<i>Aspergillus ochraceus, Penicillium simplicissimum</i>
Ácido secalónico D	<i>Penicillium oxilacum, Claviceps purpurea</i>
Aflatoxinas	<i>Aspergillus Flavus, A. nomimus, A. parasiticus</i>
Alternarioles	<i>Alternaria alternata</i>
Citrinina	<i>Penicillium citrinum, P. verrucosum</i>
Citroviridina	<i>Aspergillus terreus, Penicillium citreonigrum</i>
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor, Eurotium amstelhami</i>
Fumonisin	<i>Fusarium nygamai, F. proliferatum, F. verticilloides, Alternaria arborescens</i>
Luteoskirina	<i>Penicillium islandicum</i>
Moniliformina	<i>Fusarium mygamae, F. taylorii, F. proliferatum</i>
Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae, A. carbonarius, Penicillium verrucosum</i>
Patulina	<i>Penicillium expansum, P. griseofulvum, P. roqueforti</i>
Zearalenona	<i>Fusarium equiseti, F. graminearum</i>
Ácido ciclopiazónico	<i>Aspergillus flavus, A. tamarii, Penicillium commune</i>
Alcaloides del cornezuelo	<i>Claviceps purpurea</i>
Bovericina	<i>Fusarium proliferatum, F. subglutinans, F. verticilloides</i>
Citocalasinas	<i>Aspergillus terreus, Phoma medicaginis</i>
Eslaframina	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Roquefortinas	<i>Penicillium roqueforti</i>
Fusaproliferina	<i>Fusarium proliferatum, F. subglutinans</i>
Paspalinina	<i>Claviceps paspali</i>
Penitrem A	<i>Penicillium custosum</i>
Tricotecenos	<i>Fusarium culmorum, F. graminearum, F. equiseti, F. sporotrichoides, F. poae, Myrothecium roridum, Stachybotrys chartarum</i>
Ácido tenuazoico	<i>Alternaria arborescens, Alternaria tenuissima</i>
Rubratoxinas	<i>Penicillium purpurogenum</i>

La colonización de las partes aéreas de las plantas por los microorganismos comienza tan pronto como son expuestas al aire. Las bacterias suelen aparecer primero, luego las levaduras y finalmente los hongos filamentosos saprofitos y patógenos. Los mohos continúan desarrollándose a lo largo de todo el crecimiento de la planta, y se acentúa cuando la planta envejece y las semillas maduran. La cosecha perturba el ecosistema y las condiciones

relativamente estables de almacenamiento entrañan un profundo cambio en la composición de la microbiota (Lacey 1989). Los hongos abandonados en el campo suelen albergar esclerocios, como en el caso de *Aspergillus flavus*, que serán la fuente de contaminación del cultivo en la temporada siguiente (Kale y Bennett 1992).

El crecimiento fúngico continúa en los productos frescos después de la cosecha y causa lesiones que desfiguran el aspecto de frutas y hortalizas. En los granos de cereales los hongos persisten solamente si el grano está suficientemente seco como para evitar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente (Christensen 1987).

Las especies fúngicas que deterioran los productos vegetales adquiridos en el campo como por ejemplo las pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* y otros, además de los fitopatógenos, difieren según el vegetal, el clima y la región geográfica (Christensen 1987, Lacey 1989). Otros hongos presentes en los productos almacenados son especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos xerófilos (Lacey 1989).

3.3 Factores que influyen en la producción de micotoxina

Como se ha comentado la presencia de las micotoxinas en los productos alimenticios está sujeta a la influencia de factores ambientales, tales como humedad y temperatura; la contaminación de los productos alimenticios con micotoxinas puede variar según las condiciones geográficas, la susceptibilidad del cultivo, los daños mecánicos o los producidos por insectos y/o pájaros, los métodos de producción y almacenamiento, y el tipo de sustrato, puesto que algunos de ellos son más aptos que otros para el crecimiento fúngico (Cole y Cox 1981).

Básicamente, y más allá del estadio de la cadena alimentaria que se esté analizando se puede presentar el problema de la contaminación de tal manera que los hongos filamentosos, bajo condiciones ambientales favorables, colonizan sintomática o asintómicamente un vegetal pudiendo conducir esta interacción a la producción de micotoxinas.

3.3.1 Factores abióticos

3.3.1.1 Sustrato

El sustrato y el tipo de componentes nutricionales del mismo son un factor determinante en la posible biosíntesis de micotoxinas, tanto en productos naturales como en medios sintéticos y ejercen un claro efecto sobre la producción de micotoxina. Según el estudio de Madhyastha *et al.* (1990), se concluye que en la especie *A. ochraceus* la producción de ocratoxina A (OTA), una micotoxina, se ve favorecida en leguminosas como el cacahuete o la soja frente a los cereales. Para cada cereal existen, además, diferencias en cuanto a la acumulación de OTA entre las distintas variedades (Chelkowsky *et al.* 1981, Häggblom y Ghosh 1985). Así, en trigo parece que la acumulación de OTA es mayor en las variedades con más contenido

proteico sin embargo, las variedades de cebada que presentan menos proteína alrededor de los gránulos de almidón y mayor cantidad de amilosa parecen acumular mayor concentración de OTA. La contaminación por diferentes especies fúngicas en los granos de cereales puede comportar cambios en su calidad nutricional.

La composición del medio de cultivo es un factor que afecta tanto al crecimiento del hongo como a la producción de micotoxinas. Sin embargo, las condiciones que favorecen a uno u otro no siempre coinciden (Davis *et al.* 1999, Häggblom y Ghosh 1985). Algunos componentes del medio hacen aumentar el crecimiento proporcionalmente a su concentración, dejando la producción de micotoxina prácticamente estable e incluso disminuyéndola, como se observó en el estudio de Davis *et al.* (1999) con la concentración de extracto de levadura en cultivos de *A. ochraceus*.

3.3.1.2 Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) del sustrato quizá es el factor más importante y limitante en la colonización fúngica de un determinado sustrato y tiene gran importancia en cuanto a la producción de metabolitos por el hongo (Corry 1987, Belli *et al.* 2005).

La a_w es la relación entre la presión de vapor de agua del sustrato de cultivo y la presión de vapor del agua pura a una determinada temperatura, o con otras palabras, el agua libre que contiene el sustrato. El valor de la actividad de agua está relacionado con la cantidad de agua disponible metabólicamente. La disponibilidad de agua para el hongo determina tanto la posibilidad de germinación de las esporas, como la rapidez de la misma, la tasa respiratoria y la velocidad de crecimiento. De todos los microorganismos que pueden colonizar diferentes frutos, los hongos son los más capaces de crecer cuando la disponibilidad de agua es baja y en consecuencia son los principales responsables del deterioro de los mismos (Lacey y Magan 1991).

3.3.1.3 Temperatura

La temperatura tiene una gran influencia sobre el crecimiento y la actividad de los mohos así como en la producción de las micotoxinas. El género *Aspergillus* es más común en los trópicos, *Fusarium* está asociado con los climas fríos y *Penicillium* predomina en las zonas templadas. La temperatura a la cual el material amohosado es incubado en el laboratorio puede influir en la microbiota aislada a continuación, así la incubación a 12°C puede favorecer el aislamiento de *Penicillium verrucosum* de un sustrato con OTA, donde predomina el género *Aspergillus* (Christensen y Kaufman 1969). Un estrés por sequía durante el periodo de crecimiento del cacahuete puede conducir a la presencia de aflatoxinas si la temperatura se mantiene entre 20 y 32°C durante las seis semanas anteriores a la cosecha (Moss 1991a). Por tanto, se trata de un factor condicionante en la producción de micotoxina.

Los hongos productores de micotoxina pueden crecer en un amplio rango de temperaturas que puede oscilar desde -4°C hasta un máximo de unos 50°C , sin embargo, aunque pueden sobrevivir en condiciones adversas presentan, como en el caso de la a_w , un intervalo óptimo de temperaturas en el que la producción de la toxina es máxima.

3.3.1.4 pH

El pH del medio también influye en el crecimiento del hongo y en la producción de micotoxinas. Sin embargo, su efecto no parece ser tan limitante como el de otros factores abióticos, por lo que se suele estudiar en combinación con otros factores (Bullerman, 1985, Magan y Lacey 1984a). El pH de crecimiento óptimo de la mayoría de las especies fúngicas que contaminan vegetales es de aproximadamente 5.6. Esta capacidad de crecer a pH ácidos evita la competencia con gran parte de las bacterias.

3.3.1.5 Atmósfera

Los hongos micotoxigénicos requieren aerobiosis para el crecimiento y la producción de la toxina, aunque los requerimientos mínimos de O_2 pueden ser bajos, ambas funciones son inhibidas por altas concentraciones de CO_2 (Pitt y Hocking 1985). Diversos estudios muestran como la composición gaseosa de la atmósfera puede también influir en la posible presencia de metabolito secundario y en el crecimiento de las diferentes especies productoras (Northolt y Bullerman 1982, Paster *et al.* 1983). Es posible reducir el crecimiento y la producción de micotoxinas mediante la alteración de la atmósfera gaseosa de los alimentos, pero se han de aplicar condiciones muy extremas para llegar a inhibir totalmente ambos procesos.

3.3.1.6 Tratamientos con fungicidas

El uso de fungicidas como inhibidores del metabolismo, crecimiento y proliferación de los hongos es una práctica habitual desde hace muchos años y se aplica en la producción no solo de alimentos para humanos sino también para animales. Un fungicida o una mezcla de ellos pueden actuar mediante diversos mecanismos, que dependen en gran medida, de la naturaleza de la molécula utilizada. La finalidad de la mayoría de los trabajos relacionados con el tratamiento con productos fungicidas es el control del crecimiento de las especies y su producción (El-Kady *et al.* 1993). Los resultados obtenidos indican que la cantidad de micotoxinas producidas puede aumentar o disminuir dependiendo del fungicida empleado, incluso existen discrepancias entre los diferentes autores (Badii y Moss 1988, Buchanan *et al.* 1987).

Más recientemente se han realizado algunos estudios en relación con la eficacia de diferentes fungicidas sobre el crecimiento y la producción de OTA por *Aspergillus* de la sección *Nigri*, que indican que existen compuestos que reducen el crecimiento y la producción de la OTA, otros compuestos que no dan lugar a diferencias significativas con respecto a los

controles y por último compuestos que estimulan la producción de la toxina (Battilani *et al.* 2003, Belli *et al.* 2006).

3.3.1.7 Otros factores abióticos

Se ha observado que en el campo, las micotoxinas se producen en mayor medida dependiendo del sustrato. Así los tricotecenos están asociados a cereales de zonas templadas, mientras que las aflatoxinas se encuentran con más frecuencia en oleaginosas y cereales de zonas cálidas, pero no suelen aparecer en cantidades significativas en soja probablemente debido a sustancias inhibitorias del grano (Strange 1991). Además, también influyen las prácticas agrícolas (Swanson 1987).

Se ha demostrado el efecto interactivo entre diferentes factores abióticos (temperatura, pH, sustrato), y se ha concluido que la producción de la micotoxina ocurre en un cierto intervalo de cada uno de estos factores que suele ser más restrictivo que el que se necesita para el crecimiento fúngico, siendo dependiente de la especie ensayada.



Figura 4. Espigas de trigo afectadas por *Fusarium graminearum* y otras *Fusarium spp.*

3.3.2 Factores bióticos

La presencia en vegetales durante su cultivo en el campo de las especies micotóxicas está condicionada, como se ha descrito anteriormente, por las condiciones ambientales (especialmente humedad y temperatura) y varía enormemente por zonas y años de cosecha (Lillehoj y Elling 1983). Sin embargo, el crecimiento de los hongos micotoxigénicos junto a determinadas especies fúngicas afecta drásticamente al desarrollo de la

especie productora lo que puede influir enormemente en la producción y acumulación de metabolitos secundarios en el producto final. Valero *et al.* (2006) han descrito la posibilidad de la disminución de micotoxinas por diferentes causas cuando especies productoras crecen en contacto con otras especies que se encuentran de modo natural contaminando los cultivos.

Otro factor biótico muy importante es la presencia de insectos. A finales de los años 70 se investigó la presencia de las micotoxinas en los granos de maíz en desarrollo, encontrando que los insectos pueden servir de vectores para la propagación de hongos productores de toxinas; los daños inducidos por los insectos aparentemente proveen el acceso al desarrollo de los hongos en un número limitado de especies, estando algunas asociadas a la presencia de hongos productores de micotoxinas. Estas y posteriores observaciones han servido para desarrollar la teoría de la implicación ecológica de los metabolitos tóxicos de hongos (Lillehoj y Hesseltine 1977). Esta se basa en un modelo de sistemas que relaciona la causa efecto entre los biotipos pertinentes en la contaminación por micotoxinas en los granos de maíz en desarrollo. El modelo sugiere que los hongos responsables de la producción de micotoxinas son habitantes naturales del tracto digestivo de un sin número de insectos que se alimentan de los granos en desarrollo. Durante los procesos de alimentación, las larvas de los insectos introducen esporas de los hongos y provocan la apertura de sitios de infección en los granos así dañados. La asociación de los hongos con los insectos exhibe una extraordinaria variabilidad, que pueden ir desde la simbiosis hasta la patogeneidad (Christensen 1987).

Un ejemplo a indicar sería la infección del cereal por los pulgones *Rhopalosiphum padi*, *Sitobion avenae* y *Schizaphis graminum*, que producen daños en el vegetal y en la semilla. La colonización del cereal por estas especies no sólo beneficia al parásito sino que facilita además la infección por hongos fitopatógenos con frecuencia productores de micotoxinas. Estos pulgones actúan también como vectores de otras enfermedades del vegetal como el virus del enanismo amarillo (BYDV).

3.4 Clasificación de las micotoxinas

Las micotoxinas no son solamente difíciles de definir, sino que también son un desafío clasificarlas, debido a sus diversas estructuras químicas y orígenes biosintéticos, sus efectos biológicos innumerables, y su producción por un número amplio de diversas especies fúngicas. Las clasificaciones que se presentan tienden a reflejar el conocimiento de la persona que lo realiza. Los clínicos las ordenan a menudo por el órgano que afectan. Así, las micotoxinas se pueden clasificar como hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas, inmunotoxinas, y así sucesivamente. Los biólogos las distinguen por grupos genéricos tales como teratogénicas, mutagénicas, agentes carcinógenos, y alergénicos. Los químicos las han procurado clasificar por sus estructuras químicas (lactonas, cumarinas, etc.); los bioquímicos según sus orígenes biosintéticos (policetonas, derivados de aminoácidos, etc.); los médicos por las enfermedades que causan (como el fuego de San Antonio); y los micólogos por los hongos que los producen

(ejemplo: las toxinas de *Aspergillus*, las toxinas de *Penicillium*). Ninguna de estas clasificaciones es enteramente satisfactoria. Por otra parte, como nuestro foco antropomorfo cambia de punto de vista, el mismo componente se puede conseguir colocar en diversos lugares de una misma clasificación. La aflatoxina, por ejemplo, es hepatotóxica, mutágena, carcinógena, contiene difurano y derivados de policetonas, toxina de *Aspergillus*. Zearalenona es un metabolito de *Fusarium* con potente actividad estrogénica; por lo tanto, además de ser llamado como micotoxina, también se ha etiquetado como un fitoestrógeno, un micoestrógeno y un estimulador del crecimiento (Bennett y Klich 2003).

3.5 Contaminación por micotoxinas en alimentos y piensos. Micotoxicosis.

La ocurrencia de hongos toxigénicos en los alimentos presenta un riesgo potencial para los organismos en los eslabones superiores de la cadena alimentaria y en algunos casos también para los propios vegetales (fitotóxicos) (Bhat 1991, WHO 1979), debido a que las micotoxinas son ingeridas con los alimentos contaminados directa o indirectamente. La contaminación directa es cuando el alimento está contaminado por un moho y la consecuente producción de toxina puede ocurrir durante la producción, el transporte, el estacionamiento o el procesamiento del alimento. Mientras que la contaminación indirecta se debe a la presencia de un ingrediente previamente contaminado con un moho toxicogénico que ya ha desaparecido, pero cuya micotoxina persiste.

La identificación de los hongos contaminantes puede servir como diagnóstico en los brotes epidémicos de micotoxicosis, aunque las conclusiones definitivas sólo pueden ser hechas mediante la identificación de la toxina responsable, puesto que la presencia del hongo no es evidencia suficiente de que este microorganismo sea el productor de la toxina. Además, la presencia de los hongos toxigénicos no es indicativa de riesgo potencial hasta que no se constata la presencia de la micotoxina (Betina 1989).

Casi todos los productos vegetales pueden servir de sustrato para el crecimiento fúngico y la ulterior formación de micotoxinas, por lo cual existe siempre la posibilidad de una contaminación directa de los alimentos para uso humano. Cuando se utilizan los sub-productos del ganado que han ingerido alimentos contaminados con micotoxinas, no sólo puede existir un efecto tóxico directo en los animales, sino también un traspaso de las toxinas a la leche, carnes y demás productos derivados, abriéndose así una nueva vía de exposición humana a las micotoxinas. Por tanto, se considera una micotoxicosis primaria cuando se produce la contaminación al consumir vegetales contaminados, y secundaria al ingerir carne o leche de animales que comieron pastos con micotoxinas (Cawood *et al.* 1991). La presencia de aflatoxina M₁ en la leche es consecuencia de la ingesta de aflatoxina B₁ (Lillehøj 1962).

Los problemas ocasionados por las micotoxinas se extienden por todo el mundo, especialmente en regiones de clima cálido templado, donde se han

informado problemas de micotoxicosis como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados. El reconocimiento de micotoxicosis es extremadamente difícil de diagnosticar y el problema se agudiza por falta de protocolos estructurados para el análisis de casos sospechosos.

Una micotoxicosis presenta como características que no es una enfermedad transmisible; que en los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del moho; que el brote está comúnmente asociado a un alimento o pasto específico; y que el examen del alimento sospechoso revela signos de actividad fúngica (Lillehøj 1991).

La micotoxicosis puede ser crónica o aguda, no obstante, la posible toxicidad crónica de muchas micotoxinas en bajas dosis suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda debido a que las dosis que producen enfermedades crónicas son usualmente más bajas que las responsables de los efectos agudos. Además, los efectos crónicos producen daños tales como la aparición o el desarrollo del cáncer y pueden no ser detectados en el momento de la ingesta (Betina 1989). Se cree que las micotoxinas son uno de los principales responsables de aproximadamente el 80% de los casos de cáncer que tienen su etiología en factores medio ambientales (Chelkowski y Lew 1992).

Los metabolitos tóxicos pueden producir diferentes síntomas de contaminación y pueden inducir respuestas agudas tales como vómitos, diarreas, síndromes anorexígenos, inflamación gastrointestinal además de efectos menos inmediatos como leucopenia, ataxia, necrosis de piel y tejidos junto con degeneración de las células nerviosas y hemorragias del tejido muscular (Cole y Cox 1981, Ueno 1992).

3.5.1 Medidas preventivas y de reducción. Análisis de peligros y puntos críticos de control

La reducción de la ingesta de micotoxinas puede conseguirse mediante medidas preventivas como sistemas de cultivo mejorados, prácticas de almacenamiento adecuadas y control de la calidad de los alimentos. La presencia de cualquier alteración organoléptica de frutas u hortalizas es causa suficiente para rechazar el producto por la potencial formación de toxinas, debido al deterioro fúngico, que se distribuye con facilidad por todo el sustrato, como puede ocurrir en los tomates. En cuanto a los productos de granja, es más difícil prever un problema sobre las carnes, huevos y quesos, sin conocer principalmente cuál era la calidad de los alimentos que se consumían (Swanson 1987).

La estrategia preferida para controlar la contaminación por micotoxinas posee un enfoque multidisciplinar integrado. La estrategia de precosecha o postcosecha más apropiada dependerá de las condiciones ambientales de ese determinado año y de las operaciones de recolección, almacenamiento y elaboración. El conocer los factores medioambientales que fomentan la infección, el desarrollo y la producción de toxinas es el primer paso para un plan eficaz encaminado a reducir al mínimo las micotoxinas en los

alimentos y los piensos. En este sentido, *Fusarium verticillioides* es el moho formador de micotoxinas más conocido del maíz. Dado que es un endofito asintomático transportado por la semilla, será difícil su eliminación. Las prácticas de cultivo, la rotación de cultivos, el control de malezas, la pluviosidad en la temporada tardía, el viento y los vectores de plagas son factores que influyen en la cantidad y origen del inóculo fúngico, que mantiene el ciclo de la enfermedad en el maíz.

Estos programas de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) han sido útiles para hacer frente a los riesgos asociados a la posible contaminación de productos alimenticios y sustancias químicas tóxicas. Los programas de inocuidad de los alimentos suelen utilizar información sobre los factores que propician la contaminación para establecer medidas preventivas y de control y ofrecer de ese modo al consumidor alimentos inocuos y sanos.

Al introducir un programa eficaz de APPCC se determinan los principales elementos que pueden utilizarse o modificarse para reducir la formación de micotoxinas en el campo y en el lugar de almacenamiento. Por ejemplo, la limitación de la infestación por insectos y del nivel de humedad en los productos.

Un claro ejemplo de la importancia aplicación de APPCC, se encuentra en las características fermentativas de los ensilajes que presentaron contaminación fúngica. Estos indicaron claramente que el proceso de fermentación no fue el adecuado (pH anormales para la especie y valores de NH_3/N_T (amoníaco/nitrógeno total) que indican fermentaciones malas a muy malas). Esta apreciación es importante, puesto que una buena conservación de los silos o del heno empleado en la alimentación minimizaría el peligro de las micotoxinas (Galán Alejo y Rodríguez Jerez 2003).

Determinados procedimientos de elaboración y descontaminación pueden contribuir a reducir el nivel de las micotoxinas. Simplemente con la separación física de los alimentos dañados e infestados por mohos se conseguiría una reducción en la cantidad de toxina. Debido a que la mayor cantidad de toxina suele estar concentrada en unos pocos granos o partes del alimento y si se logran eliminar, disminuye la proporción de micotoxina en los subproductos. Las técnicas de clasificación por el color u otras características visuales se han usado en la selección de cacahuets. El mondado de las manzanas para separar las zonas alteradas reduce en 93–99% el contenido de patulina de la sidra preparada con las mismas (West y Bullerman 1991).

También se puede conseguir una reducción de la toxina mediante procesos físicos, químicos o microbiológicos utilizados en la elaboración del derivado alimenticio. Por ejemplo las micotoxinas son moderadamente estables a los procedimientos de tostado, así los cacahuets pierden alrededor del 40% de aflatoxina B_1 y los granos de café verde cerca del 80% de ocratoxina A. El proceso de panificación reduce entre un 16 al 69% del deoxinivalenol presente en la harina de trigo (Samarajeewa 1991). El

maíz quebrado cuando se trata con NaOH disminuye significativamente el contenido de aflatoxina, pero la preparación del grano entero con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ reduce sólo un 40% de la misma (Pemberton y Simpson 1991). La bentonita y otros silicoaluminatos, que suelen ser utilizados mezclados con los alimentos para aves, adsorben las aflatoxinas de los sustratos pero no otras micotoxinas (West y Bullerman 1991).

3.6 Evaluación de riesgos y regularización y control de las micotoxinas

La mayoría de los mohos reducen el valor nutritivo de los alimentos, pero además, muchos de ellos generan micotoxinas. La FAO estima que el 25% de las cosechas mundiales de granos se encuentran afectadas por dichos metabolitos secundarios.

Aunque hoy por hoy es imposible eliminar por completo las micotoxinas de los alimentos, es importante asegurarse de que sus niveles no representen una amenaza para la salud. La presencia de micotoxinas a niveles superiores a los tolerables representa una amenaza para la inocuidad de los alimentos y un riesgo importante en salud alimentaria. Por tanto, es importante la aplicación de normas relativas a los niveles de contaminación en los alimentos o en los piensos. Estas normas deberían ser de aplicación tanto para cada país productor o consumidor como en la regulación del comercio internacional debido al creciente mercado internacional o fenómeno de globalización, en donde, los productos alimenticios y sus derivados se encuentran distribuidos alrededor de todo el mundo, por lo que los posibles efectos sobre los productos contaminados no se restringen sólo al país productor (Miller 1995). Su aplicación, sin embargo, requiere de un volumen considerable de información, incluidos datos de seguimiento, e información sobre hábitos alimentarios.

La evaluación de riesgos proporciona el fundamento y los conceptos científicos necesarios para adoptar decisiones normativas acertadas que protejan a los consumidores con un costo asequible, y permitan asimismo un debate, una supervisión y una estandarización internacional. Teniendo en cuenta las diferencias de los efectos biológicos y los datos disponibles, no hay en la actualidad un único enfoque que pueda aplicarse a todos los problemas relacionados con las micotoxinas, por lo que es necesario examinar cada caso por separado. De ahí su enorme complejidad.

El Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) evalúa aditivos alimentarios, contaminantes, sustancias tóxicas naturales y residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos y proporciona asesoramiento científico a la Comisión del Codex Alimentarius. Hasta la fecha, el JECFA ha evaluado tres familias de micotoxinas: las aflatoxinas, la patulina y las fumonisinas. Los tricotecenos y la zearalenona serán evaluados en los próximos periodos de sesiones del JECFA y la ocratoxina A será objeto de una reevaluación.

La FAO clasifica a los diferentes peligros en función de los riesgos comprobados o potenciales para la salud humana. En términos generales, el organismo de Naciones Unidas considera que el riesgo de intoxicación

aguda por micotoxinas es entre moderado y bajo en comparación con otras familias de compuestos como los de origen microbiológico. En cualquier caso, es mayor que el derivado de aditivos, contaminantes químicos o pesticidas.

El riesgo se incrementa, según la clasificación de la FAO, cuando se habla de efectos crónicos. A este nivel, las micotoxinas son el grupo de sustancias que mayor preocupación suscitan en el organismo internacional, seguido de contaminantes y fitotoxinas. Los riesgos de origen microbiológico cierran esta clasificación junto con los aditivos.

Un elevado consumo de alimentos susceptibles de estar contaminados con aflatoxinas o una importante prevalencia de hepatitis B en una población determinada, implica un mayor riesgo para la salud de acuerdo con los datos aceptados por la comunidad científica internacional. En general, se considera que las cantidades de micotoxinas aceptables tienen que ser inferiores en poblaciones susceptibles, aspecto que implica un mayor esfuerzo de las autoridades sanitarias en el conocimiento de los parámetros de riesgo de dicha población.

4. Principales fuentes de micotoxinas en la dieta

Las principales fuentes de micotoxinas en la dieta son los cereales entre los que ocupa un lugar destacado el trigo por su amplio consumo humano. También, aunque en menor medida, son importantes los frutos secos, frutas y hortalizas. De entre las micotoxinas presentes en cereales, la ocratoxina A y tricotecenos tipo B son los metabolitos secundarios que con más frecuencia se suelen encontrar. También, en los últimos años, las frutas y especialmente la manzana y sus productos derivados han adquirido especial importancia por su consumo a nivel mundial, y además, es la principal fuente de contaminación con patulina en la dieta, de ahí las medidas legislativas adoptadas recientemente (Commission Regulation No. 1881/2006).

Los cereales son la fuente más importante del alimento humano. La cosecha anual del mundo de cereales supera los 2000 millones de toneladas que suponen una ingesta de 160 kilogramos por habitante y año. Además la producción de cereales se está incrementando pero el de la población mundial también (FAO 2001). Se estima que entre 10–30% de los granos cosechados se pierde debido a la infección de los hongos (Chelkowski 1991), y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima en cerca del 25% los cultivos alimentarios del mundo que están afectados por las micotoxinas (Mannon y Johnson 1985, CAST 1989). Generalmente, y especialmente en países en vías de desarrollo, se exportan los mejores cereales, mientras que la cosecha con una calidad inferior se consume en el país de origen (Dawson 1991). Por lo tanto los ciudadanos en los países en vías de desarrollo, viviendo principalmente en áreas rurales, son especialmente sensibles a los efectos de salud adversos de las micotoxinas debido a la desnutrición y al bajo nivel de vida (Shane 1994).

En España, el consumo de cereales en 1991 estaba cifrado en una ingesta diaria media de 239 gr por persona (Castillo Sánchez y León Espinosa de los Montes 2002). Sin embargo este consumo ha ido disminuyendo lentamente y en 2003 la ingesta media por persona era de 222 gr por día (MAPA 2007a) y de 214 gr día en 2006 (MAPA 2007b). A pesar del descenso, sigue siendo uno de los aportes más importantes en la alimentación diaria de los ciudadanos dado su contribución en hidratos de carbono y fibra alimentaria.

Entre las frutas, la manzana y sus derivados ocupa un lugar destacado como fuente de patulina en la dieta. La manzana es el fruto del manzano, árbol de la familia de las Rosáceas. Esta familia incluye más de 2.000 especies de plantas herbáceas, arbustos y árboles distribuidos por regiones templadas de todo el mundo. Se podría decir que el cultivo de la manzana es tan antiguo como la humanidad, siendo el manzano el árbol frutal más cultivado a nivel mundial.

España es uno de los principales países productores. Cataluña produce el 49% de la producción nacional seguida de Galicia y Aragón, con un 17% y 16% respectivamente. En total existen 39000 hectáreas plantadas de manzanos de las que se obtuvieron 774210 toneladas de fruta en el año 2005. Del total de manzanas producidas 87800 toneladas pertenecen a manzano para sidra, 88500 toneladas a la variedad starking, 360600 toneladas a la variedad golden delicious y el resto a otras variedades (MAPA 2007c). En España se importan 245590 toneladas de manzana y se exportan 106630. Si se considera que toda la manzana, 913170 toneladas, es consumida en España, y suponiendo que el número de habitantes en España es de unos 45 millones de habitantes, hacen un consumo anual de manzana aproximado de 20.3 Kg por persona, tanto en fresco como en productos derivados, siendo una de las frutas más consumidas en el territorio español.

5. Métodos analíticos para la detección y cuantificación de micotoxinas

5.1 Métodos de muestreo

Para garantizar la representación de las muestras de alimentos y piensos en el análisis, es importante seguir las normas establecidas en los planes de toma de muestras de los alimentos a estudio, muchos de ellos, se hallan ahora incorporados como parte de la reglamentación para el control de la contaminación por micotoxinas. El método de muestreo es crítico debido a que la contaminación por micotoxinas puede ocurrir en el campo, durante el almacenaje o durante el proceso de elaboración de un subproducto. Además, la producción de micotoxinas no es homogénea. Por ejemplo, la contaminación por la ocratoxina A ocurre a menudo en lugares puntuales durante el almacenamiento en silos. En consecuencia, un procedimiento de muestreo pobre no resulta ser representativo por faltar los granos altamente contaminados del lote estudiado. Debido a esto, la Comisión

Europea ha recomendado un procedimiento para un muestreo según el tamaño del lote. Esto incluye de 10 a 100 muestras incrementales hasta un total de 10 kilogramos que tienen que ser molidos antes de los análisis (Reglamento de la comisión (CE) No. 401/2006).

5.2 Métodos de análisis

Los métodos analíticos publicados se centran en dos grupos: los cromatográficos y los inmunológicos. Los métodos cromatográficos miden el compuesto específicamente después de la extracción de la muestra, seguida de una purificación y por último proceder a una separación por cromatografía de líquidos o de gases y una detección específica. Según este examen, los métodos de cromatografía de capa fina (TLC) oficiales de la AOAC están prácticamente en desuso. La purificación del extracto se suele realizar por la columna de inmovilización (IAC). Los análisis inmunológicos se basan en el principio de ELISA (Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas). Estos métodos se utilizan a menudo para chequeo rutinario y en análisis de campo. Existen diversas versiones que varían en la rapidez del procedimiento y la cuantificación de los resultados. Un paso muy importante de la validación es la detección del efecto matriz, y puesto que puede ocurrir el falso positivo, los resultados deben requerir la confirmación por métodos cromatográficos más costosos. Algunos autores han estudiado su correlación con los métodos cromatográficos. En este examen, los límites de detección publicados por el procedimiento de ELISA eran siempre más elevados que los métodos cromatográficos (Beaver *et al.* 1991, Dreher y Usleber 1996). Actualmente, están en desarrollo nuevos y prometedores métodos; por ejemplo la cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas (LC-MS) que parece ser muy eficaz, alcanzado niveles de detección muy bajos. Actualmente, también están bajo investigación para la detección del potencial microbiológico de la calidad y de micotoxina en alimentos la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de polarización por fluorescencia, los biosensores y la tecnología de la nariz electrónica.

5.3 Validación de métodos analíticos

Se entienden por métodos de análisis validados aquellos cuyas características de eficacia se han determinado de acuerdo con ensayos entre laboratorios y que ahora son generalmente aceptados como indispensables a efectos de control y reglamentación. Los métodos usados deben ser validados y responder a los criterios para la selección de los métodos de determinación para las micotoxinas publicadas por el Comité Europeo de Estandarización (CEN). Éstos incluyen, repetitividad, reproducibilidad y niveles de recuperación mínimos. Por ejemplo, las recuperaciones para deoxinivalenol (DON), zearalenona y las fumonisinas deben estar entre un intervalo del 70 al 110%. La validación de un método es apoyada a menudo por organizaciones internacionales tales como CEN, AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos), ISO (Organización

Internacional de Estandarización), IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada). La estandarización de un método se requiere a menudo para los asuntos comerciales y en la UE es supervisada por el CEN. Además de emplear métodos validados en los laboratorios químicos, es menester aplicar procedimientos internos de control de calidad. Normalmente, esto supone la acreditación, la participación en ensayos de aptitud y el buen uso de materiales de control y de referencia (CEN 1999, Thompson y Wood 1993).

6. Ocratoxinas

6.1 Estructura química

Las ocratoxinas son ácidos orgánicos débiles, constituyen una amplia familia de moléculas de las cuales, la más importante es la ocratoxina A (OTA) debido a su mayor toxicidad. Se trata de una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida (Figura 5).

La OTA o (R)-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirán-7-il)carbonil]-L-fenilalanina cuya fórmula molecular es C₂₀H₁₈ClNO₆ (403.82 g/mol) con un punto de fusión de 169°C, es un sólido cristalino blanco que emite fluorescencia verde que cambia a celeste en presencia de un álcali. La forma ácida es soluble en disolventes orgánicos polares y la sal sódica en agua (Steyn 1971). Es inestable a la luz, sin embargo en una disolución etanólica es estable si se mantiene en la oscuridad y a bajas temperaturas. Posee dos constantes de protonación, una debida al grupo carboxílico (pK_a=4.4), y la otra al grupo hidroxilo del fenilo (pK_a=7.1) (Valenta 1998). Su espectro de absorción UV varía con el pH y la polaridad del disolvente, siendo el máximo de absorción a 330 nm en metanol.

La ocratoxina B (OTB) es el derivado declorinado de la OTA y la ocratoxina C (OTC) es su etil éster (Figura 5). La OTA y la 4-hidroxi-OTA, junto con la OTB, sus metil y etil ésteres son metabolitos fúngicos.

La ocratoxina α (OTα) y la ocratoxina β (OTβ) son compuestos sintetizados desde rutas metabólicas sencillas mediante la adición de cinco acetatos y el ácido carboxílico que proviene de la S-adenosilmetionina. Sin embargo, estos metabolitos no poseen una toxicidad acusada (Kuiper-Goodman y Scott 1989). Seguidamente, se sintetiza la OTA y la OTB por adición de la fenilalanina mediante una reacción que consume ATP en presencia de Mg²⁺. La OTα ha sido aislada de la orina de animales de experimentación a los que se administró OTA (Sreemannarayana *et al.* 1988).

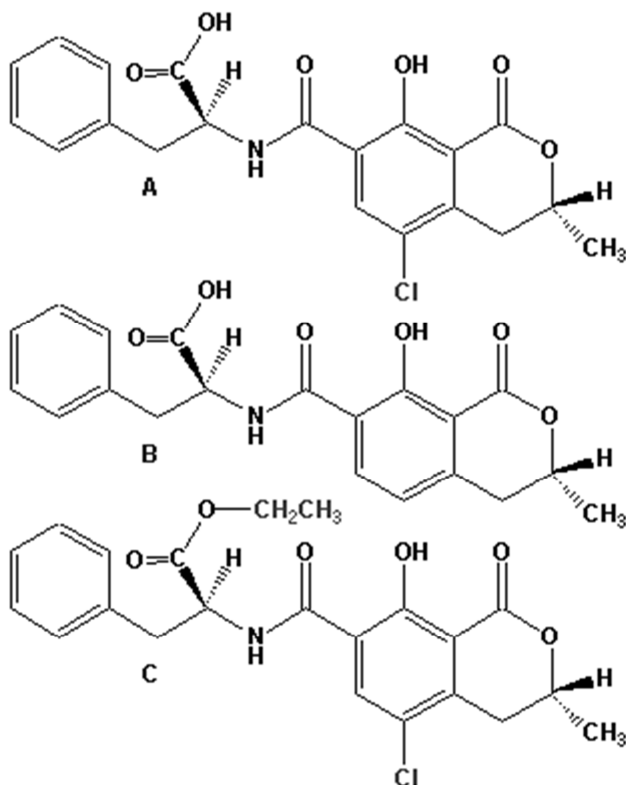


Figura 5. Estructura química de A) OTA; B) OTB; C) OTC.

6.2 Metabolismo y efectos tóxicos de la ocratoxina A

El metabolismo de la ocratoxina A es principalmente resultado de su similitud estructural con un aminoácido esencial, la fenilalanina (Phe). El efecto fundamental de la toxina parece ser la inhibición de la síntesis de proteínas (Creppy *et al.* 1984, Dirheimer y Creppy 1991), aunque efectos secundarios como la inhibición de la síntesis de RNA y DNA han sido implicados también en su mecanismo de acción. La inhibición que produce la OTA de este enzima es fácilmente revertida con la adición de fenilalanina. Sin embargo esta baja afinidad de la OTA puede ser compensada debido a que la OTA se acumula en el interior de la célula alcanzando concentraciones intracelulares que superan con mucho la concentración de fenilalanina. Creppy *et al.* (1983a) demostraron que la concentración de OTA en un cultivo celular dentro de las células es entre 200 y 300 veces superior con respecto a la concentración de OTA en el medio de cultivo.

La OTA es además capaz de interactuar con otros enzimas que usan la fenilalanina como sustrato (Zanic-Grubisic *et al.* 2000) y producir peroxidación lipídica, superoxidación y formación de radicales peróxido de hidrógeno (Baudrimont *et al.* 1994).

La absorción de la mayor parte de la OTA que se ingiere tiene lugar en el estómago y yeyuno proximal. Los animales en que se absorbe con mayor eficacia son el cerdo, la rata, el ratón y el pollo a niveles que oscila entre el 40 y el 60%. Los rumiantes absorben muy poca OTA, ya que la flora del animal la transforma en poco tiempo en OTa (Kuiper–Goodman y Scott 1989, Sreemannarayana *et al.* 1988). No obstante se ha encontrado la micotoxina en el suero o en las heces y orina de oveja al consumir cantidades elevadas de ocratoxina A por encima de 2 mg/Kg de pienso, demostrando que una importante cantidad de micotoxina no se degrada en el aparato digestivo (Höhler *et al.* 1999). Además, en alguna ocasión, se ha detectado presencia de OTA en leche de vaca (Galtier 1998, Skaug 1999). En el torrente sanguíneo se encuentra unida a la albúmina y a otras proteínas sanguíneas (Galtier 1998, Kuiper–Goodman y Scott 1989, Sreemannarayana *et al.* 1988). También, la OTA tiene una eficiente circulación enterohepática (Kuiper–Goodman y Scott 1989, Petzinger y Weidenbach 2002, Sangare–Tigori *et al.* 2006).

La mayor persistencia de la OTA en sangre parece darse en el hombre y en el cerdo (Petzinger y Ziegler 2000). La vida media de la OTA en sangre es de 35 días tras una dosis única como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados. La OTA es la micotoxina más frecuentemente detectada en la sangre de individuos sanos. En distintos estudios realizados a nivel mundial se ha detectado OTA en concentraciones de ppb entre un 50% a un 100% de las muestras de sangre humana analizadas (Burdaspal y Legarda 1998a, Filali *et al.* 2002, Petzinger y Ziegler 2000, Özçelik *et al.* 2001, Rosner *et al.* 2000, Solti *et al.* 1999, Ueno *et al.* 1998, Zimmerli y Dick 1995). La OTA también ha sido detectada en riñón y en leche de mujer (Petzinger y Ziegler 2000).

6.2.1 Nefrotoxicidad

El riñón es el órgano principal en que se produce toxicidad asociada a la OTA (Jung y Endou 1989). La OTA es nefrotóxica en todas las especies monogástricas en que ha sido ensayada, en función de la especie se ha demostrado una sensibilidad diferenciada a sus efectos nefrotóxicos. Kupier–Goodman y Scout (1989) realizaron una ordenación de las diferentes especies dependiendo de la sensibilidad obteniendo como resultado, de forma decreciente: perro–cerdo–pollo–rata–ratón. Además estudios en ratas han puesto de manifiesto que las hembras y los animales viejos presentan mayor sensibilidad a los efectos nefrotóxicos de la OTA en comparación con los machos y los animales más jóvenes (Dortant *et al.* 2001, NTP 1989).

Un gran número de estudios epidemiológicos han identificado la OTA como el posible agente causante de una enfermedad renal fatal que afectó en un primer momento a las poblaciones rurales de la parte central de la Península de los Balcanes incluyendo, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Rumania, Serbia y Eslovenia (JECFA 2001). Esta enfermedad ha sido denominada como Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN), se caracteriza por degeneración, fibrosis intersticial y hialinización de los

glomérulos y un lento y progresivo deterioro de la función renal acompañado por una reducción del tamaño renal (Vukelic *et al.* 1991).

Además se ha sugerido que la OTA podría actuar de un modo similar en un tipo crónico de enfermedad renal encontrado en Túnez, llamado Nefropatía Intersticial Crónica (CIN). En 1994, Abid *et al.* (2003) mostraron que se detectaban concentraciones altas de OTA en los alimentos y en la sangre de individuos con CIN con respecto a las concentraciones encontradas en individuos sanos. De todos modos esto no ha sido comprobado mediante estudios posteriores.

6.2.2 Carcinogenicidad

Ha sido establecida la carcinogenicidad de la OTA mediante estudios a largo plazo con roedores, siendo el principal órgano afectado en cuanto a formación de tumores, el riñón y el después el hígado (Bendele *et al.* 1985a, EFSA 2006, Kanisawa y Suzuki 1978, Kanisawa 1984, O'Brien y Dietrich 2005).

La OTA ha sido implicada en el desarrollo de cánceres en el tracto urinario en humanos, debido a la mayor incidencia de este tipo de cánceres en regiones donde la BEN es endémica (Chernozemsky *et al.* 1977). Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, la OTA se encuentra dentro del grupo 2B por ser posible carcinogénica en humanos (IARC 1993).

6.2.3 Genotoxicidad

Algunos estudios han demostrado que la OTA es genotóxica tanto *in vitro* como *in vivo*, a pesar de que la OTA ofrece resultados negativos en muchos de los tests para mutagenicidad. En algunos trabajos realizados para observar su posible capacidad de mutación en bacterias los resultados obtenidos han sido negativos (Hennig *et al.* 1991), mientras que en células de mamíferos algunos resultados han sido positivos (de Groene *et al.* 1996) y otros negativos (Bendele *et al.* 1985b).

6.2.4 Inmunotoxicidad

Son limitados las referencias acerca de los posibles efectos que tiene la OTA sobre el sistema inmunológico. A pesar de ello, algunos estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la OTA puede afectar a ambas respuestas inmunes, tanto la celular como la humoral aunque estos efectos se ponen de manifiesto cuando las cantidades de OTA ensayadas son muy altas.

Se ha publicado que la OTA administrada a grandes concentraciones da lugar a cambios en el grosor de los órganos del sistema inmune, afectando al tamaño del timo en ratón, rata y pollo (Boorman *et al.* 1984, NTP 1989, Singh *et al.* 1990), y necrosis en células del bazo y de los ganglios linfáticos en ratas (Kanisawa *et al.* 1977).

6.2.5 Neurotoxicidad

En diferentes experimentos se ha demostrado que la OTA produce lesiones en el sistema nervioso central (Belmadani *et al.* 1998a, Sava *et al.* 2006) y acumulación en el cerebro de las ratas (Belmadani *et al.* 1998b).

En una comparación entre ratas adultas y jóvenes, los daños producidos en la medula cerebral y en la parte central del tallo cerebral fueron significativas ya a concentraciones bajas cuando se realizó ensayo en ratas viejas, mientras que fue necesario la utilización de dosis mayores para producir el daño en ratas jóvenes. Esto sugiere que las ratas adultas podrían ser más sensibles (Dortant *et al.* 2001).

Más recientemente Sava *et al.* (2006) han apuntado la posibilidad de que un gran número de pequeñas dosis de OTA pueden inducir parkinsonismo a edades adultas.

6.2.6 Efectos sobre la fertilidad

Algunos estudios en animales han puesto de manifiesto posibles efectos negativos de la OTA sobre el aparato reproductor masculino. La administración de OTA por vía oral a ratas macho produjo con el tiempo el aumento de testosterona a nivel testicular (Gharbi *et al.* 1993). En estudios más recientes se estudió el efecto de la OTA en la espermatogénesis de crías de verraco obteniéndose una reducción significativa de la movilidad y la viabilidad espermática (Biro *et al.* 2003).

6.2.7 Toxicidad en el desarrollo

La OTA se ha mostrado que puede ser tanto teratogénica como embriotóxica y es capaz de atravesar la placenta. En estudios en los que se administraba OTA a ratones hembra en estado de gestación en diferentes días y a diferentes dosis se ha observado reducción de la supervivencia de los cachorros, patentes anomalías craneoencefálicas cuya incidencia y gravedad aumentan con la dosis, malformaciones fetales predominantemente en el sistema nervioso central, el ojo y el esqueleto axial (Arora *et al.* 1981) e incremento de las malformaciones renales y de los pulmones (Abdel-Wahhab *et al.* 1999).

Además causó reducciones, dependientes de la dosis, en las proteínas celulares y en el contenido de DNA en cultivos de embriones de rata (Mayura *et al.* 1989).

6.3 Hongos productores

La ocratoxina A (OTA) se aisló por primera vez en Sudáfrica en 1965 a partir de un cultivo de *A. ochraceus* (van der Merwe *et al.* 1965). La producción de esta toxina se describió posteriormente en especies relacionadas (Ciegler 1978, Hesseltine *et al.* 1972), pero los primeros datos acerca de la contaminación natural, y su potencial importancia, se debió a la contaminación por *Penicillium* (Scott *et al.* 1970). Más recientemente se

ha considerado *Aspergillus carbonarius* como la tercera fuente más importante de OTA junto con un reducido número de aislados productores de OTA pertenecientes al agregado *A. niger* (Abarca *et al.* 1994, Téryen *et al.* 1996).

6.3.1 Especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A

Dentro del género *Aspergillus*, la especie que produce los mayores niveles de OTA es *A. ochraceus*. La toxina, es producida además por un reducido número de especies relacionadas con *A. ochraceus* también pertenecientes al género *Aspergillus* subgénero *Circumdati* sección *Circumdati* como *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. petrakii*, *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, *A. albertensis* y *A. auricomus*, más recientemente *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae*. También se han caracterizado como productoras de OTA dos hongos ascospóricos *Neopetromyces muricatus* (estado asexual de *A. muricatus*) y *Petromyces alliaceus* (estado asexual de *A. alliaceus*) (Abarca *et al.* 2001, Bayman *et al.* 2002, Frisvad *et al.* 2004, Frisvad y Samson 2000, Hesseltine *et al.* 1972, Varga *et al.* 1996). En las especies *Aspergillus alliaceus* y *A. albertensis*, anteriormente incluidas en la sección *Circumdati*, recientemente se han mostrado características que demuestran que presentan una estrecha relación con la sección *Flavi* (Peterson 2000). También, se ha demostrado que la cepa de *A. auricomus* que se indicaba como productora de OTA (Varga *et al.* 1996) se reidentificó como *Neopetromyces muricatus* por lo que se cree que esta especie es incapaz de producir esta micotoxina (Frisvad *et al.* 2004). Además, se ha probado que ninguna de las especies: *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii* indicadas como productoras de OTA (Varga *et al.* 2001) son productoras de OTA (Olsen *et al.* 2006). Actualmente, las especies: *A. ochraceus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae* son consideradas las principales productoras de OTA de la sección *Circumdati* en alimentos, debido a su incidencia y a que la mayoría de sus aislados produce gran cantidad de OTA (Frisvad *et al.* 2004, Samson *et al.* 2006), siendo últimamente considerada la principal productora de OTA la especie de *A. westerdijkiae* (Abdel-Hadi y Magan 2009).

Dentro de este género es importante destacar la producción de OTA por hongos del agregado *A. niger* (Abarca *et al.* 1994, Heenan *et al.* 1998, Tateo *et al.* 2000) y *A. carbonarius* (Heenan *et al.* 1998, Horie 1995, Tateo *et al.* 2000), especies pertenecientes a la sección *Nigri*. Las especies del agregado *A. niger* presentan una amplia distribución y son utilizadas en diferentes procesos industriales, por lo que el empleo de cepas potencialmente productoras de OTA en tecnología de alimentos debe ser controlado ya que ello podría suponer un riesgo para la salud del consumidor (Beuchat 1987, Pitt y Hocking 1997).

En el agregado *A. niger*, no es posible distinguir un taxón de otro utilizando las características morfológicas del hongo porque las diferencias que existen entre sus integrantes son muy sutiles. La división del agregado *A. niger* en dos especies, conocidas como *A. niger* y *A. tubingensis*, según el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

(RFLP) del DNA total, fue propuesta por Kusters van Someren *et al.* (1991). En otros trabajos en los que se han empleado técnicas basadas en el DNA se han comprobado y confirmado estos resultados (Accensi *et al.* 1999, Logrieco *et al.* 2002, Mégmégneau *et al.* 1993, Varga *et al.* 1994). La capacidad de *A. niger* para producir OTA se había descrito previamente (Abarca *et al.* 1994), y la especie *A. tubingensis* ha sido recientemente descrita como productora de OTA (Medina *et al.* 2005a).

Aspergillus carbonarius, no presenta tan amplia distribución como las especies del agregado *A. niger*, pero un gran porcentaje de sus cepas son productoras de la micotoxina (Cabañes *et al.* 2002, Heenan *et al.* 1998, Horie 1995, Pitt y Hocking 1997, Tateo *et al.* 2000). Otras especies de este género son también capaces de producir OTA (Abarca *et al.* 2000; Tateo *et al.* 2000, Ueno *et al.* 1991). Más recientemente, la producción de la toxina ha sido mencionada para especies como *A. japonicus*, *A. sclerotioniger* y *A. lacticoffeatus* (Samson *et al.* 2004). Por el contrario, se ha descrito también una nueva especie no productora de OTA dentro de la sección *Nigri* con características similares tanto a *A. carbonarius* como a *A. nigri*. Morfológicamente la diferencia apreciable con las anteriores es el tamaño intermedio de sus conidios. Esta especie ha sido nombrada como *A. ibericus* (Serra *et al.* 2006).

6.3.1.1 *Aspergillus ochraceus*

El crecimiento de *A. ochraceus* se produce en un rango de temperatura entre 8 y 37°C, con un óptimo cercano a 30°C. Las condiciones óptimas en cuanto a actividad de agua (a_w) para su crecimiento se encuentran en el rango entre 0.95–0.99. Se ha descrito que el límite de crecimiento se presenta a una a_w de 0.79 en medios de cultivo que contienen azúcar y por debajo de 0.81 en medios que contienen NaCl. *A. ochraceus* crece lentamente a pH 2.2 y bien entre pH 3 y 10 (Pitt y Hocking 1997, Pardo *et al.* 2005).

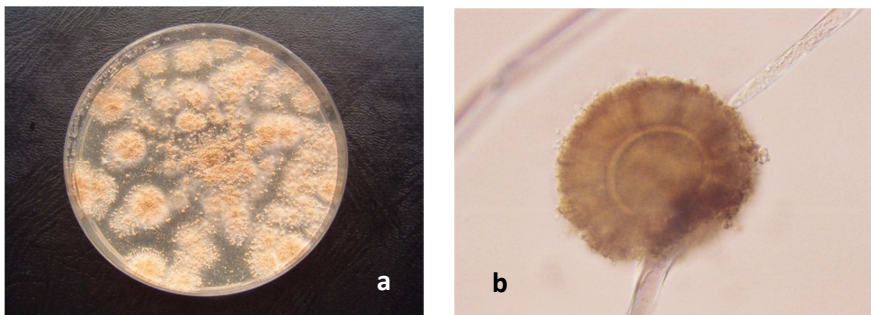


Figura 6. a) Colonias de *A. ochraceus* en medio de cultivo YES a 25°C durante 10 días. b) Detalle del conidióforo de *A. ochraceus* (microscopio óptico 400x).

A. ochraceus ha sido aislado de una amplia gama de productos alimenticios pero es más común en alimentos secos y almacenados. Alguna vez se ha descrito en cereales y raramente se ha descrito su presencia en productos

como queso, especias, olivas negras, mandioca y carnes procesadas al contrario que *P. verrucosum*. Se trata de una especie que raramente causa deterioros y normalmente se encuentra en estos alimentos a bajos niveles, por lo que su presencia en los mismos no es un buen indicador de la existencia de la toxina (Pitt y Hocking 1997).

6.3.1.2 *Aspergillus carbonarius*

La información de que se dispone acerca de su fisiología sitúa muy próxima a la especie *A. carbonarius* con la especie *A. niger*, pero algunos estudios indican que *A. carbonarius* crece a temperaturas algo más bajas que *A. niger*, con un máximo en torno a 40°C y unas condiciones óptimas entre 32–35°C.

La posibilidad de crecer en condiciones de reducida a_w es baja y cuando el valor es de 0.82, la germinación de las esporas se produce entre 25 y 30°C. A diferencia de *A. niger*, *A. carbonarius* no es capaz de germinar a 37°C cuando la a_w es 0.82 (Mitchell *et al.* 2004).

Debido a la alta resistencia que presentan algunas especies de *Aspergillus* negros, que incluye a *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. japonicus*, a la luz del sol y la luz ultravioleta, su hábitat más importante son los frutos secos especialmente los derivados de la uva, frecuentemente secados de manera natural mediante exposiciones prolongadas a la luz del sol en ausencia de conservantes.

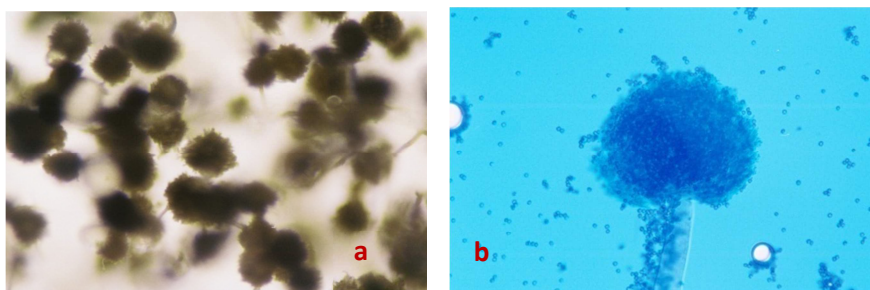


Figura 7. a) Aspecto microscópico de *A. carbonarius* en medio de cultivo YES a 25°C durante 14 días (microscopio óptico 40x). **b)** Detalle del conidióforo de *A. carbonarius* teñido con azul algodón de lactofenol (microscopio óptico 400x).

6.3.1.3 *Aspergillus niger*

Como muchos *Aspergillus*, *A. niger* crece óptimamente a temperaturas relativamente altas, con mínimas de crecimiento entre 6–8°C, máximas de crecimiento entre 45–47°C, y condiciones óptimas en el rango de 30–37°C. Se ha demostrado que la germinación de *A. niger* puede ocurrir con a_w de 0.77 a 35°C (Pitt y Hocking 1997).

De los hongos típicamente aislados en alimentos, *A. niger* es el mayoritario en climas templados, tanto en el campo como durante el almacenamiento. Se podría decir que es la especie de *Aspergillus* responsable de un mayor

número de casos de deterioro post-cosecha de frutas frescas, incluyendo manzanas, peras, melocotones, naranjas, uvas, higos, fresas, mangos, tomates, melones y algunos vegetales especialmente cebollas, ajos y ñames (Snowdon, 1990, 1991).

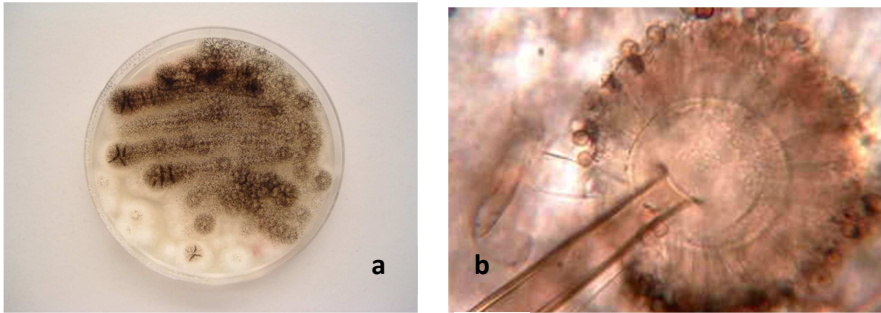


Figura 8. a) Aspecto del crecimiento en simple estria de *A.niger* en medio de cultivo YES a 25°C durante 14 días. b) Detalle del conidióforo de *A. niger* (microscopio óptico 400x).

En cuanto a la producción de micotoxinas, *A. niger* es normalmente considerado como un hongo benigno y es mundialmente usado en el procesamiento de algunos alimentos. Está clasificado como microorganismo GRAS (generalmente considerado como seguro) por el Gobierno de los Estados Unidos de América (EEUU). A pesar de ello, algunos autores como Abarca *et al.* (1994) encontraron 2 de 19 aislados de *A. niger* productores de OTA o Heenan *et al.* (1998) que encontraron 2 de 115 como productores de la toxina.

6.3.2 Especies de *Penicillium* productoras de ocratoxina A

La primera descripción de la producción de OTA por *Penicillium* spp. fue en 1969 por van Walbeek *et al.* (1969). Dicha producción se relacionó con la especie *P. viridicatum* y su presencia en sustratos naturales se confirmó pocos años después. La visión de que *P. viridicatum* era la mayor fuente de OTA en alimentos y piensos de algunas partes del mundo se mantuvo durante más de una década. Más tarde tras revisiones de Ciegler (Ciegler *et al.* 1973), se asumió que la producción de OTA por *Penicillium* spp. se restringía a *P. verrucosum*. Tras un análisis más exhaustivo de este género se propuso la división de *P. verrucosum* en en dos especies ocratoxigénicas *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Larsen *et al.* 2001), división que se mantiene en la actualidad.

6.3.2.1 *Penicillium verrucosum*

P. verrucosum es una especie de crecimiento lento, bajo algunas condiciones, y capaz de crecer a bajas actividades acuosas (inferiores a 0.80) y a bajas temperaturas (intervalo entre 0–31°C, óptimo a 20°C) (Pitt y Hocking 1997). Las condiciones óptimas en cuanto a a_w para su

crecimiento en granos se encuentran en el intervalo entre 0.95–0.99 (Pardo *et al.* 2006).

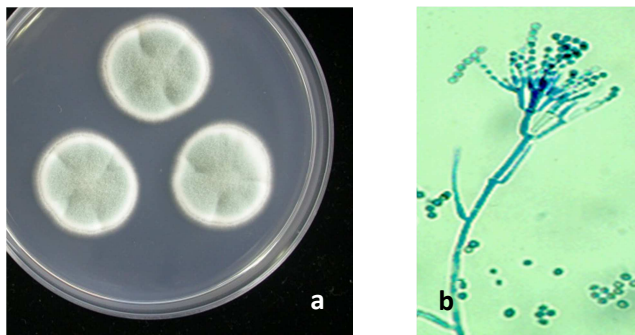


Figura 9. a) Colonias de *P. verrucosum* en medio de cultivo CZAPECK a 25°C durante 14 días. b) Detalle del conidióforo de *P. verrucosum* teñido con azul algodón de lactofenol (microscopio óptico 100x).

Una característica importante de la ecología de *P. verrucosum* es que crece únicamente a temperaturas medias tendiendo a bajas. A consecuencia de esto, presenta una distribución amplia en zonas frías y/o templadas. Su hábitat principal son los cereales crecidos o almacenados en climas fríos templados incluyendo el norte y el centro de Europa y Canadá. Además se puede encontrar en Europa en productos cárnicos y queso. Parece no ser común en climas cálidos o en otros tipos de alimentos. La presencia de esta especie en los cereales europeos tiene dos consecuencias fundamentales: a) el que la OTA esté presente en una gran variedad de productos elaborados a base de cereales, entre los que habría que destacar el pan y otros alimentos comunes en la dieta; y b) el que la OTA esté presente en derivados de animales que han sido alimentados con piensos contaminados con la toxina.

6.4 Presencia de ocratoxina A en alimentos

Debido a la ubicuidad de los hongos productores, principalmente de las especies del género *Aspergillus* en los climas más cálidos y de la especie *P. verrucosum* en los países de clima frío, la OTA presenta una amplia distribución en productos agroalimentarios. Se detecta especialmente en sustratos vegetales, como cereales (trigo, cebada, etc.), y con menor frecuencia en leguminosas (Campbell *et al.* 2000, Fazekas *et al.* 2002, Fukal 1990, Garaleviciene *et al.* 2002, Gareis 1999, Gumus *et al.* 2004, Hennigen y Dick 1995, Höhler 1998, Holmberg *et al.* 1991, Jorgensen *et al.* 1996, 2002, Juan *et al.* 2007, Kuiper–Goodman y Scott 1989, Lin *et al.* 2005, MacDonald *et al.* 2004, Palermo *et al.* 2002, Park *et al.* 2005, Pittet 1998, Pohland *et al.* 1992, Scott *et al.* 1970, Scudamore 1996, Scudamore *et al.* 1997a, 1999a, 1999b, Slayne 2001, Solfrizzo *et al.* 1998, Thellmann *et al.* 1997, Trucksess *et al.* 1999, Veldman *et al.* 1992, Vrabcheva *et al.* 2000, Wolff 2000, Yoshizawa 1991, Wolff *et al.* 2000, Zinedine *et al.* 2006).



Figura 10. Aspecto que presenta un racimo de uvas y una mazorca de maíz en estado avanzado de podredumbre producida por *Aspergillus* de la sección *Nigri*.

También se ha encontrado en productos del cerdo y de aves (Canela *et al.* 1994, Curtui *et al.* 2001, Gareis y Wolff 2000, Holmberg *et al.* 1991, Jiménez *et al.* 2001, Jorgensen 1998, Kuiper–Goodman y Scott 1989, Leistner y Eckardt 1979, Lusky *et al.* 1994, Matrella *et al.* 2006, Petzinger y Weidenbach 2002, Pohland *et al.* 1992, Scott *et al.* 1991, Slayne 2001, Valenta 1998). Estos animales se contaminan al ser alimentados con piensos que contienen OTA (Abramson *et al.* 1983, Fukal 1990, Gareis y Wolff 2000, Holmberg *et al.* 1991, Pohland *et al.* 1992, Scudamore *et al.* 1997b).

La OTA, también, se ha detectado en otros sustratos como café (Burdaspal y Legarda 1998b, Studer–Rorh *et al.* 1995, Taniwaki *et al.* 2003) otros alimentos como cacao, chocolate y quesos (Dall’Asta *et al.* 2000b, Engel 2000), pan (Legarda y Burdaspal 2001), especias (Patel *et al.* 1996), vinagres y zumos de grosella, tomate y zanahoria (Majerus *et al.* 2000), ha sido también aislado de muestras de aceite de oliva (Papachristou y Markaki 2004). También existen hallazgos de OTA en uvas (Battilani y Pietri 2002, Battilani *et al.* 2004, Belli *et al.* 2004, Sage *et al.* 2002, 2004), vino (Blesa *et al.* 2004, López de Cerain *et al.* 2002, MacDonald *et al.* 1999, Majerus *et al.* 2000, Mateo *et al.* 2007, Serra *et al.* 2003, Var y Kabak 2007) y cerveza (Araguás *et al.* 2005, Degelmann *et al.* 1999, Legarda and Burdaspal 1998, Medina *et al.* 2005b, 2006a, Nakajima *et al.* 1999, Scott y Kanhere 1995). Todos estos productos alimenticios han adquirido una gran importancia debido a su amplio consumo en todo el mundo y en algunos casos, son producidos en nuestro país.

6.5 Metodología para la determinación de ocratoxina A

Debido a la gran importancia que poseen las micotoxinas, en los últimos años, las autoridades sanitarias están prestando más atención a la evaluación, comunicación y gestión de este riesgo en los alimentos de consumo habitual. Su peligrosidad es motivo de preocupación ya que pueden actuar a veces en concentraciones extremadamente pequeñas en comparación con otras sustancias contaminantes de alimentos. Por ejemplo

el tetracloruro de carbono es un agente que causa tumores en el 50% de las ratas expuestas a una dosis de 0.2 gramos por kilogramo y día. En comparación, una micotoxina bien conocida, como la aflatoxina B₁, es tres millones de veces más poderosa que este compuesto. Su umbral en ratas es de 0.000001 gramo por kilogramo y día (Abdel-Wahhab *et al.* 2006).

La necesidad de detectar pequeñas concentraciones de micotoxinas en general y de OTA en particular, requiere destreza en el análisis y procedimientos analíticos que en líneas generales incluyen muestreo de la materia a analizar, molienda o mezclado, extracción con disolventes orgánicos, métodos de purificación, concentración y finalmente técnicas cromatográficas. Existen diversos métodos analíticos para la detección de OTA en alimentos, piensos y materias primas que incluyen estas etapas. Otros métodos como técnicas inmunológicas (ELISA) también han sido empleadas pero en general son menos fiables y necesitan de análisis confirmativos especialmente cuando se requiere la cuantificación de la toxina en el producto contaminado, sin embargo el empleo de anticuerpos específicos presenta gran utilidad cuando se emplean en los pasos de extracción y purificación de la toxina previos a su análisis cromatográfico (Visconti y de Girolamo 2005).

Las limitaciones se pueden encontrar sobre todo en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde el principal problema son las restricciones económicas a que se ven sometidos, puesto que frecuentemente son técnicas de menor coste económico como la cromatografía en capa fina (TLC) las que se emplean para el control de micotoxinas en alimentos, incluso en muchos casos no existe ningún tipo de control. Se han hecho esfuerzos considerables para desarrollar métodos más reproducibles y sensibles para la determinación de micotoxinas, basados en cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida (LC) disminuyendo los límites de detección de estos metabolitos. Más recientemente como se ha indicado anteriormente, se han desarrollado técnicas que implican el uso de anticuerpos que reconocen específicamente las moléculas de toxina siendo muy útiles para la purificación de la OTA previamente a su análisis cromatográfico, son los llamados cartuchos o columnas de inmunoafinidad (IAC) (Hernández *et al.* 2006, Jodlbauer *et al.* 2002, Sharman *et al.* 1992, Visconti y de Girolamo 2005).

De modo general la extracción de la OTA se realiza con disolventes orgánicos en medio ácido, debido a que la OTA se presenta en forma disociada cuando se encuentra a pH neutro o básico (Scott 2002).

Para su análisis en vino se han utilizado varios procesos de purificación, necesarios si se desea obtener límites de detección bajos. Por ejemplo Zimmerli y Dick han utilizado separaciones líquido-líquido usando cloroformo tras una previa acidificación de la muestra (Zimmerli y Dick 1995) seguida de una purificación con IAC (Zimmerli y Dick 1996).

La adición de NaHCO₃ y polietilenglicol 8000 (PEG) a la muestra seguida de purificación mediante IAC ha sido también una técnica utilizada (Visconti *et al.* 1999, Visconti *et al.* 2001). Extracción en fase sólida (SPE)

utilizando cartucho C₁₈ previamente activados (Jornet *et al.* 2000, Zöllner *et al.* 2000) ha sido igualmente un método ampliamente empleado por diversos autores. La purificación de OTA con cartucho SPE de silica gel aunque menos frecuente, también ha sido descrita para el análisis de la toxina (Becker *et al.* 1998, Degelmann *et al.* 1999, Ospital *et al.* 1998).

Algunos autores (Siantar *et al.* 2003) han comparado la eficacia de las columnas de inmunoafinidad y de SPE y han encontrado que el empleo de las columnas de IAC proporciona mayores recuperaciones de la toxina que por ejemplo las columnas C₁₈ o columnas construidas con otros polímeros.

Entre los avances más recientes en las técnicas que requieren el empleo de columnas SPE destaca la aplicación de los llamados polímeros de huella molecular (*molecular imprinted polymers*). Una de las principales ventajas de este método es que el polímero se puede reutilizar varias veces en contraposición a los métodos en los que se emplean columnas de inmunoafinidad las cuales están provistas de una fase de un único uso y su coste económico es elevado. Estos polímeros son sintetizados usando como precursor N-fenilacrilamida (Maier *et al.* 2004).

En el caso de la cerveza, la extracción de la OTA ha sido realizada también adicionando NaHCO₃ y NaCl con la muestra previamente desgasificada seguida de una purificación con IAC (Legarda y Burdaspal 1998). En un estudio colaborativo coordinado por Visconti *et al.* (2001) publicado en la Revista de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) donde normalmente se recogen los métodos aceptados para el análisis de diferentes metabolitos de origen microbiano, previamente a la purificación de la OTA con IAC se procedía a la adición de PEG-NaHCO₃. Esta metodología ha sido adoptada como método oficial por la AOAC.

En los cereales, la extracción de la OTA ha sido realizada mediante una disolución metanol-agua 1% NaHCO₃ (70:30, v/v) (Sugita-Konishi *et al.* 2006a). Aunque la manera más habitual de extraer la micotoxina es con una disolución de acetonitrilo-agua (60:40) (Yazdanpanah *et al.* 2001, Zinedine *et al.* 2006). A continuación, al igual que en los otros sustratos, el método continúa con la purificación mediante IAC.

En general, la técnica más ampliamente utilizada en la determinación de la OTA, es la cromatografía líquida con detector de fluorescencia (LC-FLD). La cromatografía líquida acoplada a otros detectores ha sido también utilizada por ejemplo utilizando detectores de red de diodos (LC-DAD) (Soleas *et al.* 2001) o espectrómetros de masas (LC-MS o LC-MS/MS) (Degelmann *et al.* 1999, Lindenmeier *et al.* 2004, Reinsch *et al.* 2007, Zöllner *et al.* 2000).

Con independencia de las condiciones de la separación por cromatografía líquida, lo que sí queda patente es que el uso de columnas de fase reversa utilizando como fase móvil mezclas de acetonitrilo-agua-ácido acético o metanol-agua-ácido acético, o modificaciones de esta fase móvil en las que se reemplaza el ácido acético por ácido fosfórico, son los métodos más utilizados en los diferentes estudios. Debido a las características ligeramente ácidas de la OTA, la fase móvil empleada en cromatografía de

líquidos de fase reversa debe ser ácida para evitar una adsorción inespecífica en la columna. La utilización del acetonitrilo es más frecuente, debido a que las mezclas de éste con agua tienen una menor viscosidad y mejor eficacia en la separación que las mezclas de metanol y agua (Sáez *et al.* 2004).

De forma general en la determinación de OTA por cromatografía de líquidos se utiliza una elución en isocrático y en el caso de detección utilizando detector de fluorescencia las longitudes de onda de excitación y emisión son de 330 nm y 460 nm, respectivamente (Jornet *et al.* 2000).

Algunas variantes como el uso de un gradiente de metanol al 9% (Burdaspal y Legarda 1999) o el empleo de acetato de sodio–tampón ácido acético mezclado con acetonitrilo también han sido propuestos (Jornet y col. 2000).

Existen diferentes modificaciones metodológicas entre las cuales destaca la utilizada por Burdaspal y Legarda (1998a) en la que se procede a la adición de NH_4^+ post–columna con lo que se aumenta la fluorescencia de la OTA y por tanto mejora la sensibilidad del método y el límite de detención.

Para la determinación de la OTA se han utilizado otras técnicas como la cromatografía en capa fina (TLC) (Santos y Vargas 2002), cromatografía de gases de los trimetilsilil derivados usando espectrómetro de masas (GC–MS/MS) (FAO 1996), electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (Corneli y Maragos 1998) o inmunoensayos enzimáticos (EIA) (Barna–Vetró *et al.* 1996). En los métodos más recientes se propone sistemas SPE–LC–MS/MS en los cuales la extracción en fase sólida se realiza *on line*, es decir, que es en el propio sistema cromatográfico en el que se realiza una separación de forma previa a la inyección y de modo automatizado. Los sistemas en que se utilizan GC–MS son menos adecuados en cuanto a niveles de sensibilidad, recuperación y precisión (Soleas *et al.* 2001). También se ha aplicado espectroscopía óptica de ondulación de la luz (OWLS) en la detección de OTA basado en la reacción antígeno anticuerpo (Adányi *et al.* 2007). OWLS es una técnica de optosensores que utiliza un campo evanescente para el estudio *in situ* y específico de procesos superficiales que ocurren a nivel molecular.

7. Tricotecenos

Una clase importante de micotoxinas son los tricotecenos. Los géneros fúngicos conocidos de producir estas micotoxinas son *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, y *Cylindrocarpon*. *Fusarium* es de lejos, el más importante de estos géneros, porque están extendidos por todo el mundo y producen las mayores cantidades de tricotecenos. Algo más de 150 tricotecenos son conocidos, de los cuales, sólo unos pocos son importantes debido a su presencia en plantas cultivadas para uso alimenticio de seres humanos y animales (Grove 1988, 2000). Estas micotoxinas más destacadas son: deoxinivalenol (DON), también conocida

como vomitoxina; nivalenol (NIV); diacetoxiscirpenol (DAS) y toxina T-2 (T-2). Frecuentemente, también se encuentran ciertos derivados de las anteriores como son: 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON); 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON); fusarenona X (FusX); neosolanol (NEO) y toxina HT-2 (HT-2).

7.1 Estructura química

Los tricotecenos constituyen una familia estrechamente relacionada con los sesquiterpenoides producidos por varios hongos patogénicos de las plantas. Tienen un esqueleto común de un tetracíclico 12,13-epoxitricoteceno y pueden clasificarse en cuatro grupos o categorías (Smith *et al.* 1994, Ueno 1983, WHO 1990):

- Tipo A: caracterizado por un grupo funcional distinto al de una cetona C8.
- Tipo B: caracterizado por un carbonilo C8.
- Tipo C: caracterizado por un segundo grupo epoxi C7-C8 o C9-C10.
- Tipo D: caracterizado por un anillo macrocíclico entre C4 y C15 con dos enlaces de ésteres.

Los principales tricotecenos tipo A son: T-2, HT-2, T2-triol, DAS, NEO, monoacetoxiscirpenol y verrucarol; los tipo B son: DON, NIV, 3-ADON, 15-ADON, FusX; ejemplos de tricotecenos tipo C son crotocina y bacarina; y de tipo D son roridina A, satratoxina H y verrucarina A.

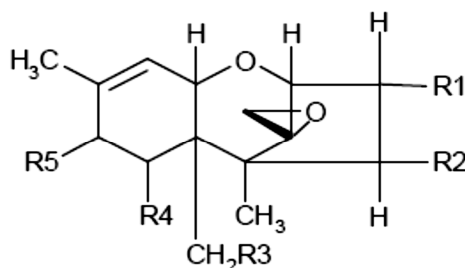


Figura 11. Estructura química de los tricotecenos tipo A.

Tabla 2. Algunos ejemplos de tricotecenos tipo A.

Nombre	Formula molecular	PM	R1	R2	R3	R4	R5
DAS	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366	OH	OAc	OAc	H	H
NEO	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	382	OH	OAc	OAc	H	OH
T-2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂

Los tricotecenos tipo A también se nombran como sigue:

- DAS: tricotec-9-ene-3,4,15-triol, 12,13-epoxi-, 4,15-diacetato.
- NEO: tricotec-9-ene-3,4,8,15-tetrol, 12,13-epoxi-, 4,15-diacetato.
- T-2: tricotec-9-ene-3,4,8,15-tetrol, 12,13-epoxi-, 4,15-diacetate 8-(3-metilbutanoato).
- HT-2: tricotec-9-ene-3,4,8,15-tetrol, 12,13-epoxi-, 15-acetato 8-(3-metilbutanoato).

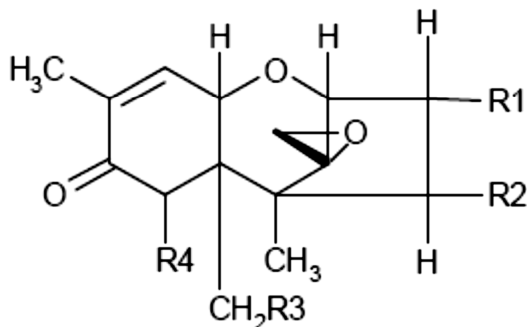


Figura 12. Estructura química de los tricotecenos tipo B.

Tabla 3. Algunos ejemplos de tricotecenos tipo B.

Nombre	Formula molecular	PM	R1	R2	R3	R4
NIV	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312	OH	OH	OH	OH
FusX	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354	OH	OAc	OH	OH
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	OH	H	OH	OH
3-ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	OAc	H	OH	OH
15-ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	OH	H	OAc	OH

Los tricotecenos tipo B también se pueden nombrar como:

- NIV: 12,13-epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxi tricotec-9-en-8-ona.
- FusX: 4-(acetiloxi)-12,13-epoxi-3,7,15-trihidroxi-tricotec-9-en-8-ona.
- DON: 12,13-epoxi-3,7,15-trihidroxi-tricotec-9-en-8-ona.
- 3-ADON: 3-(acetiloxi)-12,13-epoxi-7,15-dihidroxi-tricotec-9-en-8-ona.
- 15-ADON: 15-(acetiloxi)-12,13-epoxi-3,7-dihidroxi-tricotec-9-en-8-ona.

7.2 Propiedades físicas y químicas

Los tricotecenos son principalmente sólidos blancos cristalinos. Los tricotecenos tipo A son solubles en disolventes moderadamente polares, como cloroformo, dietil éter, acetato de etilo y acetona, mientras los tricotecenos tipo B requieren de una polaridad mayor en los disolventes, como mezclas de metanol-agua o acetonitrilo-agua.

Los tricotecenos carecen en sus estructuras de insaturación conjugada con la consecuente ausencia de absorción UV, a excepción de la absorción producida por algunos tricotecenos por la insaturación en C9–C10 a partir de 220 nm. Tampoco muestran fenómenos de fluorescencia bajo luz UV.

Cuando los tricotecenos contienen un grupo éster, al tratarse con una base se hidrolizan a su correspondiente alcohol.

Los tricotecenos son generalmente estables y no se suelen alterar por mezclas de varios disolventes orgánicos ni tampoco bajo condiciones suavemente ácidas (WHO 1990, Ueno 1987b).

7.3 Hongos productores

Se conocen varios géneros que producen tricotecenos: *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Cylindrocarpon*. Como ya se comentó, el género *Fusarium* es el más importante de todos por su extensión y producción de micotoxinas. La producción de tricotecenos depende de muchos factores, incluyendo el sustrato, temperatura, humedad, etc. Además, una sola especie fúngica puede producir más de una toxina (dependiendo de la cepa y/o condiciones medioambientales), mientras ciertos tricotecenos pueden producirlos diferentes especies o cepas fúngicas. La identificación de los *Fusarium* productores de tricotecenos es compleja debido a la existencia de diferentes sistemas taxonómicos, pero *F. sporotrichioides* y *F. graminearum* (estado perfecto de *Gibberella zeae*) son generalmente considerados como muy importantes en micotoxicología de tricotecenos. El hongo de la especie *F. sporotrichioides* (sinónimo de *F. tricinctum*) está asociado principalmente con la producción de tricotecenos tipo A (T-2, HT-2, DAS, NEO), mientras *F. graminearum* está ampliamente distribuido en granos de cereal y es el mayor productor de tricotecenos tipo B (NIV, DON). Existen dos quimiotipos de *F. graminearum*, uno que produce mayoritariamente NIV, FusX y 4,15-diacetil-NIV (tipo NIV) y otro que produce DON, 3- y 15-ADON y 3,15-diacetil-DON (tipo DON) (Birzele *et al.* 2000, Bottalico 1998, González *et al.* 1996, 1999, IARC 1993, Ichinoe y Kurata 1983, Olsson *et al.* 2002, Samar *et al.* 2003, Scott *et al.* 1984, Sweeney y Dobson 1998, Smith *et al.* 1994, Ueno 1987a, 1987b, WHO 1990).

Tabla 4. Producción de tricotecenos por especies de *Fusarium*.

Micotoxina	Especie de <i>Fusarium</i>
T-2, HT-2	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. langsethiae</i>
DAS	<i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. langsethiae</i>
NEO	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. equiseti</i>
DON	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
NIV	<i>F. crookwellense</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. equiseti</i>
FusX	<i>F. crookwellense</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. equiseti</i>
3-ADON	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
15-ADON	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>

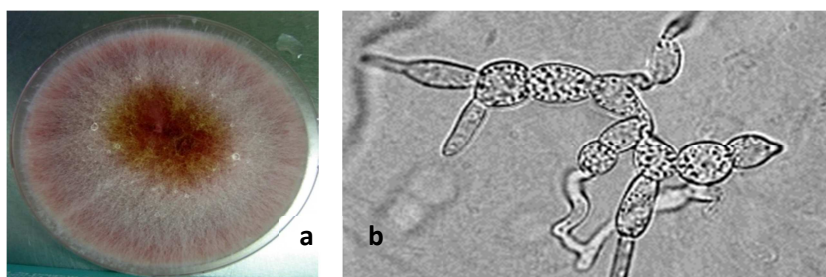


Figura 13. a) colonia de *Fusarium culmorum* crecido en medio de cultivo PDA a 25°C durante 8 días. b) Clamidiósporas de *F. culmorum* (microscopio óptico 400x).

7.4 Patogenicidad en las plantas e incidencia en alimentos

El género *Fusarium* está considerado como un hongo de campo, por lo que principalmente es considerado como un patógeno de las plantas, aunque, si las condiciones medioambientales son favorables, pueden continuar creciendo en las cosechas almacenadas. Las cepas de *Fusarium* productoras de micotoxinas son un problema a nivel mundial debido a que pueden crecer en cualquier clima. Estas cepas han sido aisladas en regiones del ártico, Argentina, Austria, Bulgaria, Canadá, China, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Italia, Japón, Corea, Nepal, Polonia, Portugal, Rusia, Suecia, Reino Unido, Yemen, España, Holanda, Brasil, Finlandia, Egipto, Nigeria, India, Malasia, Suráfrica, Australia y Nueva Zelanda. Las especies de *Fusarium* pueden contaminar una amplia variedad de plantas, especialmente cereales, siendo el mayor patógeno para estos cultivos. Los hongos infectan el pequeño grano del cereal (trigo, cebada, avena, centeno, arroz, sorgo, mijo) y maíz, y causa un número incontable de enfermedades sobre la planta (marchitación de la planta, roña, podredumbre y fusariosis

de la espiga), que reducen considerablemente la calidad y producción de la cosecha. Las especies *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* se consideran asociadas predominantemente con estas enfermedades. Cuando factores medioambientales como temperatura y humedad son favorables, estos hongos producen micotoxinas (especialmente DON y NIV), que pueden terminar contaminando piensos y alimentos (Bottalico 1998, Smith *et al.* 1994, WHO 1990). Por tanto, los niveles de tricotecenos en trigo, cebada y maíz pueden variar ampliamente de un año a otro y de una región a otra en función de las condiciones medioambientales (Rotter *et al.* 1996).

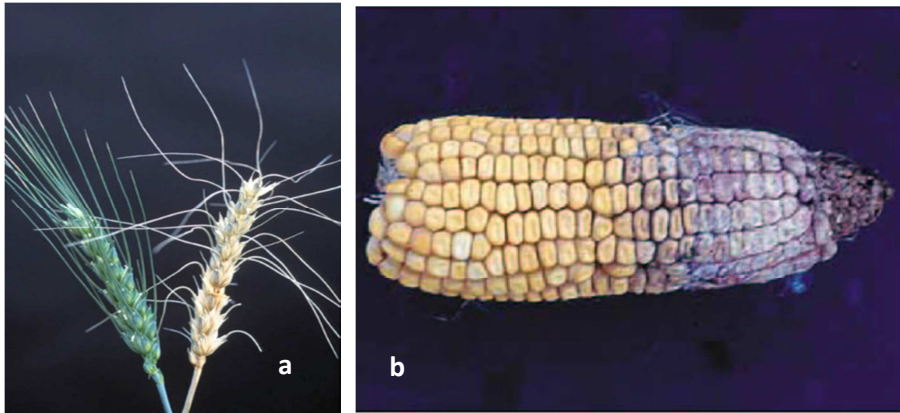


Figura 14. Aspecto de cereales contaminados con *Fusarium graminearum* a) dos espigas de trigo, la espiga de la derecha está infectada por el hongo, la de la izquierda está totalmente sana. b) aspecto de una mazorca de maíz infectada por el hongo.

El DON, que es probablemente la micotoxina de *Fusarium* más habitual en productos agroalimentarios, contamina diversos cereales, especialmente el maíz y el trigo, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y por consiguiente contamina productos elaborados a base de cereal en los alimentos (Dalcero *et al.* 1997, Eriksen y Alexander 1998, Jiménez *et al.* 1993, Mateo *et al.* 2004, Müller *et al.* 1997, Pacin *et al.* 1997, Quiroga *et al.* 1995, Razzazi-Fazeli *et al.* 1999, Ryu *et al.* 1996, Samar *et al.* 2001, Scott 1993b, Tanaka *et al.* 1988, 1990, Trenholm *et al.* 1981, Trigo-Stockli *et al.* 1998, Trucksess *et al.* 1995, Yoshizawa y Jin 1995). Se ha encontrado DON en alimentos como harina de maíz y cereales de desayuno a base de avena (Abouzied *et al.* 1991, Canady *et al.* 2001). Evaluaciones recientes de alimentos infantiles a base de cereales obtenidos en diversos supermercados canadienses demuestran una regular presencia de tricotecenos, entre los que cabe destacar el DON (Lombaert *et al.* 2003). DON también ha sido detectado en bajas concentraciones en cerveza (Molto *et al.* 2000, Scott *et al.* 1993a, Scott 1996a, Shim *et al.* 1997, Taschan *et al.* 2000, Torres *et al.* 1998) como resultado del crecimiento de *F. graminearum* en cebada en el campo o durante el estado de germinación de la cebada a malta.

La ingestión de DON ha ocasionado brotes de micotoxicosis agudas en la población de la India, China y zonas rurales del Japón. El brote surgido en China en 1984–85 se debió al consumo de maíz y trigo mohosos; en un plazo de entre cinco y treinta minutos aparecían síntomas como náuseas, vómitos, dolores abdominales, diarrea, mareos y cefaleas (Bhat *et al.* 1989, IARC 1993, Luo 1988).

F. graminearum además de producir DON es capaz de producir también NIV (Quarta *et al.* 2006) (molécula relacionada pero con características que le confieren mayor polaridad) en diferentes alimentos, cuyo consumo se ha asociado con casos de la "enfermedad del moho rojo" (*akakabi-byo*). Los síntomas comprenden anorexia, náuseas, vómitos, cefalea, dolor abdominal, diarrea y convulsiones (Marasas *et al.* 1984). El NIV es más tóxico que el DON en dosis similares pero su incidencia en muestras contaminadas de forma natural es más baja (Ciegler 1978).

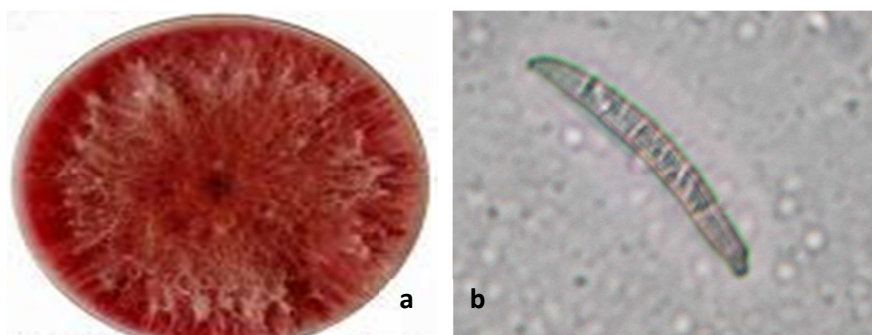


Figura 15. . a) colonia de *Fusarium graminearum* crecido en medio de cultivo PDA a 25°C, b) conidio de *F.graminearum* (microscopio óptico 400x).

Una vez almacenada la cosecha, la mayoría de las micotoxinas presentes permanecerán estables bajo condiciones aeróbicas pero si existe un control adecuado de humedad del grano siendo mantenido éste por debajo del 15% se podrá prevenir el crecimiento de los hongos productores de tricotecenos (Scudamore y Livesey 1998). Cuando la humedad del grano sea elevada, los hongos de campo (como *Fusarium*) serán reemplazados parcialmente por hongos de almacenamiento (como *Aspergillus* y *Penicillium*).

7.5 Toxicidad de los tricotecenos

7.5.1 Toxicidad general

Los tricotecenos producen una variedad de síntomas tóxicos en humanos y animales, incluyendo mortalidad, irritación gastrointestinal y de la piel, necrosis, desórdenes hematológicos (inicialmente se puede presentar una leucocitosis seguido por una leucopenia), diarrea, vómito y rechazo del alimento, pérdida de peso, daño en los tejidos hematopoyéticos en la médula, bazo, ganglio linfático, y alteraciones inmunológicas. Al final, los tricotecenos pueden suprimir y estimular la función inmune resultando, en

cualquier caso, afectada la resistencia a la infección o a la neoplasia, presentando desórdenes en hipersensibilidad o auto-inmunidad (Berger *et al.* 1999, D’Mello *et al.* 1999, Li *et al.* 1999, Nelson *et al.* 1994, Pacin, 1992, Prelusky *et al.* 1994, Rotter *et al.* 1996, Sugita-Konishi *et al.* 1998, Trucksess *et al.* 1996, Tryphonas *et al.* 1984, Ueno, 1983, Vesonder *et al.* 1979).

Bioquímicamente, los tricotecenos son altamente tóxicos a nivel subcelular, celular y de órgano. Son muy citotóxicos a células eucariotas, causando roturas en la célula e inhibición de la mitosis. Los tricotecenos son también potentes inhibidores de la síntesis de la proteína, DNA y RNA y pueden interaccionar con la membrana celular (Pestka y Bondy 1990).

Se ha demostrado que los tricotecenos cambian la composición de la microflora intestinal (Tenk *et al.* 1982).

La toxicidad de los tricotecenos depende de las modificaciones de los grupos situados en el esqueleto de la molécula. En general, los tricotecenos macrocíclicos (tipo D) son los más potentes, seguido por los de tipo A, tipo B y tipo C. Los tricotecenos tipo A, son las sustancias con un grupo acetilo en R3 (Figura 11), que es el que le proporciona mayor potencia. En el caso de los tricotecenos tipo B, la potencia es principalmente influenciada por el grupo que se encuentre en R2 (Figura 12); la potencia decrece en orden de acetilo > hidroxilo > hidrógeno. También la adición de un grupo acetilo en el grupo R1 resulta una pérdida de potencia (Eriksen y Alexander 1998, Thompson y Wannemacher 1986).

7.5.2 Toxicidad de deoxinivalenol

DON es biológicamente activo y puede afectar al marcado, diferenciación, y crecimiento de la célula y a la síntesis macromolecular. Esto contribuye indudablemente a un amplio espectro de efectos, que afectan a la homeostasis gastrointestinal, crecimiento, función neuroendocrina e inmunidad. Se han encontrado diferencias de sensibilidad al DON según la especie de animal a la que se realizaba la experimentación, siendo el cerdo el más sensible seguido por el ratón, perro, gato, aves y rumiantes. Este espectro de sensibilidades, deriva de las diferencias toxicocinéticas, metabólicas y hábitos alimentarios de las diferentes especies

Para producir mortalidad o dañar los tejidos son necesarios exposiciones agudas a altos niveles de DON. Por el contrario, exposiciones agudas a dosis relativamente bajas pueden inducir a vómitos especialmente en cerdos, la especie más sensible. (Yoshizawa y Morooka 1974, Hughes *et al.* 1999). La manifestación de esta respuesta en un animal no sólo depende de la concentración de DON en un alimento, sino también de la porción ingerida. DON también puede inducir a emesis en gatos y perros, pero no se ha encontrado una respuesta emética en ratones y ratas y tampoco en primates y humanos. Sin embargo, basándose en el uso de modelos de porcinos para humanos en la función intestinal (Nejdfors *et al.* 2000) y fármacos que inducen a emesis (Szelenyi *et al.* 1994), no es descabellado especular que los humanos son tan sensibles al DON como los cerdos.

Además, estudios epidemiológicos en China sugieren que DON podría inducir a efectos eméticos en humanos.

Estudios subcrónicos y crónicos indican que animales monogástricos son extremadamente sensibles a la pérdida de ganancia de peso y de crecimiento para el DON. Esto puede ser acompañado de anorexia a mayores concentraciones de DON en la dieta. La reducción de peso aparece como resultado de reducir la ingesta de pienso (anorexia) y es reversible una vez DON se ha eliminado de la alimentación. La respuesta anoréxica, probablemente podría deliberar de las alteraciones en el sistema serotoninérgico, además de sobrerregulación de citocinas proinflamadas como TNF- α que son conocidas de producir caquexia. El cerdo, que es más sensible al DON que el ratón y la rata, se le detectaron lesiones en el tracto gastrointestinal y en los tejidos linfoides (Pestka y Smolinski 2005).

Algunos componentes son muy sensibles a la respuesta inmune al DON, mientras que otros son menos. Estudios con ratones sugieren que DON puede suprimir la resistencia del huésped a la *Listeria* (Pestka *et al.* 1987b, Tryphonas *et al.* 1986) y a la *Salmonella* (Sugita-Kinoshi *et al.* 1998). Además, las respuestas del anticuerpo son también afectadas por el DON en roedores (Pestka *et al.* 1987, Robbana-Barnat *et al.* 1988), siendo el cerdo el más sensible de los animales de experimentación (Rotter *et al.* 1994). También se ha informado del incremento de anticuerpos inmunoglobulina A (IgA) en suero en roedores y cerdos (Forsell *et al.* 1986, Greene *et al.* 1994, Swamy *et al.* 2002). Por tanto, el DON puede ser inmunoestimulante o inmunosupresor.

DON es capaz de inducir efectos reproductivos y teratogénicos similares en ratones y conejos. Sin embargo, hubo una pequeña distinción entre las dosis de toxina que produce toxicidad maternal (rechazo del pienso o reducción de ganancia de peso) y los que producen efectos reproductivos adversos. Las ratas no parecen ser sensibles a estos efectos, sugiriendo que existen diferencias de toxicidad entre especies (Khera *et al.* 1984, 1986).

Un hecho encontrado de estos estudios es que DON es metabolizado en todas las especies y no se bioacumula. Así, los residuos de esta toxina en leche, carne, y huevos de los alimentos de origen animal no parecen ser preocupantes para la salud pública (Pestka y Smolinski 2005).

7.5.3 Toxicidad de 3- y 15-ADON

Debido a la escasez de datos disponibles en la actualidad, sobre 3 y 15-ADON no es posible disponer de todas las propiedades toxicológicas. Sólo se puede establecer que después de una administración oral de estas micotoxinas en ratas, los efectos agudos afectan a la división de células de la médula ósea, el timo, el bazo y los intestinos y ejerce actividad inmunotóxica (inmunosupresora y inmunoestimulante). Los estudios indican un potencial inicial del rechazo de alimentos en los animales y reducción de ganancia de peso corporal. (Atkinson y Miller 1984, Kasali *et al.* 1985, Schiefer *et al.* 1985, Thompson y Wannemacher 1986, Ueno 1983).

7.5.4 Toxicidad de nivalenol

La absorción de NIV es rápida y amplia, y su excreción es principalmente por las heces. (Onji *et al.* 1989). Después de la administración oral de NIV en ratas y ratones, se manifiesta una toxicidad mayor en efectos crónicos que en agudos.

Los experimentos en NIV en ratones muestran reducción de ganancia de peso corporal, reducida eficiencia de la alimentación en los animales, cambios de peso de los órganos sin histopatologías asociadas (Kawasaki *et al.* 1990) y hematotoxicidad (toxicidad en médula ósea, leucopenia y/o hematopenia) (Ryu *et al.* 1987, Sato 1978). No se han encontrado desarrollos de tumores en ratones hembra (Hedman *et al.* 1997a, Onji *et al.* 1990).

En cerdos, NIV causa cambios patológicos suaves en el tracto gastrointestinal, riñón y bazo sin producir vómitos o que afecte al número de leucocitos, a la ganancia de peso corporal y al consumo de alimento (Ryu *et al.* 1988, Yabe *et al.* 1993).

IARC (1993) concluyó que no existen suficientes evidencias en animales de experimentación para determinar la carcinogenicidad de NIV. No habiendo datos disponibles para humanos. Por tanto, IARC estableció que NIV no está clasificado como un carcinogénico para el ser humano (Grupo 3). Sin embargo, el NIV, es un débil inductor de aberraciones del cromosoma en células mamarias *in vitro* y parece ser que puede inducir daños en el DNA. (Hsia *et al.* 1988, Thompson y Wannemacher 1986, Ueno 1984).

En ratones, NIV es embriotóxico y fetotóxico pero no teratogénico (Ito *et al.* 1988). Además, NIV ejerce actividad antiviral e inmunotoxicidad, pudiendo ser inmunosupresora e inmunoestimulante. También es citotóxica, produce toxicidad dérmica, inhibición de la síntesis de la proteína y del DNA, y es un potencial inductor al vomito (Thust *et al.* 1983).

7.6 Determinación de los tricotecenos

Langseth y Rundberget (1998) y Krska *et al.* (2001) entre otros muchos autores, ha desarrollado una exhaustiva revisión de los métodos cuantitativos y cualitativos para el análisis de tricotecenos. En general son necesarios cuatro pasos para la determinación de los tricotecenos en las muestras, incluyendo la preparación de la muestra, extracción, purificación, detección y cuantificación de las toxinas.

7.6.1 Muestreo

En general, las micotoxinas están distribuidas heterogéneamente en los productos, lo que dificulta la obtención de una muestra representativa (van Egmond y Speijers 1999). Por tanto, se requieren de planes de muestreo bien definidos para reducir la varianza, incluyendo la utilización de grandes porciones de muestra inicial. Para preparar una porción representativa para el análisis, la muestra debe ser molida y mezclada. En

la extracción se suelen utilizar tamaños de muestra de 20 a 50 g, aunque también se pueden utilizar cantidades menores, pero requieren de un gran cuidado para la obtención de una porción.

7.6.2 Extracción

Varias combinaciones de disolventes han sido utilizadas para la extracción de los tricotecenos incluyendo metanol-agua, acetonitrilo-agua y acetato de etilo-acetonitrilo en varias proporciones (Mateo *et al.* 2001). De todos ellos, el medio de extracción más extensamente utilizado es acetonitrilo-agua (84:16, v/v) para la determinación de tricotecenos (Langseth y Rundberget 1998). El tiempo de extracción está estrechamente relacionado con el tamaño de partícula de la muestra, el agitador y el matraz de extracción utilizados y tiene que ser optimizado para cada combinación.

7.6.3 Purificación

Varios procedimientos de purificación de los extractos han sido descritos. La mayoría de los procedimientos incluyen la purificación de los extractos mediante columnas rellenas con adsorbentes como sílica, Florisil® o carbón activo-alumina. Una modificación basada en la columna carbón activo-alumina, columna MycoSep® muestra buenos resultados en la determinación de tricotecenos (Radová *et al.* 1998, Weingaertner *et al.* 1997).

Recientemente se están utilizando columnas de inmunoafinidad para DON y T-2/HT-2 (Cahill *et al.* 1999), teniendo los inconvenientes de que son aplicables a una sola toxina y sus recuperaciones son un poco pobres.

7.6.4 Detección y cuantificación

Las técnicas analíticas más habituales para identificar y cuantificar los tricotecenos son la cromatografía de capa fina (TLC); cromatografía líquida (LC) con pre- o post- derivatización y subsiguiente detección por espectrofotometría de UV, fluorescencia (FLD) o espectrometría de masas (MS); cromatografía de fluidos supercríticos (SFC); y por cromatografía gaseosa (GC) con detector de captura electrónica (ECD) o de ionización de llama (FID), o detección por MS (Schothorst y Jekel 2001).

La técnica más utilizada es cromatografía gaseosa con detector de ECD o MS (Langseth y Rundberget 1998). Antes del análisis por GC, los tricotecenos requieren la derivatización de los grupos hidroxilo, que pueden ser derivatizados con diferentes agentes derivatizantes. La elección del derivatizante depende del tricoteceno determinado y del tipo de detección utilizado.

Para análisis rutinarios y rápidos, se propone la utilización mediante métodos inmunológicos (ELISA) (Krska *et al.* 2001). En general, no es necesaria ninguna purificación previa después de la extracción de la micotoxina. Los ensayos pueden ser aplicados directamente al extracto y los resultados son rápidamente obtenidos. Los métodos ELISA son muy

sensibles, sin embargo la incertidumbre de los resultados es, en general, elevada y además, los métodos ELISA no están disponibles para todos los tricotecenos.

Un método que determina varios tricotecenos (tipo A y B) propuesto para muestras de trigo, está basado en la técnica de GC-FID (Schothorst and Jekel 2001). En el procedimiento, previamente se realiza una extracción de los tricotecenos de la matriz con acetonitrilo-agua (84:16, v/v); a continuación se utilizan dos columnas diferentes de Mycosep® para purificar el extracto. El extracto es evaporado a sequedad. Los tricotecenos son derivatizados a trimetilsilil éteres a temperatura ambiente. El residuo es disuelto en iso-octano y lavado con agua. El extracto final es analizado mediante GC con FID.

7.6.5 Determinación de tricotecenos tipo B

Para la determinación de tricotecenos tipo B, la cromatografía gaseosa es la técnica más utilizada (Langseth y Rundberget 1998, Krska *et al.* 2001). Una de las ventajas de los métodos por GC es el análisis simultáneo de varios tricotecenos (Krska *et al.* 2001).

Para la extracción de los tricotecenos tipo B en la muestra, se utiliza generalmente una mezcla de acetonitrilo-agua en una relación de 84:16, v/v (Langseth y Rundberget 1999, Radová *et al.* 1998), aunque en ocasiones se han utilizado otras mezclas de disolventes (Langseth y Rundberget 1998, Wetter 1999).

Posteriormente, en el proceso de purificación, por lo general, se utilizan diferentes columnas de extracción en sólido: con una mezcla de carbón activo y alumina o con otros compuestos adsorbentes, columnas MycoSep®, columnas de sílica, columnas de intercambio catiónico, columnas C₁₈, columnas Florisil® (Berger *et al.* 1999, Cunniff 1998, Croteau *et al.* 1994, Hsueh *et al.* 1999, Keblys *et al.* 2000, Krska 1998, Langseth *et al.* 1999, Langseth y Clasen 1992, Lauren y Greenhalgh 1987, Malone *et al.* 1998, Mateo *et al.* 2001, Möller y Gustavsson 1992, Mossoba *et al.* 1996, Onji *et al.* 1998, Prom *et al.* 1999, Radová *et al.* 1998, Razzazi-Fazeli *et al.* 1999, Schothorst y Jekel 2001, Schuhmacher *et al.* 1997, Trucksess *et al.* 1996, Walker y Meier 1998, Weingaertner *et al.* 1997). También se han utilizado columnas de inmunoafinidad para la purificación del DON en el extracto y la extracción mediante fluidos supercríticos (Cahill *et al.* 1999, Järvenpää *et al.* 1997, Josephs *et al.* 1998, Kotal y Radová 1998, Krska 1998, Krska *et al.* 2001, Radová *et al.* 1998, Scott y Trucksess 1997).

Actualmente, los métodos de separación o detección para la determinación de tricotecenos tipo B incluyen el ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) (Sinha *et al.* 1995), radioinmunoensayo (Park y Chu 1996), minicolumna fluorescente (Gordon y Gordon 1990), cromatografía en capa fina (Schaafsma *et al.* 1998), cromatografía líquida (LC) o cromatografía gaseosa (GC). Aunque se pueden utilizar varias técnicas para el análisis del extracto purificado se suelen utilizar la GC o LC.

La técnica GC es la más ampliamente usada para la determinación de estos analitos, los tricotecenos son normalmente derivatizados para lograr la volatilidad y sensibilidad requerida antes de inyectar en el cromatógrafo de gases (Langseth y Rundberget 1998). A pesar de ello, existe algún método publicado que evita la derivatización (D'Agostino *et al.* 1986). La etapa de derivatización es una de las más críticas en la determinación de tricotecenos (Gilbert *et al.* 1985, Kanhere y Scott 1990, Kientz y Verweij 1986, Scott 1993c). La derivatización de los tricotecenos tipo B está basada usualmente en la derivatización de los grupos hidroxilo mediante la trimetilsililación o la fluoroacilación. Los reactivos que se suelen utilizar para la sililación son bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), trimetilsilil imidazol (TMSI), una mezcla de TMSI y trimetilclorosilano (TMCS) y mezclas comerciales como bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida-TMSI-TMCS (3:3:2, v/v/v) y más comúnmente BSA-TMSI-TMCS (3:3:2, v/v/v). En la derivatización con compuestos fluorados se suelen utilizar reactivos como heptafluorobutiril imidazol (HFBI), anhídrido heptafluorobutírico (HFBA), pentafluoropropionil imidazol (PFPI), anhídrido pentafluoropropionilo (PPFA) y anhídrido trifluoroacético (TFAA) (Langseth y Rundberget 1998, Nielsen y Thrane 2001). Krska *et al.* (2001) informaron que se obtenía un menor número de picos interferentes con la utilización de los trimetilsilil derivados que con los derivados fluorados.

Langseth y Rundberget (1998) han revisado la composición de la fases estacionarias siendo las columnas rellenas de 100% dimetil siloxano; 5% fenil o 7% fenil 7% cianopropil dimetil siloxano las más habituales utilizadas para la separación de los derivados de los tricotecenos por GC. Para su determinación, los detectores utilizados suelen ser el de captura electrónica (ECD) o el detector de espectrometría de masas (MS) (Langseth y Rundberget 1998). El ECD es selectivo para la detección de los tricotecenos tipo B derivatizados con reactivos trimetilsilil debido al grupo carbonilo conjugado en su molécula. También se consigue muy buena sensibilidad y selectividad con el ECD al derivatizar con los fluoroacilados (Langseth y Rundberget 1998). El uso de un detector MS reduce la necesidad de purificaciones extensas, es muy selectivo para los tricotecenos tipo B y permite la determinación simultánea de toxinas. La ionización de la molécula en el espectrómetro de masas puede ser por impacto electrónico (EI), por ionización química modo positivo (PCI), o por ionización química modo negativo (NICI) (Gravesen *et al.* 1999, Hewetson y Mirocha 1987, Langseth y Rundberget 1998). También ha sido aplicado el tándem MS/MS (Kostiainen y Rizzo 1988, Kostiainen *et al.* 1989). Además, Tanaka *et al.* (2000) indican que GC-MS es una herramienta poderosa y práctica para la confirmación de tricotecenos tipo B. Sin embargo, aunque GC-MS es una técnica bastante adecuada para la determinación de tricotecenos tipo B en cereales, GC-ECD es todavía utilizada en muchos laboratorios debido a su simplicidad y menor coste del detector, y buena selectividad y sensibilidad. Otro sistema de detección cada vez menos extendido es el detector de ionización en llama (FID) que ha sido aplicado, aunque con la obtención de resultados menos sensibles (Furlong y Valente Soares 1995).

También se ha utilizado la cromatografía de líquidos para la determinación de tricotecenos tipo B, aunque las interferencias con otros compuestos son más problemáticas que con las técnicas de GC (Langseth y Rundberget 1998). Debido a la pobre absorción en el ultravioleta de los tricotecenos tipo B, los límites de detección son elevados en comparación con otras técnicas utilizadas por GC (Frivvad y Thrane 1993). En LC, se suele utilizar una columna en fase reversa al que posteriormente se le acopla un detector, como el electroquímico, o el detector de fluorescencia previa derivatización de las micotoxinas con cloruro de *p*-nitrobenzoilo, 1-etoxi-4-(dicloro-1,3,5-tiazinil)naftaleno, 9-fluorenilmetil cloroformiato, cloruro de antraceno-9-carbolilo, 1-antróilnitrilo o cloruro de cumarin-3-carbonilo o con derivatización post-columna que involucra la degradación alcalina (Cahill *et al.* 1999, Cohen y Boutin-Muma 1992, 1998, Dall'Asta *et al.* 2004b, Jiménez *et al.* 2000, Josephs *et al.* 1998, 2001, Mateo *et al.* 2001, Sano *et al.* 1987, Sylvia *et al.* 1986, Trucksess *et al.* 1996, Visconti y Bottalico 1983, Walker y Meier 1998). Sin embargo debido al gran número de grupos hidroxilos presentes en los tricotecenos tipo B se suele producir una derivatización incompleta o irreproducible (Mateo *et al.* 2001). Otros autores describen diversos métodos analíticos por cromatografía líquida que incluyen sólo análisis directo utilizando detección ultravioleta (Maragos y Plattner 2002, Walker y Meier 1998). La LC-MS ha sido también utilizada para la determinación de tricotecenos tipo B (Berger *et al.* 1999, Dall'Asta *et al.* 2004a, Rajakylä *et al.* 1987, Razzazi-Fazeli *et al.* 1999, Tiebach *et al.* 1985).

8. Patulina

8.1 Generalidades: Estructura química y propiedades

El nombre químico de la micotoxina denominada patulina (PAT) es 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona (C₇H₆O₄; PM: 154.12 g/mol). Es una lactona heterocíclica insaturada, en forma de sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 105–108°C, y con un máximo de absorción a 276 nm. Se trata de una molécula neutra, soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, excepto en pentano, hexano y poco soluble en éter etílico y benceno. En disolución acuosa es relativamente estable frente a la temperatura especialmente en condiciones de pH ácido (Falleiros De Pádual y Machinski Junior 2005), por lo que el tratamiento térmico, por sí solo, no es suficiente para garantizar su eliminación (Lovett y Peeler 1973). La PAT es sensible a la acción rédox de los sulfitos y del ácido ascórbico (Brackett y Marth 1979), siendo destruida por la fermentación alcohólica y el tratamiento con carbón activo, perdiendo su actividad biológica en medios alcalinos (Codex Alimentarius Comisión 1999).

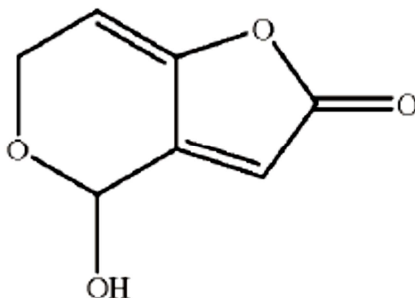


Figura 16. Estructura química de la patulina.

8.2 Metabolismo y efectos tóxicos de la patulina

Primeramente la PAT se aisló como un antibiótico durante la década de 1940 (Scott y Bullerman 1975). Más tarde, hallaron que era un inhibidor de más de 75 especies de bacterias incluidas las Gram-positivas y las Gram-negativas (Ciegler *et al.* 1971). En esos años iniciales se sugería que la PAT tenía aplicaciones en tratamientos de congestión nasal y resfriados comunes, sin ningún estudio clínico que lo avalara (Stansfield *et al.* 1944). No mucho más tarde, varios estudios sugerían que la patulina podía ser, no sólo tóxica para los hongos y bacterias, sino también para animales y en mayor proporción en plantas, incluyendo pepino, trigo, guisantes, maíz y lino (Berestets'kyi y Synyts'kyi 1973, Norstads y McCalla 1963, 1968).

Un amplio número de estudios realizados durante más de cincuenta años valoraron los riesgos de la PAT sobre la salud en humanos basándose en un amplio número de efectos agudos, crónicos y a nivel celular. Los resultados de todos estos estudios son inconcluyentes, pero sugieren que el consumo de PAT puede producir síntomas agudos como, convulsiones, inquietud o agitación, disnea, congestión pulmonar, edema, ulceración, hiperemia, distensión del tracto gastrointestinal, hemorragia intestinal, degeneración de la célula epitelial, inflamación intestinal, vómito y otros daños gastrointestinales y renales. (Escoula *et al.* 1977, Hayes *et al.* 1979, Lai *et al.* 2000, Mahfoud *et al.* 2002, McKinley y Carlton 1980a, 1980b, McKinley *et al.* 1982, Moake *et al.* 2005, Walker y Wiesner 1944). Los riesgos crónicos sobre la salud por el consumo de patulina pueden incluir neurotoxicidad, inmunotoxicidad, inmunosupresión, genotóxicidad y teratogenicidad (Ciegler *et al.* 1976, Dickens y Jones 1961, Hopkins 1993, Korte 1980, Lee y Röschenthaler 1986, Mayer y Legaror 1969, Oswald *et al.* 1978, Pfeiffer *et al.* 1998, Roll *et al.* 1990, Thust *et al.* 1982, Wichmann *et al.* 2002). Sin embargo, no existen pruebas concluyentes que demuestren su naturaleza carcinogénica, de forma que la Agencia Internacional para Investigación del Cáncer ha incluido la PAT en el Grupo 3, como sustancia para la que no existen datos suficientes que permitan su clasificación, al no haberse podido evaluar su potencial carcinogénico en humanos, siendo asimismo inadecuadas las evidencias existentes en animales de experimentación (IARC 1986, Legarda y Burdaspal 2005).

A nivel celular, se ha indicado que la PAT produce varios efectos tóxicos, incluyendo trastorno de la membrana plasmática (Mahfoud *et al.* 2002, Riley y Showker 1991), inhibición de la síntesis de la proteína (Arafat y Musa 1995, Hately y Gaye 1978, Miura *et al.* 1993), inhibición del transporte aminoácido unido con Na⁺ (Ueno *et al.* 1976), trastorno de la transcripción y traducción (Arafat *et al.* 1985, Lee y Roschenthaler 1987, Moule y Hately 1977), e inhibición de la síntesis de DNA (Cooray *et al.* 1982). Se cree que la PAT puede causar daños en la célula por formación de aductos con componentes celulares que contienen grupos tiol como glutatióna y proteínas que contienen cisteína (Harwig *et al.* 1973a, Barhoumi y Burghardt 1996). Además, muchas enzimas con grupos sulfhidrilos en lugares activos son sensibles a la PAT produciendo su inhibición (Arafat *et al.* 1985, Ashoor y Chu 1973, Moule y Hately 1977, Phillips y Hayes 1977, 1978, Riley y Showker 1991), aunque algunos enzimas, como la ureasa, que carecen del grupo sulfhidrilo en lugares activos son también sensibles a la PAT (Reiss 1977). También, la pérdida de glutatióna libre en células vivas está asociada con la exposición de la PAT (Burghardt *et al.* 1992, Barhoumi y Burghardt 1996). Además, se ha demostrado que la PAT puede inducir el entrecruzamiento de enlaces intra e intermoleculares de la proteína. Esta reacción se da preferentemente con el grupo tiol, pero también ocurre con cadenas de lisina e histidina y grupos amino (Fliege y Metzler 1999). Recientes estudios han demostrado que concentraciones micromolares de PAT fueron capaces de inducir a una disminución rápida y dramática de la resistencia transepitelial de células intestinales epiteliales humanas sin muestras importantes de toxicidad según lo determinado para el análisis en la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Mahfoud *et al.* 2002).

8.3 Hongos productores y presencia de PAT en alimentos

PAT es producida por más de 60 especies de hongos abarcando unos 30 géneros (Lai *et al.* 2002). Incluidos entre ellos *Penicillium expansum* (*P. leucopus*), *P. patulum* (*P. urticae*, *P. griseofulvum*), *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. clavigerum*, *P. coprobium*, *P. claviforme*, *Faecilomyces spp.*, *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, *Byssoschlamys nivea*, *B. fulva*, *Aspergillus giganteus*, *A. terreus*, y *A. clavatus* (Aytac y Acar 1994, Dombrink-Kurtzman y Blackburn 2005, Draughon y Ayres 1980, Harwig *et al.* 1978, Laidou *et al.* 2001, Lovett *et al.* 1974, Moss y Long 2002, Northolt *et al.* 1978, Ough y Corison 1980, Rice *et al.* 1977, Roland y Beuchat 1984a).

Las cepas del género *Byssoschlamys* son de especial interés porque producen ascosporas resistentes al calor que sobreviven a la pasteurización (Brown y Smith 1957). Existen algunos hongos que poseen la capacidad de producir PAT como también de degradarla como *P. clavigerum* o especies de *Byssoschlamys* (Anderson *et al.* 1979, Dombrink-Kurtzman y Blackburn 2005).

P. expansum es el mayor productor de PAT en manzanas y peras, mientras *P. griseofulvum* comúnmente habita en cereales, suelos y piensos para

animales (Dombink–Kurtzman y Blackburn 2005, Iha y Sabino 2006, Legarda y Burdaspal 2005).

La presencia de los hongos productores de PAT no implica necesariamente la producción de la misma. La producción de PAT está estrechamente asociada con la podredumbre de la manzana y la podredumbre de moho azul, causadas comúnmente por *P. expansum* (Brian *et al.* 1956, Harwig *et al.* 1973b, Pierson *et al.* 1971, Sommer *et al.* 1974). Este hongo es el principal causante de la podredumbre de la manzana en la industria frutícola (Rosenberger 2003), y se ha indicado que es el causante de la podredumbre azul en manzanas, cerezas, ciruelas, albaricoques, melocotones, nectarinas, peras y membrillo (Buchanan *et al.* 1974, Harvey *et al.* 1972, Pierson *et al.* 1971). Además, se ha demostrado experimentalmente que las manzanas, melocotones, fresas, plátanos, ciruelas, tomates, cerezas y peras sustentan la podredumbre azul (Laidou *et al.* 2001, Lovett *et al.* 1974).

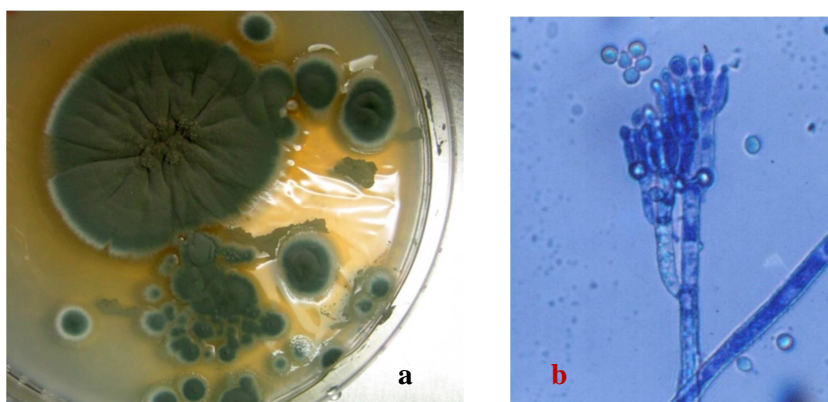


Figura 17. a) Colonias de *Penicillium expansum* en medio de cultivo PDA a 25°C durante 8 días. b) detalle del conidióforo de *P. expansum* teñido con azul algodón de lactofenol (microscopio óptico 400x).

Cepas productoras de PAT han sido aisladas de una gran variedad de frutas y vegetales incluidas manzanas, uvas, cerezas, peras, albaricoques, caquis, fresas, nectarinas, frambuesas, moras, melocotones, ciruelas, tomates, plátanos, arándanos, pasas, almendras, nueces y avellanas (Akerstrand *et al.* 1976, Andersson *et al.* 1977, Brackett y Marth 1979, Buchanan *et al.* 1974, Demirci *et al.* 2003, Frank *et al.* 1977, Gökmen y Acar 1998, Gökmen *et al.* 2005, Harvey *et al.* 1972, Harwig *et al.* 1978, Jelinek *et al.* 1989, Jiménez *et al.* 1991, Leggott y Shephard 2001, Lovett *et al.* 1974, Majerus y Kapp 2002, Pierson *et al.* 1971, Prieta *et al.* 1994, Sommer *et al.* 1974, Ritieni 2003, Wu 1992).

La producción de PAT en frutas, vegetales y sus productos derivados se ha investigado y parece ser que es dependiente de algunos factores como la actividad de agua, temperatura, pH, y otras características químicas intrínsecas a las frutas (McCallum *et al.* 2002, Northolt *et al.* 1978, Sommer *et al.* 1974). El aumento de pH influye inversamente a la

producción de PAT, siendo inestable a pH básico (McCallum *et al.* 2002). La temperatura afecta al crecimiento del hongo y la cantidad de PAT producida por éste (McCallum *et al.* 2002). Se observa que la producción de PAT aparece en todas las temperaturas de crecimiento del hongo, permitiendo abarcar en *P. expansum* un intervalo desde 0 a 30°C (Sommer *et al.* 1974). *B. nivea* crece más rápidamente a temperaturas mayores entre 30 y 37°C, mientras que la mayor producción de PAT se ha observado a 21°C (Roland y Beuchat 1984b). Como testimonio de los diferentes factores que afectan a la variación en la producción de PAT, incluso distintas variedades de manzana afectan a la cantidad de PAT producida por *P. expansum* (Corbett 2003, McCallum *et al.* 2002, Northolt *et al.* 1978).

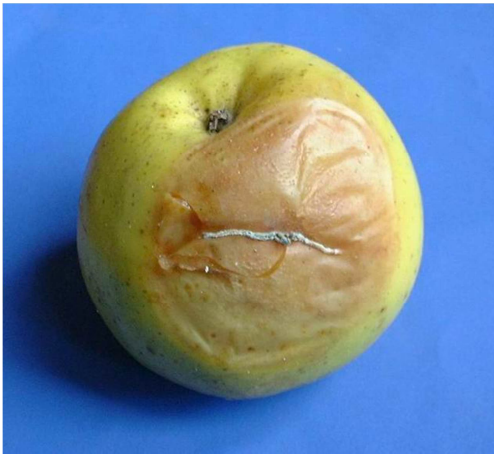


Figura 18. Aspecto de una manzana afectada de la enfermedad del moho azul, podredumbre producida por *Penicillium expansum*.

Se creía que el zumo de fruta y la sidra eran los únicos productos que contenían PAT (WHO 1995). Sin embargo, se ha demostrado que la PAT puede encontrarse naturalmente en productos de fruta y vegetales como los zumos de manzana, uva, pera, cereza ácida, uva pasa, naranja, piña, y fruta de la pasión, pasteurizados y no pasteurizados de sidra de manzana, puré de manzana, mermeladas de maíz, fresa, mora, y arándano, y en algunos tipos de alimentos infantiles (Ake *et al.* 2001, Brackett y Marth 1979, Ehlers 1986, Frank *et al.* 1977, Harwig *et al.* 1978, Jelinek *et al.* 1989, Leggott y Shephard 2001, Lin *et al.* 1993, Lovett *et al.* 1974, Prieta *et al.* 1994, Scott *et al.* 1972, Sommer *et al.* 1974, Ritieni 2003, Rychlik y Schieberle 1999, Wheeler *et al.* 1987). Además, otras evidencias sugieren que otros zumos pueden soportar el crecimiento de *B. fulva* y/o *P. expansum* y por tanto la posibilidad de producción de PAT, como el zumo de arándanos, frambuesa roja, mora, fresa, cereza negra, y melocotón (Larsen *et al.* 1998, Rice *et al.* 1977).

Además de los productos de frutas y vegetales, la PAT también se ha aislado en queso de Cheddar (Bullerman y Olivigni 1974) y productos de grano como malta de cebada y trigo, silos de pienso, rastros de cereal (Escoula 1974, 1977, López-Díaz y Flannigan 1997, Pittet 1998), pan y productos relacionados como la harina o la masa de harina (Reiss 1972, 1976).

En la industria de la alimentación, las manzanas y sus productos derivados son los que presentan mayor preocupación por la contaminación con PAT (Moake *et al.* 2005, Shephard y Leggott 2000). Mientras que otros alimentos y productos han demostrado contener PAT y/o contaminación de producción por la PAT, la frecuencia de estos eventos es mucho menor que en la industria de manzana. PAT ha sido identificada en manzanas de Canadá (Harwig *et al.* 1973b, Sommer *et al.* 1974), Reino Unido (Brian *et al.* 1956, Sommer *et al.* 1974), Nueva Zelanda (Walker 1969), Estados Unidos (Sommer *et al.* 1974, Ware *et al.* 1974), Australia (Sommer *et al.* 1974), y Suráfrica (Leggott y Shephard 2001), y también ha sido encontrado en zumos de manzana de Canadá (Scott *et al.* 1972), Estados Unidos (Ware *et al.* 1974), Suecia (Josefsson y Andersson 1976), Suráfrica (Leggott y Shephard 2001), Turquía (Gökmen y Acar 1998), Brasil (de Sylos y Rodríguez-Amaya 1999), Austria (Steiner *et al.* 1999), Italia (Ritieni 2003), Bélgica (Tangi *et al.* 2003), Francia y Australia (Sommer *et al.* 1974) y España (Legarga y Burdaspal 2005). Por ello, es necesario evitar la presencia de la micotoxina en los productos alimenticios destinados al consumo humano y, en particular, a los niños de corta edad (Piamontese *et al.* 2005). Además se ha establecido una ingesta diaria máxima tolerable provisional (PMTDI) de 400 ng de PAT/Kg peso corporal/día por la JECFA y recientemente refrendada por el Comité Científico de Alimentación Humana de la Unión Europea (SCF) (SCF 2000a, Wouters y Speijers 1996).

8.4 Metodología para la determinación de patulina

La determinación de la patulina requiere de métodos apropiados para su análisis. Muchos métodos se han desarrollado para evaluar patulina en zumo de manzana. A pesar de ello, se continúan optimizando los métodos para que sean más sencillos, económicos, con límites de detección inferiores y de mayor reproducibilidad.

No existen ensayos con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) para determinar PAT. Por tanto, los métodos convencionales para el pretratamiento de muestras como extracción líquido-líquido y una posterior separación por cromatografía son los métodos más ampliamente utilizados.

8.4.1 Extracción y purificación

En los últimos años, varios métodos de extracción y purificación de muestra han sido establecidos en zumos de fruta conteniendo pera o manzana. La extracción se suele realizar con disolventes algo polares como el acetato de etilo o acetona. El paso siguiente corresponde a la purificación, ésta puede ser llevada a cabo mediante el uso de una disolución de carbonato de sodio como agente de lavado (Boonzaaijer *et al.* 2005, Brause *et al.* 1996, European Commission 2006, Shephard y Leggott 2000). La extracción líquido-líquido se considera costosa y lenta debido al uso de una gran cantidad de disolventes orgánicos que además presentan problemas de residuos para el medio ambiente, (Gökmen *et al.* 2005) y los

procedimientos de purificación utilizando carbonato de sodio pueden desactivar la PAT debido a que es inestable en medio alcalino, sin embargo se utiliza en la extracción de PAT un medio básico para eliminar los compuestos ácidos que interfieren (Baert *et al.* 2006), siendo más estable en un medio ligeramente ácido.

En estos últimos años, nuevos métodos de extracción y purificación se han validado y publicado utilizando la extracción en fase sólida (SPE) utilizando como relleno silica gel, Florisil® o celite (Brause *et al.* 1996, Boonzaaijer *et al.* 2005, Eisele y Gibson 2003, Li *et al.* 2007, Trucksess y Tang 1999, 2001). Estos métodos tienen, por lo general, mejor repetitividad, mayor rendimiento, recuperaciones más elevadas, y un incremento de la sensibilidad, permitiendo la determinación de niveles inferiores de toxina (Katerere *et al.* 2007). La columna Mycosep® rellena de adsorbentes pueden ser utilizadas para una purificación rápida y sencilla. La columna Mycosep® es insertada en el tubo donde se encuentra la muestra extraída y una goma sella los dos tubos. El extracto es forzado a pasar a través de la columna Mycosep®. Después de unos segundos, el extracto purificado aparece por la parte superior de la columna (Malone *et al.* 1998).

8.4.2 Separación y detección

La cromatografía de capa fina (TLC) fue una de las primeras técnicas que se introdujeron para la determinación de la PAT, siendo muy popular debido a su bajo coste, sencillez y efectividad. Vero *et al.* (1999) utilizaron como fase móvil tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico, detectándose la PAT a una longitud de onda de 412 nm utilizando como agente de detección MBTH (3-metil-2-benzotiazolizona).

A lo largo del tiempo, se incrementó el uso de la cromatografía líquida (LC), mientras que TLC fue decreciendo. Las columnas que se utilizan en la detección de PAT suelen ser de fase reversa. Por lo general el detector utilizado es el espectrofotómetro de UV (ISO Method, 8128-1, 1993) aunque se empieza a utilizar LC acoplado a un espectrómetro de masas (MS) (Ito *et al.* 2004, Rupp y Turnipseed 2000, Sulyok *et al.* 2006).

La cromatografía de gases (GC) es, entre estas técnicas, la que menos se utiliza para la determinación de PAT debido a la fiabilidad por LC. Además para la determinación de PAT por GC es necesaria la derivatización de la misma con algún silalizante como el trimetilsilil éter o mediante un proceso de acilación como por ejemplo, el anhídrido heptafluorobutírico. De este modo, se ha utilizado GC-MS que suele proporcionar límites de detección inferiores a los obtenidos por LC-UV (Marks 2007).

8.4.3 Metodologías analíticas

Actualmente, los métodos más habituales para la detección y cuantificación de PAT utilizan, como se ha indicado, un paso previo de purificación o *clean-up* que suele consistir en una extracción líquido-líquido con acetato de etilo o una extracción en fase sólida y una posterior separación por

cromatografía con el detector más apropiado, generalmente cromatografía líquida con espectrofotometría de UV.

Uno de los métodos oficiales para la determinación de patulina en zumo de manzana es el propuesto por a MacDonald *et al.* (2000). En este método se provoca una precipitación previa para evitar las pectinas, para ello se añade, al zumo, el enzima pectinasa. Después de centrifugar se recoge el sobrenadante y se extrae con acetato de etilo. Posteriormente, la fase orgánica se hace pasar a través de sulfato de sodio anhidro para eliminar el posible resto de agua que pueda haber quedado retenido en el extracto orgánico. Seguidamente se seca con una corriente de nitrógeno a 40°C. El extracto se redisuelve con agua acidificada a pH 4. Por último se inyecta en el cromatógrafo de líquidos con columna de fase reversa C₁₈ y detectado con espectrofotómetro de UV a $\lambda=276$ nm.

Se han propuesto diferentes modificaciones de este método, como el sugerido por Ritieni (2003) que en vez de introducir pectinasa introduce sulfato de amonio, siguiendo posteriormente el procedimiento oficial. Otros autores como Sugita-Konsihi *et al.* (2005), eliminan la parte de precipitación y optimizan la extracción líquido-líquido. Últimamente Iha y Sabino (2006) han optimizado el procedimiento de extracción de tal manera que la cantidad utilizada de fase orgánica ha disminuido en un 94% con respecto al método de MacDonald, siendo la fase orgánica una mezcla de acetato de etilo-hexano (96:4 v/v). Además se trabaja con mucha precaución para que la patulina esté siempre en medio ácido, ya que a pH básicos se destruye.

Otros autores han añadido a la extracción líquido-líquido con acetato de etilo un segundo paso que se realiza con cartuchos de extracción en fase sólida como Spadaro *et al.* (2007). En este procedimiento, una vez realizada la extracción líquido-líquido se seca el extracto y se redisuelve con tolueno para realizar un segundo paso en donde se hace pasar por un cartucho de C₁₈, eluyéndose con una disolución de tolueno-acetato de etilo. Otra posibilidad es utilizar como cartucho de extracción en fase sólida una columna de sílica (Rychlik y Schieberle 1999), en el cual se redisuelve con acetato de etilo, la muestra seca, y posteriormente se le hace pasar por la columna. Después del lavado del cartucho, se eluye la PAT con cloroformo-hexano. Además, en este procedimiento la separación y detección se lleva a cabo por GC-MS. Para ello, se seca la muestra y se derivatiza con N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). Se inyecta en el cromatógrafo que utiliza una columna DB-5. Por otro lado, otros autores no han realizado ninguna extracción en fase sólida, ni la derivatización y lo han analizado directamente por GC-MS (Llovera *et al.* 2005).

Sin embargo, otros autores han optado por utilizar sólo la extracción en fase sólida, como Ito *et al.* (2004) que utilizan cartuchos Aquis PLS-3 (estireno-divinilbenceno con N-metacrilato) u Oasis HLB (N-vinilpirrolidona con polímero de divinilbenceno). Se eluye con metanol y se seca y redisuelve con metanol y está listo para inyectar en el LC-UV. Eisele y Gibson (2003) utilizan cartuchos Oasis HLB pero en este caso, eluyen la

muestra con acetato de etilo 10% en etil éter. Seguidamente se deja secar con nitrógeno y se diluye para introducirlo en el cromatógrafo de líquidos.

Otros investigadores utilizan cartuchos de extracción en fase sólida C₁₈ como Boonzaaijer *et al.* (2005). Para ello, después de la precipitación con el enzima pectinasa pasan la muestra por el cartucho de C₁₈, eluyéndose la toxina con acetonitrilo. Posteriormente, se purifica con un cartucho Romer 224 ó 226 recogiendo el extracto purificado. Sin embargo Li *et al.* (2007) pasaron el zumo por un cartucho C₁₈ sin hacer la precipitación previa y la elución se realizó con una mezcla de hexano–acetato de etilo–acetona.

Últimamente están apareciendo métodos para determinar la patulina por LC–MS como Takino *et al.* (2003) en el cual se realiza una extracción *on line*, introduciendo directamente la muestra por el cromatógrafo de líquidos con el detector de espectrometría de masas. En este caso compara la fotoionización a presión atmosférica (APPI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI), observando mejores resultados en la APCI.

En general, LC y GC son técnicas utilizadas para la determinación rutinaria de PAT. Los demás métodos de análisis como los inmunológicos (ELISA) están aún en desarrollo (McElroy y Weiss 1993, Sewram *et al.* 2000). Esto es debido a que no ha sido posible desarrollar anticuerpos específicos capaces de reconocer la patulina sola (Sheu *et al.* 1999). La preparación de un inmunogen es difícil porque se ha comprobado que la patulina es inestable a pH alcalino, llevándose a cabo la hidrólisis del anillo de lactona. Otro factor adicional que dificulta la producción de anticuerpos capaces de reconocer PAT es la múltiple reactividad electrofílica de la PAT pudiendo reaccionar con grupos sulfhidrilos como también con grupos amino primarios en péptidos y proteínas (Fliege y Metzler 1999).

Tsao y Zhou (2000) han utilizado cromatografía capilar micelar electrocinética (MECC) para la determinación de PAT en sidra. En este método se consume poca cantidad de reactivos y se detecta mediante espectrofotometría de UV a una longitud de onda de 273 nm.

Otros métodos de análisis semicuantitativo incluyen la polarografía (Wasicki *et al.* 1986). Y el segundo consiste en una columna de vidrio empaquetada con silica gel y sulfato de calcio que es utilizada para la separación, llevándose a cabo la detección con espectrofotometría de UV, siendo el método económico y sencillo (Brause *et al.* 1996).

9. Otras micotoxinas

Además de las micotoxinas descritas anteriormente, existen otras toxinas importantes debido a su incidencia sobre plantas y vegetales de consumo humano y animal, así como su capacidad para tener efectos considerables sobre la salud de las personas y la productividad de los animales.

9.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas constituyen una familia de micotoxinas que son producidas principalmente por las especies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nominus* (Hesseltine *et al.* 1970, Scott 1987).

Los hongos productores de aflatoxinas están muy extendidos por todo el mundo, en especial en climas templados, subtropicales y tropicales, y pueden producir aflatoxinas, tanto antes como después de la cosecha, en numerosos alimentos y piensos, especialmente semillas oleaginosas, nueces comestibles y cereales (Coker 1997). *Aspergillus flavus* puede proliferar en alimentos con una actividad de agua superior a 0.85. A una temperatura por debajo de 12°C prácticamente no se producen aflatoxinas, estando la temperatura de producción máxima entorno a los 27°C.

El término "aflatoxinas" fue acuñado a comienzos del decenio de 1960, cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos murieron a causa de una enfermedad, conocida como "enfermedad X de los pavos", que se atribuyó a la presencia de toxinas de *A. flavus* en harina de cacahuate importada de Sudamérica (Austwick 1978).

Existen cuatro aflatoxinas principales, conocidas como aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁), y aflatoxina G₂ (AFG₂). La letra B indica que estas aflatoxinas tienen fluorescencia azul (del inglés *Blue*) frente a la luz ultravioleta (365 nm), mientras que la letra G indica la fluorescencia verde amarillenta (del inglés *Green*).

Las aflatoxinas pueden producir intoxicación aguda que se manifiesta por vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa, necrosis del hígado. El estado nutricional es importante en la manifestación de esta toxicidad; una dieta baja en lípidos hace más vulnerable el hígado a las aflatoxinas lo mismo que las dietas deficientes en proteínas; al contrario, el hígado con gran cantidad de ácidos grasos insaturados no es afectado por estas toxinas.

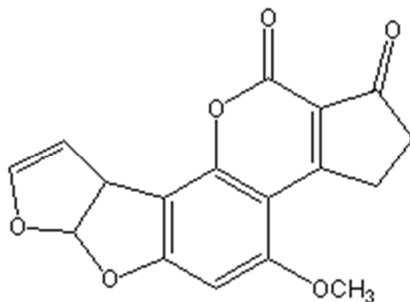


Figura 19. Estructura química de la aflatoxina B₁.

También están bien documentados los efectos crónicos a concentraciones bajas (ppb) en la alimentación del ganado (Coker 1997), como son la disminución de la productividad y el aumento de la susceptibilidad a las enfermedades.

La aflatoxina B₁ es un compuesto cancerígeno para el hombre (IARC 1993) y es uno de los agentes causantes de cáncer de hígado más potentes que se conocen. Se ha descrito el fallecimiento de personas a causa de intoxicación aguda con aflatoxinas en la India en 1974, coincidiendo con lluvias intempestivas y escasez de alimentos que impulsaron al consumo de maíz muy contaminado (Krishnamachari *et al.* 1975). Si la acción inmunodepresora de las aflatoxinas en el ganado se manifiesta de forma similar en las personas, es posible que las aflatoxinas (y otras micotoxinas) desempeñen un papel importante en la etiología de las enfermedades que sufre la población en algunos países en desarrollo en los que se ha descrito una alta exposición a estas toxinas. El grado de toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas sigue el orden: B₁ > G₁ > B₂ > G₂.

Por lo general, las aflatoxinas resisten los tratamientos habituales de los alimentos. Solamente el tostado de los frutos secos las destruye en una pequeña parte. Para eliminarlas son necesarios tratamientos muy drásticos, con amoníaco o hipoclorito, no utilizables para uso alimenticio en humanos o animales.

Las aflatoxinas corresponden químicamente a la familia de las difuranocumarinas y pueden clasificarse en dos grupos acorde a su estructura química, las difurocumarociclopentenonas (AFB₁, AFB₂) y las difurocumarolactonas (AFG₁, AFG₂). Estos grupos se diferencian debido a que el anillo de furano de las aflatoxinas B se convierte en un anillo de lactona en las aflatoxinas G. La AFB₁ es 2,3,6 α ,9 α -tetrahidro-4-metoxiciclopenta [c]furo[2',3':4,5] furo [2,3-h] benzopiran-1,11-diona (C₁₇H₁₂O₆, PM: 312.3 g/mol), y la AFB₂ es 8,9-dihidro derivado de la B₁ (C₁₇H₁₄O₆, PM: 314.3 g/mol). Mientras la AFG₁ es 3,4,7 α ,10 α -tetrahidro-5-metoxi-(7 α R,10 α S)-1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]piranol[3,4-c][1]-benzopiran 1,12 -diona (C₁₇H₁₂O₇, PM: 328.3 g/mol), y la AFG₂ es un derivado de la aflatoxina G₁ con la carencia del doble enlace entre el carbono C₉-C₁₀ (C₁₇H₁₄O₇, PM: 330.3 g/mol).

La determinación de estas toxinas no es fácil debido a que se encuentran en matrices complejas y tienen que ser detectadas a muy bajas concentraciones. La mayoría de los métodos actualmente utilizados para la determinación de aflatoxinas emplean una mezcla de extracción con metanol-agua. Seguidamente, se procede a la purificación mediante una extracción en fase sólida o más comúnmente por columnas de inmunoafinidad a pesar de su elevado costo (Akiyama *et al.* 1996, 2001, Kussak *et al.* 1993, 1995), aunque también se está extendiendo la purificación mediante una fase sólida polimérica (Ventura *et al.* 2004). La determinación cromatográfica generalmente se lleva a cabo mediante un detector de fluorescencia. Para mejorar los límites de detección de AFG₁ y AFB₁ se suelen formar derivados hemiacetales con ácido trifluoroacético mediante una derivatización precolumna o también derivatización post-columna con bromo o yodo (Kok *et al.* 1986, Shepherd y Gilbert *et al.* 1984, Stroka *et al.* 2000, Tarter *et al.* 1984). Últimamente, también se están detectando las aflatoxinas por LC-espectrometría de masas para

evitar los inconvenientes que produce la derivatización (Ventura *et al.* 2004).

9.2 Zearalenona

La zearalenona (ZEA) es una importante micotoxina que aparece en las regiones templadas y cálidas del mundo. Es producida por hongos del género *Fusarium*. La taxonomía de los *Fusarium* es compleja, así como su clasificación una tarea difícil. Debido a esta complejidad, muchos aislados han sido identificados erróneamente. Actualmente, se considera que la ZEA es producida por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, y *F. semitectum* (Jiménez *et al.* 1996) siendo cuestionadas otras especies indicadas como productoras con anterioridad.

La toxina aparece principalmente en maíz y en pequeños granos como la cebada, trigo, sorgo, arroz y mijo, pero también se ha encontrado en soja (Gareis *et al.* 2003). En maíz, la toxina es muy común, estando presente principalmente en bajas concentraciones, en Norteamérica, Japón y Europa. Sin embargo, puede encontrarse en concentraciones altas en países en desarrollo donde se cultiva maíz en climas más templados (Llorens *et al.* 2004a). También se han encontrado altos niveles de micotoxina (11–15 mg/Kg) en muestras de cebada en Japón (Yoshizawa 1997).

Además, la toxina ha sido detectada en productos derivados de los cereales (FAO 1979, IARC 1993, Kuiper–Goodman 1987). Por ejemplo en muestras de cerveza procedentes de África se han encontrado elevadas cantidades de toxina; sin embargo, en muestras de cerveza procedentes de Europa y Canadá generalmente no se ha detectado la toxina y sólo en muy pocas ocasiones han aparecido muestras conteniendo bajos niveles de ZEA (FAO 1979, Scott 1996a).

F. graminearum produce ZEA junto con DON y se ha señalado la posible relación simultánea de ambas sustancias con brotes de micotoxicosis agudas en personas.

La exposición a ZEA a través del consumo de maíz contaminado con la toxina ha ocasionado hiperestrogenismo en animales, especialmente cerdos, caracterizado por vulvovaginitis, mastitis e infertilidad (Udagawa 1988). En estudios con animales de experimentación se han obtenido pocas pruebas de la carcinogenicidad de la ZEA.

Los hongos del género *Fusarium* infectan cereales en el campo. La producción de toxina principalmente tiene lugar antes de la cosecha, pero también puede ocurrir después de la recolección si la cosecha no es manipulada y secada adecuadamente.

La ZEA es una lactona derivada del ácido β -resorcílico, químicamente descrita como ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- β -resorcílico lactona (C₁₈H₂₂O₅, PM: 318.36 g/mol). En los mamíferos, el grupo cetónico del carbono C-6 es reducido, dando lugar a dos metabolitos estereoisoméricos de la ZEA (isómeros α y β). Estos metabolitos son también producidos por los hongos, pero a una concentración mucho más baja que

la ZEA. Otro compuesto con una estructura similar es el zearalanol que es utilizado como un estimulante del crecimiento. Este compuesto se distingue de la ZEA sólo por la carencia de un enlace doble entre los carbonos C1-C2 y un grupo hidroxilo en C6 en vez del grupo cetónico de la ZEA.

La ZEA es un compuesto bastante estable tanto durante el proceso de la molienda y almacenamiento como durante la cocción y el procesado del alimento, debido a que no se degrada a altas temperaturas (Gajecki 2002).

Varios métodos analíticos se han desarrollado para la identificación y cuantificación de ZEA en diversas muestras. Los métodos iniciales generalmente se basaron en la cromatografía de capa fina (TLC). En la actualidad, se utiliza principalmente LC con detección de fluorescencia, aunque también se han propuesto técnicas por espectrofotometría de UV y electroquímica (Kuiper-Goodman *et al.* 1987, Nordic Council of Ministers 1998). Otras métodos emplean GC o LC combinadas con espectrometría de masas (Tanaka *et al.* 2000). También son posibles métodos ELISA para la determinación de ZEA (Lee *et al.* 2001).

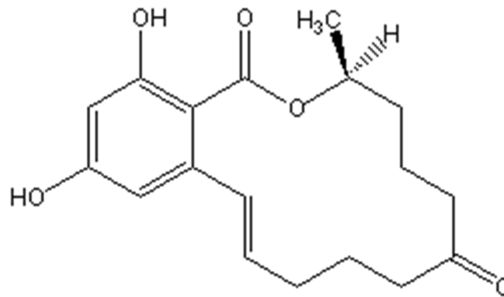


Figura 20. Estructura química de la zearalenona.

9.3 Fumonisinias

Las Fumonisinias (FBs) son metabolitos secundarios caracterizadas en 1988, se sintetizan principalmente por *Fusarium verticilloides* (anteriormente considerado como *F. moniliforme*) y *F. proliferatum*, hongos que comúnmente contaminan maíz y otros cereales cultivados en clima tropical y subtropical, aunque también afectan ocasionalmente al arroz y al sorgo (Creppy, 2002, IARC 1993). También ha sido indicado que *F. napiforme*, *F. dlaminiy*, *F. nygamai*, *F. anthophilum* y *F. globosum* son capaces de producir FBs (EHC 2000, Hinojo *et al.* 2006, NTP 1999).

Aunque se han encontrado por lo menos 12 análogos de fumonisinias, las más importantes son las de la serie B (fumonisina B₁, fumonisina B₂ y fumonisina B₃). Se considera a la fumonisina B₁ (FB1) (Figura 21) como la más tóxica de este grupo, además de ser la fumonisina de mayor incidencia en cultivos, piensos y productos alimenticios (Placinta *et al.* 1999). La FB1 se ha encontrado como contaminante natural en maíz y en sus productos elaborados en muchas partes del mundo, como EEUU, Canadá, Suráfrica, Italia, Polonia, Brasil, Uruguay, Austria, Francia y España (EHC 2000, Eriksen y Alexander 1998). La producción de FB1 depende de las

condiciones medioambientales y de almacenamiento (condiciones climáticas, períodos largos de almacenamiento, transporte, etc.).

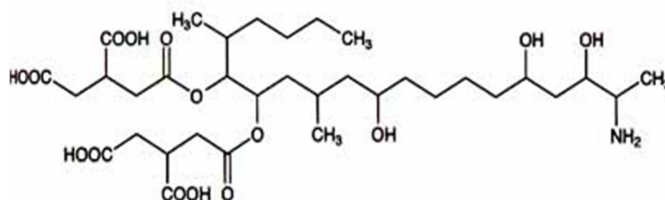


Figura 21. Estructura química de la fumonisina B₁.

Se ha demostrado que la FB1 causa inmunosupresión, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad. La FB1 ha sido implicada en la leucoencefalomalacia equina y con el edema pulmonar del cerdo (Wood 1992, Zomborszky-Kovács *et al.* 2002), origina hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en roedores y cáncer esofágico en el hombre (cáncer esofágico endémico observado en Asia y África), por lo que es claro que la FB1 presenta un amplio riesgo para la sanidad animal y salud pública. En la población de la provincia de Transkei (Sudáfrica) se ha demostrado una correlación estadística muy alta entre el consumo de maíz contaminado y la incidencia de cáncer esofágico durante el decenio 1976–1986 (Rheeder *et al.* 1992).

Anteriormente, una evaluación del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) había llegado a la conclusión de que en estudios con animales de experimentación se habían obtenido pruebas suficientes para demostrar el efecto carcinogénico de cultivos de *F. verticillioides* con un alto contenido de fumonisinas; sin embargo, los experimentos con animales proporcionaron pocas evidencias de la carcinogenicidad de la FB1 purificada (IARC 1993).

Además, la FB1 también se ha relacionado con un brote en la India de gastroenteritis por consumo de maíz y sorgo enmohecido conteniendo hasta 64 mg FB1/Kg, con síntomas agudos, dolor abdominal y diarrea.

La estructura química de la FB1 corresponde a un diéster del 2-amino, 12,16 dimetil, pentahidroxi-icosano, donde los grupos hidroxilo de los carbonos en posición 14 y 15 están esterificados con el ácido propanotricarboxílico, C₃₄H₅₉NO₁₅. PM: 721.838 g/mol.

La FB1 es estable en la mayor parte de tratamientos industriales de la muestra, así por ejemplo la molienda en seco de maíz homogeniza la toxina en el salvado, germen y harina, pero no la destruye. Sin embargo, la concentración de FB1 es reducida durante la fabricación de harina de maíz por molienda en húmedo debido a su solubilidad en agua. Además, como los niveles de detección son generalmente bajos se hace difícil extraer la FB1 en los alimentos procesados (Bullerman y Tsai 1994, Murphy *et al.* 1995, Norred *et al.* 1998, Kuiper-Goodman *et al.* 1996). La nixtamalización (proceso de cocción del maíz con agua e hidróxido de

calcio), así como otros procesos similares reducen el contenido de fumonisina mientras incrementa la concentración de fumonisinas hidrolizadas sin eliminar el producto tóxico (Flynn *et al.* 1997, Norred *et al.* 1998, Kuiper–Goodman *et al.* 1996, Voss *et al.* 1996).

La extracción de fumonisinas del producto molido, se lleva a cabo con disolventes orgánicos mediante los diferentes tipos de agitación mecánica. La extracción más común se realiza con una mezcla de acetonitrilo–metanol–agua (Gareis *et al.* 2003).

El paso de purificación está basado en el uso de una extracción en fase sólida (SPE) (de Girolamo *et al.* 2001) o por la utilización de columnas de inmunoafinidad (IAC) (Ross *et al.* 1991), o en otras ocasiones mediante columnas de intercambio iónico (SAX) (Shephard *et al.* 1990).

La purificación por IAC, en algunos casos como la cerveza, la muestra se carga directamente en la columna sin la necesidad de una extracción previa, eluyéndose posteriormente con metanol para, a continuación, identificar y cuantificar la micotoxina.

Las técnicas para la determinación de FBs por LC, utilizan principalmente la detección por fluorescencia con una longitud de onda de excitación y de emisión de 335 nm y 440 nm, respectivamente. Para ello es necesario una derivatización previa, generalmente, con una disolución de o-ftaldehído (OPA) (Sydenham *et al.* 1990). Las fases móviles más utilizadas, contienen una mezcla de metanol–fosfato monosódico 0.1 M, a pH 3.35 ajustado con ácido o–fosfórico.

9.4 *Alternarios*

Los alternarioses son micotoxinas producidas por hongos pertenecientes al género *Alternaria* que son muy comunes en la naturaleza y típicamente contaminan alimentos y piensos (Hyde y Gallego 1951). Debido a su capacidad para crecer a bajas temperaturas, normalmente, las especies de *Alternaria* están relacionadas con alteraciones en condiciones de refrigeración (Harwig *et al.* 1979, Stison *et al.* 1981). Cuando crecen en cultivos, algunas de las cepas de *Alternaria* spp. son capaces de producir metabolitos secundarios que han demostrado ser tóxicos (IARC 1991). Dos de los metabolitos normalmente estudiados han sido el alternariol (AOH) y el alternariol monometil éter (AME). Las especies típicamente productoras de estos son *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, y *A. gaisen*, *A. dauci*, *A. cucumerina* y *A. solani* (Andersen *et al.* 2001, 2002, Montemurro y Visconti 1992).

El AOH y el AME presentan efectos teratogénicos y fetotóxicos en ratones, incluyendo efectos sinérgicos cuando se administran de forma combinada. También fueron mutagénicos en varios sistemas microbiológicos y celulares en extractos de cultivo (Dong *et al.* 1987). Además, AME es citotóxica (Montemurro y Visconti 1992).

Las toxinas de AME y AOH han sido encontradas en sorgo (Ansari y Shrivastava 1990), semillas de girasol (Chulze 1995), cebada, trigo, avena

(Gruber-Schley y Thalmann 1988), aceitunas, tomates, navelinas, pimientos, melones (Logrieco *et al.* 1988) y nueces (Schroeder y Cole 1977). Cepas de *Alternaria* inoculadas en manzanas, tomates, arándanos, naranjas y limones producen las toxinas (Stinson *et al.* 1981, Sydenham y Shephard 1996, Wernimont 1985) demostrando el potencial de contaminación de *Alternaria* siendo el tomate el más frecuentemente invadido (Hasan 1995).

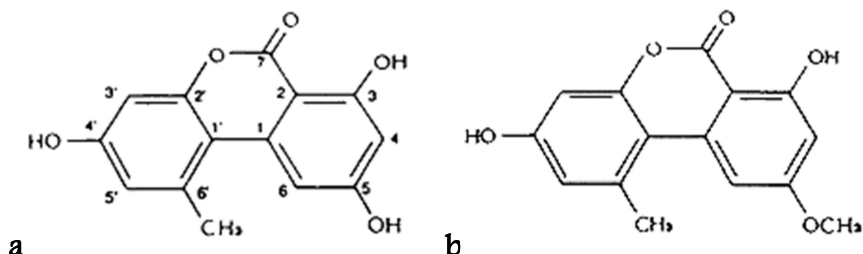


Figura 22. Estructura química de a) alternariol y b) alternariol monometil éter.

La AOH está descrita como 3,7,9-trihidroxi-1-metil-6*H*-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona) (C₁₄H₁₀O₅, PM: 258.23 g/mol) y AME como 3,7-dihidroxi-9-metoxi-1-metil-6*H*-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona) (C₁₅H₁₂O₅, PM: 272.25 g/mol).

Los métodos analíticos para la identificación y cuantificación de AME y AOH están basados en una extracción previa en la que se suele utilizar cloroformo (Stinson *et al.* 1980), o una mezcla acidificada de cloroformo-etanol (Ozcelik *et al.* 1990) o metanol-hexano (Logrieco *et al.* 1988) posteriormente se suele utilizar una purificación mediante una extracción en fase sólida (Ozcelik *et al.* 1990) o una extracción líquido-líquido (da Motta y Valente Suares 2000). Las toxinas al final se suelen identificar y cuantificar empleando cromatografía de capa fina (Gruber-Schley y Thalmann 1988, Wernimont 1985), cromatografía gaseosa (Scott *et al.* 1997) o cromatografía líquida con detección por absorción ultravioleta, o fluorescencia y también electroquímicamente (Gruber-Schley y Thalmann 1988, Stinson *et al.* 1980, Trucksess 1985, Wernimont 1985). Recientemente se ha empezado a utilizar técnicas de LC-espectrometría de masas para la determinación de AOH y AME (Lau *et al.* 2003).

10. Legislación

Tras el descubrimiento de las aflatoxinas a principios de la década de los 60, se desarrolló, en varios países, una legislación específica para micotoxinas, inicialmente solo referida a aflatoxinas para proteger a los consumidores de los efectos nocivos.

Para poder fijar los valores límite de las micotoxinas en los nuevos reglamentos era necesario tener en cuenta distintos elementos. Estos incluyen: factores científicos para evaluar el riesgo, como la disponibilidad de datos toxicológicos, datos de consumo de alimentos, información sobre

el nivel y la distribución de las micotoxinas en los productos básicos y metodologías analíticas. Factores económicos como los intereses comerciales y aspectos vinculados con la inocuidad de los alimentos.

En 1987 se incrementó el número de países que poseían regulación propia sobre todo para aflatoxinas. Algunos de ellos como Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Checoslovaquia, Francia, Finlandia, Dinamarca, Noruega, Suecia, Suiza, Rumania, Rusia y EEUU ya poseían, aunque de forma laxa, una regulación para micotoxinas como PAT, OTA, DON, ZEA, fumonisinas y T-2 (van Egmond 1989).

En España, se adoptaron en el año 2002 los límites máximos permitidos (MAL) de OTA establecidos por las autoridades de la Unión Europea en los Reglamentos (CE) n° 257/2002 y n° 472/2002 de la Comisión Europea para los cereales, alimentos a base de cereales y frutos secos de la vid. En 2003, en la Unión Europea se adoptaron los MAL de PAT para zumos de fruta y compotas y purés de manzana (Reglamento (CE) n° 1425/2003) y en el 2004 después de confirmar que se podía establecer un método analítico con un límite de cuantificación inferior a 10 µg/Kg se establecieron nuevos límites de PAT para los alimentos infantiles (Reglamento (CE) n° 455/2004). Ya en 2005, se adoptaron los MAL para el DON y otras micotoxinas en cereales y en algunos de sus derivados (Reglamento (CE) n° 856/2005).

Por otro lado se hizo necesaria la regulación del muestreo y de los métodos analíticos por parte de la Unión Europea para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, en la actualidad se rige por un nuevo reglamento publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea en el 2006 (Reglamento (CE) n° 401/2006). En el mismo reglamento aparecen los requisitos de control del laboratorio de los métodos analíticos (Tabla 5).

Tabla 5. Requisitos de control de laboratorio: criterios de funcionamiento de los métodos analíticos para las micotoxinas OTA, DON y PAT.

Micotoxina	Contenido µg/Kg	RSD _r	RSD _R	% Recuperación
Ocratoxina A	<1	≤40	≤60	50 a 120
	1 – 10	≤20	≤30	70 a 110
Patulina	<20	≤30	≤40	50 a 120
	20 – 50	≤20	≤30	70 a 105
	>50	≤15	≤25	75 a 105
Deoxinivalenol	>100≤500	≤20	≤40	60 a 110
	>500	≤20	≤40	70 a 120

RSD_r = Desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetitividad.

RSD_R = Desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad.

Con el paso del tiempo y especialmente en los últimos años se ha unificado más la reglamentación sobre las micotoxinas, no sólo el tipo de micotoxina objeto de regulación, sino también los niveles de la misma, esto es más evidente en los países que integran la Unión Europea donde todos los estados miembros deben acatar la misma normativa.

En la actualidad, la legislación para todas las micotoxinas reguladas se encuentra en el Diario Oficial de la Unión Europea, en concreto, en el Reglamento n° 1881/2006 de la Comisión Europea, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (Commission Regulation No. 1881/2006), Reglamento (CE) n° 1126/2007 de la Comisión de 28 de septiembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el maíz y los productos del maíz y todo ello con el fin de proteger la salud pública (Commission Regulation No 1126/2007), Reglamento (UE) n° 105/2010 de la comisión de 5 de febrero de 2010 que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006, por lo que se refiere a la ocratoxina A (Commission Regulation No 105/2010) y Reglamento (EU) n° 165/2010 de la comisión de 26 de febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) n° 1881/2006 (Commission Regulation No 165/2010).

En este documento se pueden encontrar los valores máximos admisibles en cuanto al contenido de OTA, PAT y DON en diversos alimentos. Estos valores se muestran en la Tabla 6. Las otras micotoxinas reguladas por este mismo reglamento en determinados sustratos son las aflatoxinas, zearalenona, fumonisinas, Toxina T-2, Toxina HT-2.

Recientemente, el 17 de agosto de 2006, la Comisión Europea ha publicado una recomendación acerca de los valores máximos de algunas micotoxinas para productos destinados a alimentación animal (Recomendación de la Comisión n° 576/2006). Entre las diferentes toxinas reguladas se encuentra la OTA y el DON para los que se han fijado los siguientes valores orientativos en mg/Kg para piensos con un contenido de humedad del 12%.

Para la OTA

- Materias primas para piensos:
Cereales y productos a base de cereales: 0.25 mg/Kg.
- Piensos complementarios y completos:
Para cerdos: 0.05 mg/Kg.
Para aves de corral: 0.1 mg/Kg.

Para el DON

- Materias primas para piensos:
Cereales y productos a base de cereales, con excepción de los subproductos de maíz: 8 mg/Kg.
Subproductos de maíz: 12 mg/Kg.

- Piensos complementarios y completos: 5 mg/Kg.
 Con excepción de: Piensos complementarios y completos para cerdos: 0.9 mg/Kg.
 Piensos complementarios y completos para terneros (menores de cuatro meses), corderos y cabritos: 2 mg/Kg.

Tabla 6. Niveles de máximos permitidos de ocratoxina A, patulina y deoxinivalenol en los países miembros de la Unión Europea.

Nº	Ocratoxina A	Contenidos máximos (µg/Kg)
1.1	Cereales no elaborados	5.0
1.2	Todos los productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 1.9 y 1.10	3.0
1.3	Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10.0
1.4	Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5.0
1.5	Café soluble (café instantáneo)	10.0
1.6	Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15 % vol.) y vino de frutas	2.0
1.7	Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2.0
1.8	Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo	2.0
1.9	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0.5
1.10	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0.5
1.11	Espicias: <i>Capsicum</i> spp. (frutos de dicho género secos, enteros o pulverizados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón); <i>Piper</i> spp. (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra); <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada); <i>Zingiber officinale</i> (jengibre); <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma) y mezclas de especias que contengan una o más de las especias antes mencionadas	30
1.12	Regaliz (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> y otras especies):	
	1) Raíz de regaliz, ingrediente para infusiones	20
	2) Extracto de regaliz para uso alimentario, especialmente en bebidas y confitería	80

Continuación Tabla 6.

Nº	Patulina	Contenidos máximos (µg/Kg)
2.1	Zumo de frutas, zumos de frutas concentrados reconstituídos y néctares de frutas	50
2.2	Bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas elaboradas con manzanas o que contengan zumo de manzana	50
2.3	Productos sólidos elaborados con manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados al consumo directo a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.4 y 2.5	25
2.4	Zumo de manzana y productos sólidos elaborados a base de manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados a los lactantes y niños de corta edad y vendidos y etiquetados como tales	10.0
2.5	Alimentos infantiles distintos de los alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad	10.0
Nº	Deoxinivalenol	Contenidos máximos (µg/Kg)
3.1	Cereales no elaborados que no sean trigo duro, avena y maíz	1250
3.2	Trigo duro y avena no elaborados	1750
3.3	Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda	1750
3.4	Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales, salvado y germen como producto final comercializado para el consumo humano directo, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 3.7, 3.8 y 3.9	750
3.5	Pasta (seca)	750
3.6	Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno	500
3.7	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
3.8	Fraciones de la molienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, clasificadas en los códigos NC 1103 13 u 1103 20 40 , y otros productos de la molienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904 10 10	750
3.9	Fraciones de la molienda del maíz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, clasificadas en el código NC 1102 20, y otros productos de la molienda del maíz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904 10 10	1250

Como se puede observar, la legislación contempla, hoy en día, un número muy escaso de matrices. La información de que se dispone en estos momentos evidencia la existencia de otros alimentos y bebidas en los que sería necesario el control de las micotoxinas por sus graves consecuencias para la salud, tanto humana como también animal. Es además necesario, ampliar los estudios en este campo, no sólo a nivel europeo sino también a nivel mundial, pues es bien conocido que existen todavía países subdesarrollados o en vías de desarrollo cuyas economías son básicamente agrícolas, con pocos o escasos controles relacionados con la incidencia de micotoxinas en alimentos y piensos.

Por otro lado, diferentes comités internacionales han abordado la cuestión de la evaluación del riesgo y de la ingesta diaria tolerable de los tricotecnos, PAT y OTA (Eriksen y Alexander 1998, FAO/WHO 2001a, SCF 1999, 2000a, 2000b). En Europa, el SCF (1999, 2002) y recientemente confirmado por SCOOP task (Gareis *et al.* 2003) han concluido que es posible una exposición de los consumidores a una ingesta diaria tolerable (TDI) de 1 µg/Kg de peso corporal/día y 0.7 µg/Kg de peso corporal/día para DON y NIV, respectivamente. De esta forma, una persona de 70 Kg de peso que consume diariamente 217 g de productos basados en cereales, no debería sobrepasar una concentración máxima de 322.6 µg DON/Kg y 225.8 µg NIV/Kg en estos alimentos (Samar *et al.* 2007). En el caso de OTA, con los nuevos estudios efectuados por la Comisión Europea, se estableció una ingesta semanal tolerable (TWI) de 120 ng/Kg de peso corporal/semana (EFSA 2006), modificando la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) establecida previamente de 100 ng/Kg de peso corporal/semana (FAO/WHO 2001a). En lo que respecta a la PAT, el SCF aprobó en su reunión de 8 de marzo de 2000 una ingesta diaria tolerable máxima provisional (PMTDI) de 0.4 µg PAT/Kg de peso corporal (SCF 2000a).

II OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, los objetivos generales propuestos en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Estudio de la micobiota contaminante del trigo y manzana.
 - 1.1 Estudio de la micobiota nativa del trigo procedente del mercado nacional prestando especial atención a las especies potencialmente productoras de ocratoxina A (OTA), nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados, 3-acetildeoxinivalenol y 15-acetildeoxinivalenol (3-ADON y 15-ADON).
 - 1.2 Estudio de la micobiota nativa de la manzana principalmente de la especie *Penicillium expansum*, principal productora de PAT.
2. Estudio crítico y puesta a punto de métodos cromatográficos para la determinación de ocratoxinas, tricotecenos tipo B y patulina en cultivos *in vitro* de las especies fúngicas productoras.
3. Quimiotipado de los aislados de las especies potencialmente productoras de ocratoxinas, tricotecenos tipo B y patulina en trigo y manzana.
4. Estudio de la influencia de los factores fisicoquímicos en el crecimiento de los hongos y en la producción de las micotoxinas.
5. Diseño y aplicación de modelos de superficie de respuesta para la predicción de la producción de deoxinivalenol por *Fusarium graminearum* y de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* en trigo en diferentes condiciones.
6. Optimización de la metodología para la determinación de ocratoxina A y tricotecenos B en trigo y derivados y de patulina en manzana y derivados. Aplicación al estudio de la incidencia de las micotoxinas en estos productos consumidos en España.
7. Estudio de la estabilidad de las micotoxinas durante el horneado.
8. Estudio crítico de métodos de multidetección de micotoxinas mediante LC-MS en harina de trigo.
 - 8.1 Preparación y optimización de un método analítico para la determinación del mayor número de micotoxinas que pueden estar presentes en harina de trigo minimizando las fases de extracción y purificación previas a su separación mediante LC-MS.

III EXPERIMENTAL

1. Estudio de la micobiota contaminante de trigo y manzana

La presencia de micotoxinas en productos agroalimentarios se debe a la contaminación de estos productos con las especies fúngicas productoras de las diferentes micotoxinas. Estos hongos pueden desarrollarse en el vegetal en etapas precoces durante su cultivo en el campo y también durante la cosecha y el almacenamiento, incluso durante la comercialización del mismo o de sus derivados. El estudio de las especies fúngicas productoras de micotoxinas de un determinado sustrato es una excelente herramienta para evaluar el peligro potencial de que ya existan o vayan a existir micotoxinas en un futuro en ese sustrato si no se toman las medidas oportunas para evitarlo. Sirve además para establecer la micobiota autóctona de los vegetales de una determinada región o país y establecer así los mecanismos de control de su desarrollo y planificación de los cultivos agrícolas. Se emplea en estudios de distribución geográfica de las especies productoras de micotoxinas y en estudios de trazabilidad.

Entre los cereales, es el trigo el que en la actualidad tiene más relevancia en materia de micotoxinas: Del mismo modo entre las frutas es la manzana la que atrae más atención, especialmente en lo que se refiere a la contaminación con patulina. Cabe sin embargo preguntarse ¿cuales son los hongos contaminantes de trigo y manzana, responsables de la presencia de estas y otras micotoxinas? Existen datos relacionados con la micobiota del trigo y de la manzana en otros países pero en España los datos de que se dispone son muy escasos.

Para la realización del trabajo relacionado con la consecución del primer objetivo, el material y métodos utilizados son los que se describen en los siguientes apartados:

1.1 Reactivos y estándares

Glucosa y agar de Panreac (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Barcelona, España). Etanol (grado LC) y cloruro sódico de J.T. Baker (Deventer, Holanda). Dicloran (2,4-dicloro-4-nitroanilina) de Tecnidex (Paterna, Valencia, España). Agua pura se obtuvo en el laboratorio utilizando un aparato de Milli-Q (Millipore, Milford, MA, EEUU).

1.2 Toma de muestras

1.2.1 Trigo

Durante la época otoñal de 2005, 2006 y 2007 se recogieron, respectivamente, 80, 75 y 82 muestras de trigo. Las muestras de grano de trigo se obtuvieron en diferentes almacenes y molinos ubicados en diferentes regiones de España que fueron las siguientes: Castilla-La

Mancha (112 muestras), Castilla–León (67 muestras), La Rioja (21 muestras) y el País Vasco (37 muestras). La toma de muestra se realizó de acuerdo con la normativa vigente (Reglamento (CE) n° 401/2006 de la Comisión). Finalmente, después del correspondiente proceso de muestreo, se recogió un Kg de muestra en bolsas de papel que se llevaron al laboratorio donde se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a su recogida.

1.2.2 *Manzana*

Un total de 100 manzanas, aparentemente sanas, y otras 100, con signos evidentes de lesión se recogieron en diferentes almacenes frutícolas y supermercados situados en las Comunidades de Valencia y Cataluña (España) durante el año 2005. Cada pieza de fruta se guardó en una bolsa de papel, y se llevó inmediatamente al laboratorio, siendo procesada durante las 24 horas posteriores a su recogida.

1.3 *Medios de cultivo*

Se utilizaron dos medios de cultivo para el aislamiento de los hongos contaminantes del trigo.

1) Patata glucosa agar (PDA): se preparó hirviendo 300 gr de patata fresca pelada y troceada durante una hora en agua destilada. El caldo obtenido se filtró y se añadió agua destilada hasta llegar a un 1 litro. Se añadió 2% p/v de agar y 1% p/v de glucosa y a continuación se esterilizó en autoclave a 115°C durante 30 min.

2) Patata dicloran agar: se preparó igual que en el caso anterior, pero posteriormente a su esterilización en autoclave, el medio se dejó enfriar hasta alcanzar los 45–50°C y se le añadió 1 ml de una disolución de dicloran al 0.2% p/v en etanol. El dicloran actúa como inhibidor del crecimiento en hongos de crecimiento rápido como *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp. lo que permite la visualización y aislamiento de otros hongos de crecimiento más lento como *Aspergillus* spp. *Fusarium* spp y *Penicillium* spp. antes de que sean invadidos por los primeros. Ésta fue una estrategia eficaz para el aislamiento de las especies productoras de micotoxinas estudiadas en esta Tesis Doctoral.

1.4 *Aislamiento de hongos contaminantes de trigo*

Una cantidad de 100 g de semillas de cada muestra se esterilizó superficialmente con 500 ml de una solución al 2% (v/v) de hipoclorito sódico durante 1 minuto. Después, los granos se lavaron un par de veces con 250 ml de agua destilada estéril durante 1 min, y a continuación se colocaron 50 semillas por muestra (5 semillas/placa Petri de 9 cm de diámetro) en cada medio sólido descrito anteriormente, por lo tanto, se utilizaron un total de 100 granos de trigo por muestra. La desinfección superficial de los granos se realizó con la finalidad de reducir los posibles contaminantes superficiales, polvo, etc. y eliminar los saprófitos de

crecimiento rápido en la superficie del trigo sin destruir la micobiota contaminante más interna, la cual coloniza el grano. La selección de las semillas fue aleatoria. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días. Durante este periodo se realizó un seguimiento diario de la evolución del crecimiento fúngico para evaluar las especies contaminantes del grano y el nivel de contaminación por cada una de ellas (Ackermann 1998).

Después de transcurrido el periodo de incubación, los hongos crecidos en las proximidades de las semillas en ambos medios se transfirieron a PDA mediante la técnica de siembra por triple estría y a partir de estos cultivos se prepararon placas mediante la técnica de simple espora para proceder a su identificación y posterior liofilización y conservación en la colección de hongos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia (España). La identificación se realizó siguiendo las claves taxonómicas para cada género.

1.5 Aislamiento de hongos contaminantes de la manzana

Las muestras individuales de manzana se esterilizaron superficialmente con etanol 75% (v/v) y a continuación se lavaron dos veces con agua estéril. Cinco fragmentos de manzana se cortaron asépticamente y se colocaron en cada placa de medio sólido descrito, realizando el proceso por triplicado. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días, haciéndose un seguimiento diario de la evolución del crecimiento fúngico para evaluar las especies contaminantes del grano, así como del nivel de contaminación de las mismas.

Después de transcurrido el periodo de incubación los hongos crecidos en las placas de ambos medios se transfirieron a PDA mediante la técnica de triple estría y a partir de estas se prepararon cultivos mediante la técnica de simple espora para proceder a su identificación. Posteriormente se liofilizaron para su conservación en la colección de hongos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia (España).

1.6 Identificación de hongos potencialmente productores de micotoxinas

Los hongos aislados de trigo y manzana se identificaron en base a la morfología de las estructuras reproductivas, hifas y esporas mediante observación macroscópica y microscópica y siguiendo las claves para cada género (Barnett y Hunter 1972, Nelson *et al.* 1983, Klich y Pitt 1988, 1991, Pitt 1985, 1991, Samson y van Reenen–Hoekstra 1988).

Las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* (*A. niger*, *A. tubingensis* y *A. carbonarius*) se identificaron mediante PCR–RFLPs de la región ITS1–5.8S–ITS2 del rDNA siguiendo el protocolo descrito por Medina *et al.* (2005a). Para ello, se aisló, previamente, el DNA fúngico según el método descrito por Lee y Taylor (1990). Posteriormente se realizó la amplificación de la región ITS1–5.8S–ITS2 del rDNA mediante PCR, utilizándose para la amplificación dos oligonucleótidos iniciadores específicos (ITS1 e ITS2) descritos por White *et al.* (1990). Después se realizó la digestión de los productos amplificados aleatoriamente durante toda la noche a 37°C con la

endonucleasa de restricción RsaI (Boehringer Mannheim). Los productos de PCR y los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y 2%, respectivamente, con tampón TBE 0.5X (Tris borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). A continuación, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), y las bandas de DNA se visualizaron con un transiluminador de UV. Los tamaños de DNA se estimaron por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Gibco BRL Life Technologies, Inc., Rockville, EEUU). Para finalizar, se compararon los patrones de restricción obtenidos para los diferentes aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de las muestras de trigo con los patrones que presentan dos cepas tipo, una de *A. niger* (CECT 2807) y otra de *A. tubingensis* (CECT 20393) en las mismas condiciones.

2. Estudio crítico y puesta a punto de métodos cromatográficos para la determinación de ocratoxinas, tricotecenos B y patulina en los cultivos *in vitro* de las especies fúngicas productoras

La contaminación fúngica, por ejemplo de un cereal, por una especie reconocida como productora de una o varias micotoxinas no indica necesariamente que existan micotoxinas en el cereal, cuestión que será tratada en el objetivo siguiente. El conocimiento de la incidencia de cepas productoras de micotoxinas en trigo en España es mínimo. Los escasos estudios existentes presentan deficiencias y falsos negativos debido a que son trabajos que cuando se realizaron no existían métodos sensibles para la determinación de las micotoxinas en los medios de laboratorio. Esto ha llevado tanto en España como en el resto de países a la necesidad de la puesta a punto de métodos analíticos sensibles que permitan un adecuado conocimiento de la incidencia, distribución geográfica y por cultivos de las cepas fúngicas productoras de micotoxinas.

Para la realización del trabajo relacionado con la consecución del segundo objetivo, el material y los métodos utilizados son los que se describen a continuación:

2.1 Cultivos de *Aspergillus spp.*, *Fusarium graminearum* y *Penicillium expansum*

Se emplearon los siguientes medios de cultivo:

1) Medio de cultivo YES. Este medio está compuesto por extracto de levadura (2%, p/v), sacarosa (15%, p/v) y agua desionizada. Una vez preparado, se esterilizó en autoclave a 115°C durante 30 min (Medina *et al.* 2004).

2) Medio de cultivo YES suplementado con 5% polen de abeja. Al medio YES (apartado 1) se suplementó con polen de abeja (5%, p/v) para favorecer el crecimiento del hongo y la producción de toxinas. A continuación se esterilizó en autoclave a 115°C durante 30 min (Medina *et al.* 2004).

3) Medio de cultivo compuesto por granos de maíz. Este medio se preparó utilizando granos de maíz como medio de cultivo (Llorens *et al.* 2004a, 2004b). Se ajustó la actividad de agua (a_w) de los granos a 0.98 mediante la adición del volumen apropiado de agua pura. Para medir la a_w de los granos se utilizó un medidor de a_w sprint RTD 502 (Novasina GmbH, Pfäffikon, Suiza). El instrumento se calibró utilizando disoluciones de sales proporcionadas por el fabricante. Una vez ajustada la actividad de agua, se colocaron 100 g de maíz en un matraz Erlenmeyer. Los matraces se taparon con algodón, cubiertos con papel de aluminio y autoclavados a 115°C durante 30 min.

4) Medio de cultivo compuesto por granos de trigo. Este medio se preparó de igual forma que el medio de cultivo compuesto por granos de maíz (apartado 3), pero en este caso se utilizó granos de trigo.

5) Medio PDA se preparó como se describe en la Sección 1.3 apartado 1.

6) Medio de cultivo ADA. Se preparó de igual forma que el medio PDA descrito anteriormente, pero el extracto de patata se sustituye por extracto de manzana (ver Sección 1.3 apartado 1). El extracto de manzana obtenido por cocción se filtró y posteriormente, se enrasó al volumen adecuado mediante el aporte de agua. El pH del medio se ajustó a 5.5 mediante la adición de NaOH 1M con la ayuda de un pH-metro. Por último, se adicionó agar 2% p/v y se autoclavó a 115°C durante 30 min.

7) Medio de cultivo ZUA. Se preparó a partir de zumo de uva de la variedad tempranillo (100%) utilizada para obtener vino tinto. El extracto de zumo se diluyó en una relación 20:80 (v/v) con agua. El pH del medio se ajustó a 4.5 con la adición de NaOH 1M mediante un pH-metro. A continuación se adicionó agar 2% p/v y se autoclavó a 115°C durante 30 min.

2.2 Reactivos y estándares

Los estándares y reactivos utilizados y los suministradores son los que se describen a continuación. Los estándares de tricotecenos: NIV, DON, 15-ADON y 3-ADON; de ocratoxinas y PAT de Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España). Carbonato de sodio anhidro, sulfato de sodio anhidro, extracto de levadura, agar bacteriológico tipo europeo, acetato de sodio y tolueno de Panreac (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Barcelona, España). Acetonitrilo, cloroformo, hexano, acetato de etilo, ácido acético, metanol (grado LC), ácido fosfórico (85%, A.R.) y sacarosa de J.T. Baker (Deventer, Holanda). Óxido de aluminio 90 estandarizado (0.063–0.2 mm tamaño de partícula) y Tween 80 de Merck (Darmstadt, Alemania). Absorbente C₁₈ de Waters (Waters, Barcelona, España). Carbón activo (Norit) y Celite 545® de Fluka (Sigma-Aldrich). Filtros de microfibras de vidrio (GF/C) y papel de filtro Whatman nº 4 (Whatman, Maidstone, Reino Unido). 1-trimetilsilil-imidazol, bis(trimetilsilil)-acetamida, trimetil-clorosilano, anhídrido pentafluoropropiónico (PFPA), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 5-hidroximetil furfural (HMF) y bicarbonato de sodio de Sigma. Columnas de inmunoafinidad Ochratest de Vicam Science Technology (Watertown, MA, EEUU).

El tampón salino de fosfato (PBS) se preparó con cloruro de potasio (0.2 g) de Panreac, fosfato de potasio dihidrógeno (0.2 g) de Sigma, fosfato de disodio anhidro (1.16 g) de Panreac y cloruro de sodio (8.0 g) de J.T. Baker en 1.0 l de agua pura, el pH se ajustó a 7.4.

La disolución tampón ácido acético-acetato (AABS) se preparó por la adición de 0.45 ml de ácido acético a 40 ml de agua pura, a continuación se adicionó 0.15 g de acetato de sodio y se ajustó a pH 4 mediante la adición de ácido acético. Posteriormente se ajustó el volumen de la

disolución tampón a 50 ml con una cantidad apropiada de agua y se guardó en una botella de color topacio. Al igual que en apartados anteriores, cuando fue necesario, se utilizó agua pura obtenida en el laboratorio mediante un equipo de Milli-Q (Millipore, Milford, MA, EEUU).

2.3 Preparación de disoluciones estándar de las micotoxinas

Cada estándar de NIV, DON, 3-ADON y 15-ADON se disolvió en acetonitrilo hasta una concentración de 1.0 mg/ml y posteriormente se guardó a -20°C en un vial sellado de color topacio hasta su uso. Los estándares de trabajo se prepararon con la disolución apropiada de la disolución stock con acetonitrilo y fueron usados para obtener las curvas de calibrado después de la derivatización e inyección en el sistema cromatográfico.

La disolución madre de OTA de unos 500 mg/l se preparó disolviendo 1 mg de OTA en 2 ml de tolueno-ácido acético (99:1, v/v). Una serie de estándares de trabajo se prepararon por evaporación de alícuotas conocidas de la disolución stock y se disolvieron en la fase móvil filtrada de LC. Estos estándares se utilizaron para calibrar la respuesta del detector. La concentración de la disolución inicial se determinó por medida de la absorbancia a 333 nm de una solución diluida (20–30 mg/l) de OTA en tolueno-ácido acético (99:1, v/v) (Wood *et al.* 1996).

Se disolvió 1 mg de PAT en acetato de etilo para obtener una concentración de 1.0 mg/ml, a continuación esta disolución se transfirió a un matraz aforado de 10 ml y se enrasó con acetato de etilo. Esta disolución stock se mantuvo a -20°C hasta su uso. Los estándares de trabajo se prepararon con la evaporación de alícuotas de volúmenes apropiados y conocidos de la disolución stock, mediante nitrógeno a temperatura ambiente, y posteriormente se disolvieron en volúmenes conocidos de AABS. Estos estándares fueron usados para obtener las curvas de calibrado después de la inyección en el sistema cromatográfico.

2.4 Instrumentación

Agitador de alta velocidad Ultraturrax T25 y un molinillo de laboratorio A-10 IKA (Stauffen, Alemania).

Agitador orbital Infors-HT Aerotron (Infors-HT, Bottmingen, Suiza).

Centrífuga Heraeus Multifuge 1 S-R (Heraeus holding, Hanau, Alemania).

Sistema de GC compuesto de un cromatógrafo de gases HP-6890 plus con ECD con isótopo ^{63}Ni (Hewlett-Packard, Avondale, Pa., EEUU) e inyector automático Agilent 7683 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Las señales se procesaron con software GC ChemStation software versión A.07:01(682) (Hewlett-Packard).

Sistema de GC-MS compuesto de un cromatógrafo de gases Agilent 6890 Network, un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo Agilent-5973N y un

inyector Agilent 7683 Series. Las señales se procesaron por el software MSD Productivity Agilent GC ChemStation versión Rev. C.00.01 (Agilent).

El sistema LC consistió en una bomba Waters 600, un inyector automático Waters 717, un detector UV de red de fotodiodos Waters 996 y un detector de fluorescencia Waters 474. Para controlar el sistema y las señales procesadas se utilizó el software Millennium 32 software, versión 3.05.01 (Waters Co., Milford, MA, EEUU).

2.5 Determinación de micotoxinas en medios de cultivo

2.5.1 Determinación de tricotecenos tipo B en cultivos de grano de trigo

2.5.1.1 Extracción y purificación

El método analítico utilizado para determinar DON, NIV, 3-ADON y 15-ADON en cultivos de trigo fue el descrito por Valle-Algarra *et al.* (2005). Se colocaron 5 g de cultivo molido, homogenizado y suplementado con 1.0 mg de cada micotoxina/Kg en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Después de añadir 40 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v), la mezcla se agitó durante 10 min mediante un agitador de alta velocidad (Sección 2.4). A continuación, la mezcla de extracción se filtró a través de papel de filtro Whatman n° 4 y el filtrado se guardó, hasta su uso, en una botella de vidrio cerrada a -20°C.

La purificación se realizó con cartuchos de extracción en fase sólida preparados en el laboratorio usando una jeringa de plástico estéril. Se colocó en el fondo de la jeringa un filtro de microfibras de vidrio. A continuación se introdujo, una mezcla de lecho empaquetado de 1.16 g de alúmina-carbón activo-C₁₈ (75:1:40, p/p/p). Por último se acopló encima del lecho otro filtro de microfibras de vidrio. Luego se presionó con cuidado mediante un émbolo. En el proceso de purificación, se pasaron 3 ml del extracto a través del cartucho que se recogieron en un vial. Los cartuchos, posteriormente, se eluyeron con 2 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v) y el eluido también se recogió en el mismo vial. Por último, el extracto purificado se concentró a sequedad a 45°C bajo una suave corriente de N₂.

2.5.1.2 Derivatización de tricotecenos por GC-ECD

Para la derivatización de los tricotecenos, se añadieron 100 µl de una disolución de DMAP de 2 mg/ml en tolueno-acetonitrilo (80:20, v/v) y 50 µl de PFFA a cada extracto seco en un vial con tapón de rosca. Después se cerró el vial, y la mezcla reaccionante se calentó a 60°C durante 60 min en un bloque calefactor de aluminio. Posteriormente, la mezcla se dejó enfriar y se le añadió 0.4 ml de tolueno y 1 ml de una solución acuosa al 3% (p/v) de NaHCO₃ y seguidamente se agitó vigorosamente con un Vórtex durante 15 s. Las dos fases se dejaron separar y a continuación la fase orgánica se transfirió a un vial del inyector automático de GC que se analizó por GC-ECD como se indica posteriormente.

2.5.1.3 Determinación de tricotecenos mediante GC-ECD

Se realizó la separación de los derivados de pentafluoropropionilos de los tricotecenos en una columna HP-5 (30 m longitud, 0.32 mm diámetro interno, 0.25 μm de espesor de película, Agilent Technologies). En el sistema GC-ECD (Sección 2.4) se utilizaron como temperaturas de inyector y de detector 250 y 300°C, respectivamente. La programación de temperatura del horno fue 90°C durante el primer minuto; a continuación se incrementó a 40°C/min hasta alcanzar los 160°C, seguidamente hubo un incremento lineal de 1.5°C/min hasta llegar a 182°C, a continuación un aumento de 5°C/min hasta llegar a 240°C y finalmente se alcanzaron los 275°C mediante un incremento de 40°C/min que se mantuvo durante 2 min. Como gas portador se utilizó helio a presión constante de 42.1 KPa.

2.5.2 Determinación de tricotecenos tipo B en cultivos de grano de maíz

Para la determinación de los tricotecenos tipo B, 50 g del cultivo de maíz, secado mediante una estufa de aire a 45°C, se molió finamente en un molinillo de laboratorio y se contaminó con 2.5 mg micotoxina/Kg y 250 mg micotoxina/Kg. Una vez contaminado, se colocaron 5 g del cultivo molido en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, siguiéndose posteriormente con el proceso descrito en las Secciones 2.5.1.1 y 2.5.1.2. Después se analizaron con el mismo sistema GC-EDC utilizado en la Sección 2.5.1.3.

2.5.3 Determinación de ocratoxina A en cultivos de grano de trigo

2.5.3.1 Extracción y purificación

La extracción y purificación para el análisis de trigo inoculado se realizó siguiendo el método Pierard *et al.* (2004). Se introdujeron 5 g de trigo seco, molido y contaminado con 1 μg de OTA/Kg en un matraz redondo y se añadieron 40 ml de acetonitrilo-agua (60:40, v/v). Para la extracción se utilizó un agitador de alta velocidad (Sección 2.4) durante 5 min. La suspensión se filtró con papel de filtro Whatman n° 4 y 5 ml del extracto de acetonitrilo-agua se diluyeron con 35 ml de agua purificada. A continuación se pasaron los 40 ml del extracto diluido por una columna de inmunoafinidad a un flujo medio de 1–2 gotas/s. Posteriormente la columna se lavó con 10 ml PBS y después con 10 ml de agua pura. Por último, se eluyó la toxina del cartucho con 1.5 ml de metanol a una velocidad de 1 gota/s a un vial de 4 ml. El extracto purificado se llevó a sequedad a 45°C bajo una suave corriente de nitrógeno y se redisolvió con 0.250 ml de fase móvil de LC.

2.5.3.2 Análisis por cromatografía líquida con detector de fluorescencia

Se realizó la separación cromatográfica con una columna C₁₈ Phenomenex Gemini® (150 mm de longitud, 4.6 mm diámetro interno, 5 μm tamaño de partícula) conectada a una precolumna C₁₈ Phenomenex Gemini® SecurityGuard (4 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno, 5 μm

tamaño de partícula) rellena con la misma fase estacionaria. La temperatura de la columna se mantuvo constante durante el análisis cromatográfico a 30°C. El volumen de inyección fue de 100 µl de la muestra redisuelta y se determinó la OTA mediante un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de fluorescencia (Sección 2.4). Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo–agua–ácido acético (47:52:1) a un flujo de 1 ml/min. La longitud de onda de excitación fue de 330 nm y la de emisión de 460 nm.

2.5.4 Extracción, purificación y determinación de ocratoxina A en medio de cultivo YES suplementado con polen de abeja

La extracción y determinación por LC de las ocratoxinas en medio YES suplementado con polen de abeja (5%, p/v) se realizó acorde con el método propuesto por Medina *et al.* (2004). Se suplementó el medio YES–polen de abeja al 5% con una alícuota apropiada de una disolución estándar para obtener una concentración de 0.1 y 10 µg/l para la OTA y OTB y se homogenizó. A 2 ml de medio contaminado con las toxinas, se le añadió 200 µl de una disolución de ácido fosfórico 0.1 M, y se procedió a una extracción líquido–líquido con 3 ml de cloroformo repitiendo el proceso tres veces. Después se evaporó el disolvente orgánico mediante un rotavapor y el residuo se disolvió con 0.5 ml de acetonitrilo–agua–ácido acético (49.5:49.5:1, v/v/v). El análisis cromatográfico se realizó con el mismo sistema LC que el descrito anteriormente en la Sección 2.4. Además, se acopló un detector de red de fotodiodos de UV conectado antes del detector de fluorescencia que proporcionó la confirmación de la identificación de OTA por comparación del espectro de UV con el del estándar. La separación cromatográfica de 100 µl de la muestra redisuelta se realizó mediante una columna C₁₈ LiChrospher 100® (250 mm de longitud, 4 mm diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) conectada a una precolumna C₁₈ (4 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) rellena con la misma fase estacionaria. La columna se mantuvo a una temperatura de 40°C. Las otras condiciones cromatográficas fueron las mismas que las utilizadas en la Sección 2.5.3.2.

2.5.5 Determinación de ocratoxina A en medio de cultivo ZUA

Se cortaron en trozos pequeños 20 g de cada cultivo fúngico (agar+biomasa), contaminado antes de solidificar el medio con OTA, para obtener una concentración de medio de 100 µg/l. Posteriormente se realizó la extracción con 50 ml de metanol por agitación a 250 rpm durante 1 h en un agitador orbital (Sección 2.4) a 25°C en la oscuridad. El extracto se filtró a través de un papel de filtro Whatman n° 4 que contenía 5 g de Celite 545. A continuación 1 ml de cada extracto se transfirió a un microtubo y se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min para una mayor purificación. El sobrenadante de cada tubo se colocó en un vial ámbar para análisis por LC–FLD.

La determinación de OTA se realizó con un sistema de LC–FLD (ver Sección 2.4). Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las utilizadas en la Sección 2.5.3.2, pero en este caso, se utilizó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo–agua–ácido acético (44:55:1) a un flujo de 1 ml/min.

2.5.6 Determinación de patulina en medio de cultivo YES

La determinación de PAT en medio de cultivo YES se realizó según el método propuesto por Macdonald *et al.* (2000). Brevemente, consiste en el siguiente protocolo: primeramente, el medio se suplementó con 235 y 55 µg de patulina/l, y 10 ml de cultivo contaminado se extrajo por tres veces con 20 ml de acetato de etilo cada vez. Después se combinaron los tres extractos y se añadió 4 ml de carbonato de sodio (1.5% p/v en disolución acuosa), el cual después de agitar se descartó. El extracto orgánico limpio se hizo pasar a través de un filtro que contenía sulfato de sodio anhidro. A la disolución de carbonato de sodio descartada en la extracción se le añadió 10 ml de acetato de etilo (por dos veces) para extraer la posible PAT residual, y posteriormente, se pasaron también por el filtro que contenía sulfato de sodio anhidro. La combinación de extractos se secó mediante un rotavapor a 40°C y se redisolvió con 0.5 ml de AABS.

Tras las etapas de extracción y purificación descritas anteriormente, las muestras se analizaron por un LC acoplado a un espectrofotómetro de UV (Sección 2.4). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna de fase reversa C₁₈ Agilent Zorbax XDB–C18® (150 mm de longitud, 4.6 mm diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) conectada a una precolumna Agilent Zorbax® (4 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno, 5µm tamaño de partícula) rellena con la misma fase estacionaria.

Para la optimización de la condiciones cromatográficas se inyectaron 50 µl de una disolución de AABS con 2 mg de HMF/l y 50 µg de PAT/l. El HMF y la PAT deberían de eluir como dos picos completamente separados, para ello, generalmente, se aumenta el contenido de acetonitrilo en la fase móvil del cromatógrafo de líquidos. En la columna se consiguieron separar satisfactoriamente los picos utilizando como fase móvil el acetonitrilo como disolvente A, y el agua como disolvente B. El programa de elución fue a flujo constante de 1 ml/min y empezó con 99% del disolvente B mantenido durante 2 min, seguido por un gradiente lineal de 99% a 90% de B durante 11 min, a continuación, otro gradiente lineal de 90% a 1% de B durante 3 min y mantenido durante 1 min, por último un gradiente lineal durante 1 min para volver a las condiciones iniciales. La longitud de onda óptima para la determinación de PAT fue de 276 nm. El volumen de inyección fue de 0.05 ml. La columna se mantuvo en un horno termostataado a 30°C.

2.5.7 Determinación de patulina en medios de cultivo PDA y ADA

Para la determinación de PAT se troceó el medio sólido suplementado con 5 mg/Kg de PAT y se recogieron 2 g de cada medio fúngico triturado (agar+biomasa) que se introdujeron en un tubo con tapón de rosca de 50

ml. Posteriormente se extrajo la PAT por la adición de 5 ml de acetato de etilo–hexano (96:4 v/v) y con la ayuda de un agitador orbital a 250 rpm durante 1 hora a 25°C en oscuridad. A continuación, se centrifugó el extracto a 6000 rpm durante 10 min, recogándose 3 ml del sobrenadante en un vial ámbar que contenía 30 µl de ácido acético, para posteriormente secar con una corriente suave de nitrógeno a temperatura ambiente. Por último se disolvió con 1 ml de disolución tampón de ácido acético (AABS) para su determinación por LC–UV.

La determinación de PAT se realizó mediante un sistema de LC (ver Sección 2.4) Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que en la Sección 2.5.6.

3. Quimiotipado de los aislados de las especies potencialmente productoras de ocratoxinas, tricotecenos tipo B y patulina

España es un país mediterráneo con un clima cálido, adecuado para la infección fúngica del grano de trigo y la manzana antes y después de la cosecha. Las especies de hongos que inciden en el trigo o la manzana como en el resto de productos agroalimentarios son afectadas por condiciones tales como: clima, localización, época de la cosecha y características de la variedad entre otras (Haikara *et al.* 1977), lo que produce una selección cualitativa y cuantitativa de las especies en las diferentes regiones geográficas. Pero además, ciertas especies fúngicas presentes en dichas matrices pueden producir micotoxinas bajo determinadas condiciones. Estas micotoxinas entran en la cadena alimentaria a través de las materias primas y de los productos elaborados como el pan, la cerveza, las compotas de manzana, etc. Ello, representa un riesgo para la salud de los consumidores. Por tanto, se hace necesaria una evaluación de la capacidad potencial de producción de micotoxinas de los hongos contaminantes de trigo y manzana de cada región para comprobar si existe o no un riesgo potencial para la salud del consumidor.

Para la realización del trabajo relacionado con la consecución del tercer objetivo el material y los métodos utilizados son los que se describen en los próximos apartados:

3.1. Especies fúngicas y medios de cultivo empleados.

Para determinar la capacidad potencial de producción de ocratoxinas A y B de los aislados de las especies contaminantes del trigo se empleó:

- Medio de cultivo (YES). Compuesto por extracto de levadura (2%, p/v), sacarosa (15%, p/v) y agua. Para favorecer el crecimiento del hongo y la producción de toxinas, este medio se suplementó con 5% (p/v) de polen de abeja (Sección 2.1 apartado 2).
- Aislados de las principales especies productoras de OTA obtenidos de las muestras de trigo analizadas. Se usaron 45 aislados de *Aspergillus* de la sección *Nigri* y 20 aislados de *A.* de la sección *Circumdati*. Estos aislados se seleccionaron de manera aleatoria de entre todos los aislados obtenidos en los ensayos realizados para la consecución del primer objetivo. Para cada aislado, se prepararon 3 matraces de Erlenmeyer con 50 ml de medio. La inoculación del hongo, se realizó añadiendo 1 ml de una suspensión de esporas de cada aislado realizada con solución acuosa de Tween 80 (0.05%) que contenía 1×10^5 esporas/ml. Todos los matraces se incubaron a 25°C durante 4 semanas. Paralelamente se realizó un cultivo control en el que se colocó 50 ml de medio estéril sin inocular y se incubó en las mismas condiciones.

Para determinar la capacidad potencial de producción de patulina de los aislados de *Penicillium expansum* obtenidos de las muestras de manzana

analizadas en el objetivo 1, se seleccionaron aleatoriamente 28 aislados de esta especie y se empleó el mismo medio de cultivo y procedimiento que el descrito para las especies de *Aspergillus*, pero en este caso el medio no se suplementó con polen de abeja (Sección 2.1 apartado 1) y el tiempo de incubación fue de 2 semanas.

Finalmente para determinar la capacidad potencial de producción de tricotecenos B por los aislados de *F. graminearum* Schwabe se seleccionaron aleatoriamente 40 aislados de esta especie, obtenidos de las muestras de trigo analizadas en los ensayos del objetivo 1. Esta experiencia se desarrolló utilizando granos de maíz como medio de cultivo (Sección 2.1.2) (Llorens *et al.* 2004a, 2004b). Se colocaron 100 g de maíz en un matraz Erlenmeyer y se ajustó la a_w a 0.98 mediante la adición de un volumen apropiado de agua pura. Para medir la a_w de los granos se utilizó un medidor de a_w sprint RTD 502 (Novasina GmbH, Pfäffikon, Suiza). El instrumento se calibró utilizando disoluciones de sales proporcionadas por el fabricante. Los matraces se taparon con algodón, se cubrieron con papel de aluminio y se autoclavaron a 115°C durante 30 min. Los granos estériles se inocularon con 100 µl de una suspensión de esporas realizada con disolución acuosa de Tween 80 (0.05%) conteniendo 1×10^6 esporas/ml. La incubación fue de 4 semanas a 25°C (Llorens *et al.* 2004b). Los tricotecenos producidos se determinaron en todos los casos en cultivos realizados por triplicado. Se emplearon controles preparados del mismo modo que los cultivos pero en este caso sin inocular. Estos controles se incubaron bajo las mismas condiciones que los medios inoculados.

3.2 Extracción, purificación y determinación de las micotoxinas

Los ocratoxinas se determinaron acorde al procedimiento descrito en la Sección 2.5.4 para el medio de cultivo YES suplementado con polen mientras la patulina se analizó mediante el procedimiento indicado en la Sección 2.5.6 para el medio de cultivo YES y por último, los tricotecenos se detectaron y determinaron por el método descrito en la Sección 2.5.2 para medios de cultivo de maíz.

4. Estudio de la influencia de los factores fisicoquímicos en el crecimiento de los hongos y en la producción de las micotoxinas

Las grandes pérdidas económicas asociadas con la reducción de producción en las cosechas son principalmente debidas a enfermedades producidas en las plantas por los hongos fitopatógenos, muchos de los cuales son además productores de micotoxinas. El principal objetivo de los productores es evitar la extensión de la contaminación por los hongos y si es posible, su eliminación. El hongo sintetiza las micotoxinas cuando se encuentra en unas determinadas condiciones ambientales. El manejo adecuado de estas condiciones puede inhibir no sólo la producción de micotoxinas sino incluso el desarrollo de los hongos, asegurando así, la calidad de los cultivos. Se ha descrito que el uso adecuado de fungicidas, el control de la temperatura y la a_w , etc., son excelentes herramientas para el control del crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas, pero los resultados obtenidos en un determinado país incluso región de un país no son aplicables a otras zonas geográficas debido a que la micobiota autóctona de una determinada localización geográfica puede presentar resistencias y adaptaciones que no se presentan en otro lugar.

De ello se deduce que si se desea controlar el crecimiento y la producción de micotoxinas por la micobiota autóctona de una determinada localización geográfica y de un determinado cultivo y derivados, es necesario realizar un estudio particular, considerando las cepas contaminantes de ese cultivo y las condiciones climatológicas, de almacenamiento, comercialización y prácticas industriales y culinarias del mismo previo a su consumo.

En base a ello, para la consecución del cuarto objetivo de esta tesis doctoral se describe a continuación el material y los métodos necesarios para realizar dicho objetivo:

4.1 Aislados fúngicos

Para el estudio de la influencia de los factores físico-químicos en el crecimiento y la producción de OTA y PAT se eligió una cepa de *A. carbonarius* (Asc 14) aislada de trigo y otra de *P. expansum* (Pe7) aislada de manzana, que eran capaces de producir OTA y PAT, respectivamente. Estos aislados están depositados en la colección de hongos del grupo de "Micología y Micotoxinas" del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

4.2 Fungicidas: Formulación de la carbendazima y del sulfato de imazalil

En esta experiencia se emplearon dos fungicidas, la carbendazima y el imazalil. El primero de ellos se usa para el control del crecimiento fúngico en cereales y el segundo es el fungicida más empleado para el control de *Penicillium* spp. en almacenes frutícolas.

Para el estudio del efecto de la carbendazima en el crecimiento y producción de OTA por *A. carbonarius*, se utilizó Carzim 50® (Icona, S.A., Buenos Aires, Argentina) cuya composición es carbendazima (50% p/v). Se diluyó una alícuota apropiada del fungicida con agua para obtener una emulsión patrón de 100 mg carbendazima/l. La emulsión patrón a su vez se diluyó con agua para obtener estándares de trabajo de menor concentración que se utilizaron para añadir al medio de cultivo y conseguir una concentración de entre 1–2000 ng de carbendazima/g de medio. Previamente, se realizaron experimentos preliminares que demostraron que el crecimiento del aislado de *A. carbonarius* empleado, resulta inhibido a concentraciones superiores a 1000 ng/ml. Este hallazgo, y el conocimiento de que la producción de metabolitos secundarios, como son las micotoxinas, puede ser estimulada por ciertos factores de estrés medioambiental si son mantenidos junto con bajas dosis de fungicida en el período de crecimiento del hongo productor de micotoxinas (Placinta *et al.* 1996, D'Mello *et al.* 1998, Magan *et al.* 2002), hizo llegar a la conclusión de que era necesario realizar un estudio detallado de concentraciones del fungicida inferiores a la concentración que inhibe totalmente el crecimiento del hongo. Se seleccionaron concentraciones comprendidas entre 0 y 450 ng de carbendazima/ml de medio.

Para el estudio del efecto del imazalil en el crecimiento y producción de PAT por *P. expansum*, se utilizó Deccozil S-7'5® (Cerexagri Iberica, S.A., Paterna, España) compuesto por sulfato de imazalil al 7.5% (p/v). Un volumen adecuado de sulfato de imazalil se diluyó con agua para obtener una dilución patrón de 1 g sulfato imazalil/l. A continuación se realizaron distintas diluciones con agua para obtener los estándares de trabajo que se utilizaron para añadir al medio de cultivo y obtener las diferentes concentraciones del fungicida ensayadas que estuvieron en el intervalo de entre 10 y 500 µg de sulfato de imazalil/Kg de medio. Como en el caso anterior se llevaron a cabo experimentos preliminares que demostraron que el crecimiento del aislado de *P. expansum* empleado resulta inhibido a concentraciones del fungicida superiores a 100 ó 750 µg/Kg de medio, dependiendo del tipo de medio usado. De acuerdo con los resultados previos, se realizaron estudios detallados en un intervalo de concentraciones de fungicida que oscilaron entre 0 y 500 µg de sulfato de imazalil/Kg de medio.

4.3 Medios de cultivo y estudios de crecimiento

4.3.1 Para *Aspergillus carbonarius*

Para el cultivo de *A. carbonarius*, se empleó un medio de cultivo elaborado con zumo de uva, por ser éste, un medio óptimo para la producción de OTA. Para ello, se preparó un extracto a partir de zumo de uva tinta, variedad tempranillo (100%) utilizada habitualmente para la obtención de vino tinto. El extracto de zumo se diluyó en una relación 20:80 (v/v) con una mezcla de agua-glicerol a diferentes proporciones para obtener valores de a_w en el medio sólido final de 0.98, 0.96 y 0.94. La proporción

de agar en el medio fue de 2% p/v y el pH de 4.5, este pH se ajustó mediante la adición de NaOH 1M. Una vez ajustado el pH y añadido el agar, el medio se esterilizó en autoclave a 115°C durante 30 min. Tras la esterilización, se dejó enfriar hasta 45°C y se le añadió el volumen apropiado de la disolución patrón de carbendazima para obtener la concentración deseada en el medio. Después de la homogenización, se prepararon las correspondientes placas Petri.

Previamente a la inoculación de las placas, la cepa de *A. carbonarius* se cultivó en medio YES durante 7 días a 28°C y a partir de estos cultivos, se preparó una suspensión de esporas de 1×10^6 células/ml en una disolución de NaCl al 0.9% en medio acuoso que se utilizó para inocular las placas Petri. La inoculación se realizó introduciendo 2 μ l de la suspensión en el centro de la placa en condiciones estériles. Las temperaturas de incubación utilizadas en la experiencia, fueron 20, 25 y 28°C en función de resultados previos que indicaron que la temperatura óptima para la producción de OTA por *A. carbonarius* era aproximadamente de 20°C, mientras que la temperatura de crecimiento del hongo era cercana a los 30°C (Mitchell *et al.* 2004). La incubación se desarrolló en cámaras cerradas en las que se colocaron recipientes que contenían una disolución de glicerol-agua con la misma a_w que la de las placas (Llorens *et al.* 2004). Para controlar el crecimiento fúngico se midió el diámetro de la colonia diariamente hasta que las colonias ocuparon toda la placa. El inicio del crecimiento del hongo se consideró cuando la colonia alcanzó 5 mm de diámetro. Para el desarrollo de la experiencia, se prepararon diez placas para cada temperatura, a_w y concentración de fungicida ensayada. Dos de estas placas se eligieron aleatoriamente para medir las colonias tomándose los valores de dos diámetros posicionados perpendicularmente. La suma de los cuatro diámetros se dividió por 8 para obtener el valor medio del radio. Se usó la regresión lineal de la longitud del radio de la colonia (mm) frente al tiempo (días que transcurrieron desde el día que la colonia alcanzó 5 mm de diámetro) para determinar la velocidad de crecimiento (mm/día) del micelio.

4.3.2 Para *Penicillium expansum*

Para la cepa de *P. expansum* se usaron dos medios de cultivo: Patata Glucosa Agar (PDA) y Manzana Glucosa Agar (ADA) (ver Sección 2.1). El extracto de patata o de manzana obtenido por cocción se enrasó al volumen adecuado con una mezcla de agua-glicerol en diferentes proporciones para conseguir valores de a_w en el medio de 0.99, 0.96 y 0.93. La proporción de agar en el medio fue de 2% p/v y el pH se ajustó a 5.5 mediante la adición de NaOH 1M. Una vez ajustado el pH y añadido el agar, el medio se esterilizó por vía húmeda a 115°C durante 30 min. Después de la esterilización, cuando el medio se enfrió hasta unos 45°C, se añadieron alícuotas apropiadas de la disolución estándar de sulfato de imazalil para obtener la concentración deseada de fungicida en los medios. A continuación, el medio se homogeneizó y repartió en placas Petri. Se comprobaron los valores de a_w usando placas de medio sin inóculo y con la

ayuda de un medidor de actividades acuosas Novasina RTD 502 (Novasina GmbH, Pfäffikon, Suiza).

La cepa de *P. expansum* que se utilizó en esta experiencia, se cultivó previamente en medio PDA durante 7 días a 25°C, a continuación, se preparó una suspensión de esporas de 1×10^6 por ml con una disolución de NaCl 0.9% en medio acuoso que se utilizó para inocular bajo condiciones estériles, en la parte central de las placas Petri preparadas para este estudio. Las temperaturas de incubación utilizadas en la experiencia, fueron 4, 14 y 24°C. El intervalo de temperaturas seleccionado se debió a que la temperatura de almacenamiento en frío es de unos 4°C y la temperatura de mayor acumulación de PAT es a unos 25°C (Morales *et al.* 2008a). El proceso de incubación se desarrolló en cámaras cerradas donde se colocaron recipientes que contenían una disolución de glicerol-agua con la misma a_w que las placas (Llorens *et al.* 2004). Para el estudio del crecimiento del hongo, se realizó la medición del micelio en el cultivo a lo largo del tiempo hasta que las colonias se extendieron por toda la placa. Se consideró el inicio del crecimiento del hongo cuando la colonia se podía percibir, no siendo menor a 3 mm de diámetro de inóculo. Para este estudio, se prepararon diez placas para las diferentes condiciones y medio, y 2 de las placas se eligieron aleatoriamente para medir las colonias (valores de dos diámetros posicionados perpendicularmente), siendo medidas todos los días hasta que la colonia llenaba por completo la placa Petri o el cultivo era utilizado para determinar la acumulación de PAT. La media de los diámetros, se dividió por dos para obtener el valor medio del radio. Se utilizó la regresión lineal del radio de colonia (mm) frente a tiempo (horas que transcurrieron desde el día que la colonia se podía medir hasta que ocupase 80 mm de la placa, considerándose entonces como placa totalmente llena) para determinar la velocidad de crecimiento (mm/hora).

4.4 Determinación de micotoxinas

4.4.1 Ocratoxina A en los cultivos del aislado de *A. carbonarius*

Una vez que se detectó el crecimiento fúngico, se determinaron los niveles de OTA en los cultivos a los 3, 7, y 15 días. Por tanto, el día real de la acumulación de OTA fue el tiempo de inicio del crecimiento del hongo más el día de determinación de OTA. Este protocolo se aplicó cada vez con dos replicas, según la metodología indicada en la Sección 2.5.5.

4.4.2 Patulina en los cultivos del aislado de *P. expansum*

Una vez comprobada la existencia de crecimiento fúngico, se determinaron los valores de PAT en los cultivos durante diferentes días mediante el procedimiento descrito en la Sección 2.5.7. Este procedimiento se llevó a cabo con dos replicas cada vez.

4.5 Análisis estadístico

Se utilizó para el análisis estadístico el paquete informático Statgraphics 5.1 Plus Professional Edition (Statpoint Inc., Herndon, VA, EEUU).

5. Diseño y aplicación de modelos de superficie de respuesta para la predicción de la producción de deoxinivalenol por *Fusarium graminearum* y de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* en trigo

La microbiología predictiva surge como un campo emergente con amplias aplicaciones en la industria alimentaria y de la salud. Se han aplicado modelos predictivos para el crecimiento de microorganismos en determinadas condiciones ambientales (García-Gimeno *et al.* 2002a, 2002b, 2005, Lou y Nakai 2001a) o para predecir la inactivación térmica de las bacterias y esporas bacterianas (Davey *et al.* 1978, Lou y Nakai 2001b). El más utilizado de todos es el modelo de superficie de respuesta (RSM) (Pardo *et al.* 2004, Ramírez *et al.* 2006). Se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de modelos para describir los efectos combinados de factores medioambientales en el crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos, sin embargo, existe poca información relacionada con el desarrollo de modelos para describir estos efectos en la producción de metabolitos fúngicos como son las micotoxinas (Hope *et al.* 2005).

Los parámetros cinéticos involucrados en el crecimiento de microorganismos pueden obtenerse a partir de una función no lineal (sigmoide) comúnmente utilizada para expresar la relación entre el crecimiento y el tiempo. Existen varios modelos sigmoides documentados, la ecuación modificada de Gompertz es quizás la más sencilla de implementar y estadísticamente adecuada para monitorizar el crecimiento de microorganismos (Hajmeer *et al.* 1997, Zaika *et al.* 1994, Zwietering *et al.* 1990). Otro enfoque matemático para modelos de crecimiento de organismos fue el desarrollado por Baranyi y Roberts (1994). Estos autores diseñaron un programa para estimar la velocidad de crecimiento específica, el tiempo de demora de inicio del crecimiento o *lag* y la densidad máxima de población. Estas ecuaciones se podrían utilizar para predecir la producción de micotoxinas, pero éstas aun no han sido aplicadas.

Para la realización del estudio relacionado con el quinto objetivo, el material y los métodos empleados son los que se describen seguidamente:

5.1 Aislados fúngicos

En el caso del estudio de la influencia de los factores físico-químicos en la producción de DON y OTA y el posterior estudio predictivo se eligieron dos cepas, una de la especie *F. graminearum* (c21d32) y otra de la especie *A. ochraceus* (Aso2), ambas aisladas de trigo. Previamente a su selección, se comprobó su capacidad para producir DON y OTA, respectivamente. Todos estos aislados están depositados en la colección de hongos del grupo de “Micología y Micotoxinas” del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

5.2 Medios de cultivo y estudios de crecimiento

5.2.1 Para *Fusarium graminearum*

La cepa de *F. graminearum* empleada se cultivó previamente en medio de cultivo PDA durante 7 días a 25°C (Llorens *et al.* 2004b). Estos cultivos se utilizaron para obtener pequeñas piezas de disco cilíndricas que se emplearon para inocular los medios de trigo con *F. graminearum*. Se colocaron 100 g de trigo (analizado previamente para descartar la presencia de DON) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se hidrataron mediante adición de un volumen apropiado de una disolución de agua-glicerol que se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente para estabilizar los valores de a_w a 0.94, 0.96 y 0.98 de acuerdo con Dallyn (1978). Para medir la a_w de los granos se utilizó un medidor de a_w sprint RTD 502 (Novasina GmbH, Pfäffikon, Suiza). El instrumento se equilibró utilizando disoluciones salinas proporcionadas por el fabricante. Los matraces se taparon con algodón, se cubrieron con papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave a 115°C durante 30 min. Los respectivos valores de a_w se comprobaron y confirmaron después de la esterilización usando controles que consistieron en 100 g de semillas de trigo que se colocaron en matraces Erlenmeyers de 250 ml, con la misma cantidad de agua y glicerol que los inoculados en esta experiencia. En algunos casos, fue necesario rehidratar los granos con adición de agua pura estéril para alcanzar los niveles de a_w deseados.

Los medios de trigo estéril se inocularon con piezas cilíndricas de cultivos de PDA que contenían el hongo. Las piezas cilíndricas de cultivo se tomaron en círculo a la misma distancia del centro de la placa Petri y el diámetro de las piezas cilíndricas elegidas fue de 0.70, 1.1 y 1.5 cm. Estos cilindros se distribuyeron uniformemente entre las semillas por agitación de los matraces. Los matraces Erlenmeyers se incubaron estáticamente (por duplicado) junto a los controles sin inocular en cámaras cerradas a 15, 20 ó 25°C provistas de recipientes que contenían disoluciones de glicerol-agua con la misma a_w . Los cultivos se sacaron de la cámara a los 3, 7, 10, 13, 16, 20, 24, 30, 35, 40 y 55 días y se secaron a 50°C durante 48 horas en una estufa de aire. Después se molieron con un molinillo de laboratorio.

5.2.2 Para *Aspergillus ochraceus*

El aislado de *A. ochraceus* se cultivó previamente en medio de cultivo PDA durante 4 semanas a 25°C (Medina *et al.* 2004). Estos cultivos se utilizaron para la inoculación de los medios de trigo correspondientes. Una cantidad de 100 g de trigo (libre de OTA) se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se adicionó el volumen adecuado de una disolución de agua-glicerol, que se dejó toda la noche a temperatura ambiente para estabilizar la a_w , a los valores 0.91, 0.95 y 0.99 de acuerdo con Dallyn (1978). Al igual que en los otros casos se midió la a_w de los granos mediante un medidor de a_w sprint RTD 502. Los matraces se taparon con algodón, se recubrieron con papel de aluminio y se autoclavaron a 115°C durante 30 min. Después del autoclavado, se comprobaron los respectivos valores de a_w usando

controles que consistieron en 100 g de semillas de trigo colocadas en matraces Erlenmeyers de 250 ml, a los que se adicionó la misma cantidad de agua y glicerol. En algunos casos, fue necesario rehidratar los granos con adición de agua pura estéril para alcanzar los niveles de a_w requeridos.

Los medios se inocularon con el volumen apropiado de una suspensión de esporas en solución salina, para alcanzar una concentración final en el medio de cultivo de 100, 1000, 10000 esporas/gramo de trigo. Estas esporas se distribuyeron homogéneamente entre los granos mediante agitación. A continuación, los medios inoculados siguieron el mismo proceso que en la Sección anterior 5.2.1, pero en este caso los periodos de incubación fueron 4, 7, 11, 14, 17, 21, 25, 31, 35 ó 40 días.

5.3 Diseño experimental para la aplicación del modelo de superficie de respuesta

5.3.1 Factores ecofisiológicos y tratamiento matemático

a) Tamaño de inóculo:

El inóculo empleado en los diferentes ensayos dirigidos al estudio de la influencia de los factores fisicoquímicos en la acumulación de DON por *F. graminearum*, consistió en discos cilíndricos de cultivos del hongo en medio PDA crecido a 25°C durante 7 días. El tamaño de los discos fue 0.7, 1.1 y 1.5 cm de diámetro. En las experiencias dirigidas al estudio de la influencia de los diferentes factores en la producción de OTA por *A. ochraceus*, el tamaño del inóculo se controló mediante el empleo de suspensiones de esporas del hongo en solución salina para llegar a una concentración final en los cultivos de 100, 1000, 10000 esporas/gramo de trigo. Las esporas se obtuvieron a partir de cultivos del hongo en PDA a 25°C durante 4 semanas.

b) Actividad de agua del medio:

La a_w del medio se ajustó de igual forma que la descrita en la Sección 5.2.1 para *F. graminearum* y Sección 5.2.2 para *A. ochraceus*.

En las experiencias relacionadas con la producción de DON por *F. graminearum* los valores de actividad de agua empleados fueron: 0.94, 0.96 y 0.98.

En las experiencias relacionadas con la producción de OTA por *A. ochraceus* los valores de actividad de agua empleados fueron: 0.91, 0.95, 0.99.

c) Tiempo de incubación

Los niveles de DON en los diferentes cultivos se determinaron a los 3, 7, 10, 13, 16, 20, 24, 30, 35, 40 y 55 días del periodo de incubación.

Los niveles de OTA en los diferentes cultivos se determinaron a los 4, 7, 11, 14, 17, 21, 25, 31, 35, 40 días del periodo de incubación.

d) Temperatura de incubación

Los valores de temperatura empleados tanto en las experiencias para el estudio de la producción de DON como para el estudio de la producción de OTA fueron: 15, 20 y 25°C.

Todas las experiencias se llevaron a cabo por duplicado

El número de experimentos por duplicado que pueden llevarse a cabo usando todos las posibles combinaciones de variables (diseño factorial completo) resulta del producto de 3 valores de temperatura por 3 valores de actividad de agua por 3 valores de inóculo añadido por 11 días de análisis para el DON (ó 10 días para la OTA) y por 2 réplicas. Todo ello supone 594 casos para las experiencias realizadas con *F. graminearum* y producción de DON y 540 casos para las experiencias realizadas con *A. ochraceus* y producción de OTA. Para desarrollar un RMS, algunas combinaciones pueden ser omitidas para ahorrar tiempo y material sin pérdida de fiabilidad experimental mediante el uso de un diseño factorial fraccionado, como es el diseño compuesto de caras centradas (FCC)*. De tal modo que puede llevarse a cabo la experiencia con sólo 15 ensayos por día de los 27 posibles. Los valores estandarizados son -1, 0, y 1, y se refieren al valor más bajo, valor medio y el valor más alto utilizado en cada variable ($3 \times 5 = 15$). Sin embargo, el número total de experimentos seleccionados fue de 16 debido a que para el uso de este diseño es necesario duplicar el punto central (0.0.0). Teniendo en cuenta los periodos de tiempo (11 ó 10 días) en que se analiza cada cultivo y las 2 réplicas por experiencia, el número de cultivos preparados fue de 16×11 (ó 10) $\times 2 = 352$ (ó 320), es decir, el 59.3% de los experimentos en un diseño factorial completo. También se pusieron en paralelo controles sin inóculo en las mismas condiciones. El resto de las posibles combinaciones ($27 - 15 = 12$) (Tablas 7 y 8) se usaron para obtener un banco de datos para validar los modelos predictivos (test), debido a que no se aplicaron para construir los modelos.

5.3.2 Tratamiento de los datos

La colección de datos obtenidos después de la determinación de DON y OTA en trigo se utilizaron para construir dos modelos diferentes de RS, que se evalúan con respecto a sus interpretaciones.

5.3.3 Modelo de superficie de respuesta basado en la función de Baranyi (RS-Baranyi)

El enfoque que se hizo para construir este modelo de RS está basado en la hipótesis de que los hongos inoculados en el grano de trigo en el matraz Erlenmeyer tienen que desarrollar un micelio y mostrar un crecimiento del hongo en la superficie del grano antes de poder producir metabolitos secundarios como son las micotoxinas. La fase de iniciación del crecimiento

* El FCC es un caso especial del diseño central compuesto. En el FCC los puntos axiales u ortogonales pasan a ser los centroides de cada una de las caras con sus (n-1) dimensiones. De esta manera, el FCC consigue minimizar el número de niveles.

estaría entonces asociado con la carencia de producción de toxina y es dependiente de variables medioambientales y otras variables intrínsecas. Un segundo estado en el crecimiento microbiano comporta un rápido incremento de la masa del hongo con el tiempo. La velocidad de crecimiento es el valor máximo de la pendiente de la curva de crecimiento. Durante este rápido desarrollo, la masa de micelio del hongo puede producir metabolitos secundarios, siendo posible que exista un tiempo de retardo entre estos dos fenómenos. A continuación, se pasa a otra fase donde la pendiente de la curva de crecimiento desciende y tiende a estabilizarse a un cierto valor que posteriormente decae, debido al consumo de los nutrientes del sustrato en el matraz, y por tanto, no pueden crecer. Durante esta fase, las micotoxinas sintetizadas por los hongos se acumulan usualmente en el medio, sin embargo, cuando son escasas otras fuentes de nutrientes en el medio, los propios hongos pueden consumir los metabolitos secundarios y su comportamiento puede producir un decrecimiento de los niveles de estos metabolitos secundarios. Así, el nivel de metabolitos secundarios en la tercera fase sería relativamente alta pero bastante variable; sin embargo se ha supuesto que este nivel se puede considerar constante si el tiempo no es excesivamente grande. Finalmente, el hongo muere.

Tabla 7. Combinaciones de valores para los tres factores (tamaño de inóculo, actividad de agua y temperatura de incubación) a los tres niveles seleccionados por el FCC utilizado para la construcción del modelo.

Combinación probada ^a	Inóculo: Diámetro de disco ^b (cm) / Concentración esporas ^c (esp/g)	Valor a_w ^{b/c}	Temperatura de incubación (°C)
-1.-1.-1	0.7/100	0.94/0.91	15
-1.-1.1	0.7/100	0.94/0.91	25
-1.0.0	0.7/100	0.96/0.95	20
-1.1.-1	0.7/100	0.98/0.99	15
-1.1.1	0.7/100	0.98/0.99	25
0.-1.0	1.1/1000	0.94/0.91	20
0.0.-1	1.1/1000	0.96/0.95	15
0.0.0	1.1/1000	0.96/0.95	20
0.0.1	1.1/1000	0.96/0.95	25
0.1.0	1.1/1000	0.98/0.99	20
1.-1.-1	1.5/10000	0.94/0.91	15
1.-1.1	1.5/10000	0.94/0.91	25
1.0.0	1.5/10000	0.96/0.95	20
1.1.-1	1.5/10000	0.98/0.99	15
1.1.1	1.5/10000	0.98/0.99	25

a Combinaciones seleccionadas para cada factor experimental por FCC: -1 = valor mínimo; 0 = valor medio; 1 = valor máximo. Todas las combinaciones se realizaron por duplicado excepto la (0.0.0) que se realizó por cuadruplicado.

b Condiciones probadas para la determinación de acumulación de DON.

c Condiciones probadas para la determinación de acumulación de OTA.

Se ha demostrado que el programa DMFit (Baranyi y Roberts 1994) es útil para monitorizar los parámetros de crecimiento de microorganismos y se usó para adecuar las curvas obtenidas de concentración de DON–tiempo (o OTA–tiempo) para cada colección de condiciones ambientales fijadas (temperatura, a_w , diámetro de colonia o concentración de esporas inoculadas) analizadas acorde al FCC. Para este propósito, se desarrolló un programa macro utilizando Microsoft Excel. La usual significancia de términos de crecimiento como tiempo de inicio, velocidad de crecimiento, o crecimiento máximo no es aplicable porque el crecimiento fúngico no se midió; sin embargo, los parámetros calculados con DMFit se utilizaron provisionalmente para predecir la acumulación de las dos micotoxinas a estudio. El paquete estadístico Statgraphics Plus se utilizó para desarrollar ecuaciones por regresión multilínea, para adecuar los datos a la superficie de respuesta. Las superficies de respuesta son generalmente validadas mediante algunos cálculos estadísticos entre diferencias de valores observados y valores predichos.

Tabla 8. Combinaciones de valores para los tres factores (tamaño de inóculo, actividad de agua y temperatura de incubación) a los tres niveles excluidos por el diseño el FCC utilizado para la validación del modelo.

Combinación probada ^a	Inóculo: Diámetro de disco ^b (cm) / Concentración esporas ^c (esp/g)	Valor a_w ^{b/c}	Temperatura de incubación (°C)
-1.-1.0	0.7/100	0.94/0.91	20
-1.0.-1	0.7/100	0.96/0.95	15
-1.0.1	0.7/100	0.96/0.95	25
-1.1.0	0.7/1000	0.98/0.99	20
0.-1.-1	1.1/1000	0.94/0.91	15
0.-1.1	1.1/1000	0.94/0.91	25
0.1.-1	1.1/1000	0.98/0.99	15
0.1.1	1.1/1000	0.98/0.99	25
1.-1.0	1.5/10000	0.94/0.91	20
1.0.-1	1.5/10000	0.96/0.95	15
1.0.1	1.5/10000	0.96/0.95	25
1.1.0	1.5/10000	0.98/0.99	20

a Combinaciones excluidas para cada factor experimental por FCC y utilizadas para la validación cruzada: -1 = valor mínimo; 0 = valor medio; 1 = valor máximo.

b Condiciones probadas para la determinación de acumulación de DON.

c Condiciones probadas para la determinación de acumulación de OTA.

5.3.4 Modelo de superficie de respuesta basado en regresión lineal múltiple (RS-MLR)

La misma colección de datos se trató con el programa Statgraphics para Windows considerando todas las variables (temperatura, a_w , tamaño de inóculo y tiempo) y combinaciones lineales de estas variables para el desarrollo de un modelo de RS pero en este caso, se excluyeron aquellas

combinaciones o parámetros que conducen a la carencia en la mejora del funcionamiento del modelo, calculado de la misma manera que en el modelo de RS–Baranyi.

5.3.5 Validación de modelos

Para evaluar la adecuación y precisión de la predicción de la función obtenida por los modelos de superficie respuesta se utilizó la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE). El error estándar de la predicción (SEP) es la relación estadística de RMSE con respecto a la media de las observaciones

$$\text{RMSE} = \left[\frac{\sum (\text{obs} - \text{pred})^2}{n} \right]^{\frac{1}{2}} \quad [\text{Ec. 1}]$$

$$\text{SEP}(\%) = 100 \times \frac{\text{RMSE}}{\text{mean obs}} \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde *obs* es el valor observado; *pred* es el valor predicho; *mean obs* es la media de los valores observados y *n* es el número de valores observados. El error más bajo de las medias cuadráticas, es el que mejor refleja el modelo al dato.

5.4 Determinación de micotoxinas

5.4.1 Deoxinivalenol en los cultivos del aislado de *F. graminearum*

La determinación de los niveles de DON en los cultivos durante los días indicados para el análisis, se desarrollaron por duplicado, según la metodología indicada en la Sección 2.5.1.

5.4.2 Ocratoxina A en los cultivos del aislado de *A. ochraceus*

Se determinaron los niveles de OTA en los cultivos en los días fijados. El análisis se desarrolló por duplicado, según la metodología indicada en la sección 2.5.3.

5.5 Análisis estadístico

El tratamiento experimental para RSM se determinó aleatoriamente por el programa informático Statgraphics Plus Professional Edition para Windows (Statpoint Inc., Herndon, VA, EEUU).

Se utilizó un programa macro utilizando Microsoft Excel versión 2003 para la adecuación de las curvas de concentración de DON–tiempo (o OTA–tiempo) al modelo de Baranyi (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU).

Se usó el paquete informático SigmaPlot 10.0 para la realización de diagramas en 3D (Systat Software Inc., San Jose, CA, EEUU).

6. Optimización de la metodología para la determinación de ocratoxina A y tricotecenos B en trigo y derivados, y de patulina en manzana y derivados. Aplicación al estudio de la incidencia de las micotoxinas en estos productos consumidos en España.

El mayor problema con el que se enfrentan, agricultores, comerciantes, consumidores y autoridades sanitarias es el conocer la verdadera incidencia de micotoxinas en los productos agroalimentarios y derivados que constituyen la dieta diaria. Los análisis que se realizaban para determinar los niveles de micotoxinas en alimentos y bebidas hasta hace pocos años con frecuencia indicaban ausencia de micotoxinas, sin embargo el avance en los métodos analíticos en los últimos años indica que estos datos eran erróneos y que un elevado número de alimentos y bebidas habituales en la dieta están contaminados con micotoxinas. Los niveles de micotoxinas encontrados en estos alimentos son muy bajos pero si se considera la suma de todos ellos, la posibilidad de enfermedades crónicas graves y, eventualmente enfermedades agudas, debidas a micotoxinas aumenta. Las autoridades sanitarias tratan de establecer una dosis diaria máxima admisible para cada micotoxinas pero exhortan a los investigadores a que propongan métodos sensibles de análisis que puedan elucidar la ingestión real de estas toxinas y poder así revisar la legislación vigente o establecer nuevas normativas para micotoxinas concretas como DON, OTA o PAT en alimentos y bebidas que protejan de manera eficaz la salud de los consumidores. Sin estos métodos analíticos sensibles no se puede establecer el peligro real en materia de micotoxinas que constituye el consumo de un determinado alimento.

A pesar de que se han desarrollado muchos métodos para determinar las micotoxinas en diversas matrices, es necesario seguir optimizando los métodos para conseguir que sean sencillos, económicos, con límites de detección más bajos y de mayor reproducibilidad para su aplicación en el control de calidad de los alimentos y bebidas a través de la cadena de producción. Estos métodos son muy necesarios en el campo de la seguridad alimentaria.

En base a ello, para la realización del trabajo relacionado con la consecución del sexto objetivo de esta Tesis Doctoral, el material y los métodos utilizados son los que se describen a continuación:

6.1 Colección de muestras

Se estudiaron 33 muestras de trigo y 37 muestras de harina de trigo. Las muestras se obtuvieron en almacenes y molinos españoles entre 2006 y 2008. El muestreo se realizó siguiendo el protocolo oficial (Reglamento (CE) nº 401/2006) que concluyó finalmente con una muestra de 1 Kg que se guardó en bolsas de papel y procesadas dentro de las 24 horas posteriores a su recogida.

Se estudiaron 48 muestras de diversos tipos de panes que se recogieron en panaderías, hornos y supermercados españoles entre 2006 y 2008. El pan se conservó herméticamente en bolsas de plástico a -20°C hasta su análisis.

Se estudiaron 54 muestras de zumos, compotas y preparados infantiles que contenían como ingrediente mayoritario manzana y/o pera. Las muestras se recogieron en plantas de procesado y sobre todo en almacenes de grandes supermercados de venta directa. Veintiocho de las muestras fueron zumos, 5 de compotas, néctares y mermeladas de manzana y/o pera y el resto de alimentos para bebés. Las muestras se almacenaron en sus envases originales en las condiciones recomendadas por el fabricante para mantenerlas en buen estado hasta el momento de su análisis. Las muestras se abrieron inmediatamente antes del análisis que se realizó posteriormente a su homogenización.

6.2 Reactivos y estándares

Los estándares y reactivos utilizados y los suministradores son los que se describen a continuación. Los estándares de tricotecenos: NIV, DON, 15-ADON y 3-ADON; ocratoxinas A y B y PAT de Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España). Carbonato de sodio anhidro, sulfato de sodio anhidro, acetona (grado LC), acetato de sodio y tolueno de Panreac (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Barcelona, España). Acetonitrilo, cloroformo, hexano, acetato de etilo, diclorometano, ácido acético, metanol (grado LC), ácido fosfórico (85%, A.R.), cartuchos de SPE sílica gel de J.T. Baker (Deventer, Holanda). Óxido de aluminio 90 estandarizado (0.063–0.2 mm tamaño de partícula) de Merck (Darmstadt, Alemania). Absorbente C₁₈, cartuchos Sep-Pack Florisil[®], cartuchos de SPE C₁₈, cartuchos Sep-Pack Sílica y cartuchos con combinación de intercambio iónico y fase reversa (RP) Oasis MAX[®] de Waters (Waters, Barcelona, España). Carbón activo (Norit), anhídrido heptafluorobutírico (HFBA) y Celite 545[®] de Fluka (Sigma-Aldrich). Polietilenglicol 8000 (PEG), ácido trifluoroacético, hexacianoferrato (II) de potasio, hidróxido de amonio (30%, v/v) y acetato de cinc dihidratado de Aldrich (Sigma-Aldrich). Filtros de microfibra de vidrio (GF/C) y papel de filtro (Whatman n^o 4) de Whatman (Maidstone, Reino Unido). 1-trimetilsilil-imidazol, bis(trimetilsilil)-acetamida, trimetil-clorosilano, anhídrido pentafluoropropiónico (PFPA), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), fosfato monosódico dihidratado 5-hidroximetil furfural (HMF) y bicarbonato de sodio de Sigma. Columnas de inmunoafinidad Ochrestest de Vicam Science Technology (Watertown, MA, EEUU).

Los medios de cultivo y los tampones PBS y AABS se prepararon de igual forma que en la sección 2.1 y 2.2. Se obtuvo agua pura utilizando un aparato de Milli-Q (Millipore, Milford, MA, EEUU) y se utilizó cuando fue necesaria.

La preparación de estándares de las diferentes micotoxinas se realizó de igual modo que en la sección 2.3.

6.3 Instrumentación

Evaporador giratorio LaboRota S300 (Resona Technics, Gossau, Suiza) equipado con un sistema de refrigeración Selecta Frigiterm-10 (J.P Selecta, Barcelona, España) y un sistema de vacío Büchi Vac-V500, regulado con un controlador de vacío V-800 (Büchi Labortechnik, Flawil, Suiza).

Agitador de alta velocidad Ultraturrax T25 y un molinillo de laboratorio A-10 IKA (Stauffen, Alemania).

Agitador orbital Infors-HT Aerotron (Infors-HT, Bottmingen, Suiza).

Centrífuga Heraeus Multifuge 1 S-R (Heraeus holding, Hanau, Alemania).

Sistema GC compuesto de un cromatógrafo de gases HP-6890 plus con ECD con isótopo ^{63}Ni (Hewlett-Packard, Avondale, Pa., EEUU) e inyector automático Agilent 7683 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Las señales se procesaron con software GC ChemStation software versión A.07:01(682) (Hewlett-Packard).

El sistema de GC-MS estaba compuesto de un cromatógrafo de gases Agilent 6890 Network, un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo Agilent-5973N y un inyector Agilent 7683 Series (Agilent Technologies). Las señales se procesaron por el software MSD Productivity Agilent GC ChemStation versión Rev. C.00.01.

El sistema LC consistió en una bomba Waters 600, un inyector automático Waters 717, un detector UV de red de fotodiodos Waters 996 y un detector de fluorescencia Waters 474. Para controlar el sistema y las señales procesadas se utilizó el software Millennium 32 software, versión 3.05.01 (Waters Co., Milford, MA, EEUU).

El sistema LC-MS estaba formado por un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 (Agilent Technologies), acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Bruker Esquire 3000 Plus (Bruker Instruments, Billerica, MA, EEUU).

6.4 Determinación de tricotecenos tipo B en trigo

El desarrollo y la posterior optimización del método analítico para la determinación de tricotecenos tipo B en trigo se realizó mediante sucesivas etapas: primeramente, una etapa de extracción de las micotoxinas, a continuación una fase de purificación del extracto, después una derivatización de las mismas y por último el análisis mediante GC-ECD.

6.4.1 Extracción

Una muestra de 50 g de trigo, previamente analizada para descartar su contaminación por tricotecenos tipo B, se molió finamente con un molinillo de laboratorio y 5 g de harina se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. A las muestras se les añadió la cantidad apropiada de una alícuota de cada solución estándar de micotoxina para obtener una concentración

de 0.1 ó 1.0 mg de micotoxina/Kg de trigo. Los disolventes se dejaron evaporar durante 15 min y a continuación la muestra contaminada bien cerrada se agitó suavemente para distribuir uniformemente las toxinas. Después se añadió 40 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v), la mezcla se agitó con un agitador de alta velocidad durante 10 min. A continuación se filtró a través de papel Whatman nº 4. La mezcla de extracción se guardó hasta su uso, en un frasco de cristal opaco a -20°C .

6.4.2 Purificación con SPE

Se ensayaron los siguientes procesos de purificación mediante SPE.

6.4.2.1 Columna de MycoSep 225®

Se introdujeron 5 ml del extracto filtrado en acetonitrilo-agua (84:16, v/v) en un tubo MycoSep 225® (Romer Laboratories, Union, Mo, EEUU) (Langseth *et al.* 1999). El extracto se purificó según las instrucciones del fabricante: el extremo final de la goma de la columna de purificación se empujó lentamente hacia el interior del tubo, creando un sellado entre la goma de la columna y la pared del tubo de vidrio. Como la columna se empujó fuertemente hacia el interior del tubo, el extracto suavemente se forzó a pasar a través de la frita, después por la válvula unidireccional y posteriormente por el material empaquetado de la columna. Una vez el extracto atravesó la columna, 1 ml del extracto purificado se transfirió a un vial y se concentró a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno a 45°C .

6.4.2.2 Cartucho de Florisil®

Se introdujo una alícuota de 30 ml del extracto filtrado en un embudo de decantación y se desgrasó por tres veces con 5 ml de hexano descartándose la fase de hexano (Mateo *et al.* 2001). El extracto desgrasado se evaporó en un evaporador giratorio a 40°C y el residuo se redisolvió en 1 ml de diclorometano (por 2 veces) con la ayuda de un Vórtex durante 1 minuto y se transfirió a un cartucho de Florisil® (Waters) que había sido previamente acondicionado con 2 ml de cloroformo-metanol (7:3, v/v) seguido de 4 ml de diclorometano. Los tricotecenos se eluyeron con 5 ml de cloroformo-metanol (7:3, v/v) y se recogieron en un vial con tampón de rosca. El eluido se concentró a sequedad mediante nitrógeno como está indicado en la Sección 6.4.2.1.

6.4.2.3 Mezcla de Celite 545-alúmina-carbón activo

Se ensayaron 2 mezclas de Celite 545-alúmina-carbón activo. La primera se aplicó a extractos que se desgrasaron con hexano, previamente al paso por el cartucho de SPE. La segunda se usó sin eliminación previa de las grasas con hexano.

6.4.2.3.1 Con desgrasado

En el laboratorio se prepararon cartuchos de SPE usando jeringas estériles de plástico de 5 ml. Un filtro de microfibras de vidrio se colocó en el fondo de la jeringa. A continuación se añadió un lecho empaquetado que contenía una primera capa de 0.1 g de Celite 545 y una segunda con 1.5 g de una mezcla homogénea de alúmina-carbón activo-Celite 545 (5:7:3, p/p/p). Por último, se colocó, presionando fuertemente pero con cuidado con un émbolo, otro filtro de microfibras de vidrio encima del lecho. Una alícuota de la muestra de extracto filtrada se introdujo en un embudo de decantación y se desgrasó con 5 ml de hexano (3 veces) (Mossoba *et al.* 1996). La fase de hexano se descartó y la muestra de extracto desgrasada se pasó a través del cartucho preparado. El filtrado se recogió en un matraz y posteriormente, el cartucho se lavó con 20 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v). El extracto purificado y el líquido de lavado se unieron en un balón de destilación, que después se evaporó a 40°C con un evaporador giratorio. El residuo se redisolvió con 1 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v) y fue transferido a un vial de 4 ml repitiéndose este proceso una vez más. El extracto se llevó a sequedad mediante nitrógeno como es descrito en la Sección 6.4.2.1.

6.4.2.3.2 Sin desgrasado

Un cartucho de SPE se preparó como se indica previamente (ver Sec. 6.4.2.3.1), pero en este caso el material empaquetado consistió en 1.47 g de una mezcla homogénea que contenía alúmina-Celite 545-carbón activo (100:45:2, p/p/p). A través del cartucho se hicieron pasar 4 ml de extracto de muestra y 1 ml del extracto purificado se transfirió a un vial. El extracto se llevó a sequedad con nitrógeno como se indica en la Sección 6.4.2.1.

6.4.2.4 Alúmina-carbón activo

Se preparó un cartucho de extracción en fase sólida como se indica en la Sección 6.4.2.3.1, pero esta vez el material empaquetado consistió en 1.15 g de una mezcla homogénea que contenía alúmina-carbón activo (100:15, p/p) (Croteau *et al.* 1994, Hsueh y Freund 1999). A través de la columna preparada se hicieron pasar 3 ml de extracto de muestra. El filtrado se recogió en un vial y a continuación, el cartucho se lavó con 2 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v) y el líquido de lavado se combinó con el filtrado. La mezcla se secó bajo nitrógeno como se indica en la Sección 6.4.2.1.

6.4.2.5 Alúmina-carbón activo-C₁₈

Se ensayaron 3 opciones diferentes de este procedimiento. Los cartuchos se prepararon como se ha indicado previamente (Sec. 6.4.2.3.1), pero el material utilizado consistió en:

a) 1.18 g de alúmina-carbón activo-C₁₈ (75:3:40, p/p/p) (Tacke y Casper 1996, Mirocha *et al.* 1998). A través del cartucho se pasaron 3 ml de

extracto de muestra. El filtrado purificado se recogió en un vial y se llevó a sequedad como se indica en la Sección 6.4.2.1.

b) 1.16 g de alúmina-carbón activo-C₁₈ (75:1:40, p/p/p). Se pasaron 5 ml de extracto de muestra por el cartucho. El filtrado purificado se recogió en un vial y se llevó a sequedad como se ha indicado anteriormente.

c) La misma mezcla que la indicada en el apartado anterior. A través del cartucho preparado se pasaron 3 ml de extracto de muestra y se recogieron en un vial. El cartucho se lavó con 2 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v). El eluyente se recogió en el mismo vial y el extracto purificado se llevó a sequedad de la manera usual (Sección 6.4.2.1).

6.4.2.6 Alúmina-carbón activo-silica

Se preparó un cartucho como se ha indicado anteriormente (Sección 6.4.2.3.1), pero el material empaquetado consistió en 1.55 g de una mezcla homogénea que contenía alúmina-carbón activo-silica (90:1.5:5, p/p/p). Se hizo pasar 3 ml de extracto de muestra por el cartucho preparado y se recogió en un vial. A continuación, el cartucho se lavó con 2 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v). Estos líquidos se combinaron en el mismo vial y se llevaron a sequedad de la misma manera que en la Sección 6.4.2.1.

6.4.3 Derivatización de los tricotecenos tipo B

Se añaden 100 µl de una disolución de DMAP a 2 mg/ml en tolueno-acetonitrilo (80:20, v/v) y 50 µl de HFBA o PFPa a cada extracto seco en un vial con tapón de rosca. Después de cerrar el vial, la mezcla reaccionante se calentó a 60°C durante 60 min en un calefactor de aluminio. Después de que la mezcla se hubiera enfriado, se añadió 1 ml de una disolución acuosa de NaHCO₃ al 3% (p/v) y 400 µl de tolueno. Posteriormente se agitó vigorosamente el vial con un Vórtex durante 15 s. Se dejaron separar las dos fases y la capa orgánica se transfirió a un vial del inyector automático del GC que fue analizada por GC-ECD como se indica en el apartado siguiente.

6.4.4 Análisis por GC-ECD

La determinación por GC-ECD (Sección 6.3) se llevó a cabo usando dos condiciones cromatográficas diferentes. En ambos casos, se inyectó 1 µl de solución en modo sin división (*splitless*). Las temperaturas del inyector y del detector fueron 250°C y 300°C, respectivamente. En el primer procedimiento se utilizó una columna capilar de sílice fundida HP-5 [5% metil fenil siloxano (30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno, 0.25 µm de espesor de película, Agilent Technologies)]. El programa de temperatura del horno fue: 90°C al inicio mantenido durante 1 min, 40°C/min hasta 160°C, 1.5°C/min hasta 182°C, 5°C/min hasta 240°C, y luego con posterior incremento de 40°C/min hasta 275°C, mantenido durante 2 min. Se utilizó helio como gas portador a presión constante de

42.1 kPa. En el segundo procedimiento se utilizó una columna capilar de sílice fundida HP-1701 [14% cianopropil fenil metil polisiloxano (30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno, 0.15 μm de espesor de película, Agilent Technologies)]. El programa de temperatura del horno fue: 90°C mantenido durante 1 min, 40°C/min hasta 160°C, 5°C/min hasta 173°C, 2°C/min hasta 195°C, 5°C/min hasta 240°C, y luego 40°C/min hasta 270°C mantenido durante 1 min. Como gas portador se utilizó helio a presión constante de 103 kPa.

6.4.5 Confirmación de los tricotecenos por GC-MS

Se utilizó GC-espectrometría de masas para confirmar inequívocamente la identidad de los tricotecenos tipo B en trigo. El método de extracción y purificación utilizado para la confirmación de los tricotecenos están descritos en las Secciones 6.4.1 y 6.4.2.6c, respectivamente.

6.4.5.1 Derivatización de los tricotecenos tipo B

Se añadieron 100 μl de 1-trimetilsilil-imidazol, bis(trimetilsilil)-acetamida, trimetil-clorosilano (3:3:2, v/v/v) a cada extracto seco en un vial con tapón de rosca. Después de cerrado, se dejó reaccionar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se añadió 0.5 ml de tolueno a la mezcla y el vial se agitó vigorosamente durante 15 s y después se añadió 1 ml de agua y se volvió a agitar otros 15 s. Se dejaron separar sendas capas y la fase orgánica se transfirió a un vial y se analizó por GC-MS como se indica posteriormente.

6.4.5.2 Determinación GC-MS

El análisis de GC-MS (Sección 6.3) se llevó a cabo usando estas condiciones: La temperatura de inyector fue de 250°C. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida Phenomenex ZB-5MS (30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interno, 0.25 μm espesor de película, Phenomenex Inc., Torrance, CA, EEUU). El programa de temperatura del horno fue: 90°C mantenido durante 1 min, 20°C/min hasta 240°C, 2°C/min hasta 254°C, y luego 40°C/min hasta 280°C, mantenido durante 5 min. Como gas portador se utilizó el helio a flujo constante de 1 ml/min. Se inyectó 1 μl de disolución en modo sin división.

Las condiciones del detector de masas fueron: tipo ionización EI en modo positivo, con adquisición en modo SCAN (intervalo 100–700 m/z), con voltaje de detección 1800 V. Las temperaturas del cuadrupolo y de la fuente fueron de 150°C y 230°C, respectivamente.

6.5 Determinación de tricotecenos tipo B en pan

La extracción, purificación y derivatización se determinaron siguiendo la metodología descrita en las Secciones 6.4.1, 6.4.2.6c y 6.4.3 con PFFA, respectivamente. En este caso la muestra se contaminó con la cantidad

apropiada de una alícuota de DON, NIV y 3-ADON para obtener una concentración de 0.5 mg micotoxina/Kg.

La determinación de tricotecenos por GC-ECD se realizó de la misma manera que en el procedimiento descrito en la Sección 6.4.4 en las mismas condiciones que las utilizadas para la columna de sílice fundida HP-5 [5% metil fenil siloxano (30 m de longitud, 0.32 mm diámetro interno, 0.25 µm espesor de película)].

La confirmación de tricotecenos tipo B en las muestras de pan se realizó de la misma manera que en las muestras de trigo (Sección 6.4.5).

6.6 Determinación de ocratoxina A en harina de trigo

Para encontrar un método apropiado para la determinación de OTA en harina de trigo se compararon diferentes etapas de extracción y de purificación del extracto. Para finalizar se optimizaron las condiciones para la determinación mediante LC-FLD.

6.6.1 Extracción y purificación para la OTA

6.6.1.1 Método por inmunoafinidad

La extracción y purificación para el análisis de trigo se realizó siguiendo las técnicas de Vicam (1999) y Pierard *et al.* (2004) con alguna modificación que consistió en la centrifugación en vez de la filtración. Se introdujeron 5 g de harina de trigo en un matraz redondo y se añadieron 40 ml de acetonitrilo-agua (60:40, v/v). Para la extracción, se utilizó un agitador de alta velocidad (Sección 6.3) durante 5 min. La suspensión obtenida se centrifugó a 6000 rpm durante 6 min y a 4°C (Sección 6.3). A continuación, se añadieron 5 ml del sobrenadante a 35 ml de agua purificada y se pasaron por una columna de inmunoafinidad a un flujo medio de 1–2 gotas/s. Posteriormente la columna se lavó con 10 ml PBS y después con 10 ml de agua pura, por último se eluyó con 1.5 ml de metanol a una velocidad de 1 gota/s en un vial de 4 ml. El extracto purificado se concentró a sequedad a 45°C bajo una suave corriente de nitrógeno y se redisolvió en 0.250 ml de fase móvil de LC.

6.6.1.2 Método por SPE con mecanismo de intercambio iónico y fase reversa

La toxina se extrajo esencialmente acorde con el método de Ventura *et al.* (2003) con alguna modificación: se incluye un proceso de clarificación mediante una disolución de acetato de cinc. Se introdujeron en un matraz Erlenmeyer 5 g de muestra de harina de trigo, luego se añadieron 50 ml de una disolución acuosa de bicarbonato sódico al 1% y se agitó durante 10 min en un agitador de alta velocidad para extraer la micotoxina. A continuación se añadió un volumen de 3 ml de una disolución acuosa de acetato de cinc (25%, p/v). El exceso de Zn²⁺ se controló con

hexacianoferrato (II) de potasio, produciéndose un precipitado voluminoso de hexacianoferrato (II) de cinc. Posteriormente, se centrifugó durante 6 min a 4500 rpm. Se recogieron 10 ml del sobrenadante que se ajustaron a pH 6–6.5 con 30 μ l de ácido acético y posteriormente se agitó vigorosamente con la ayuda de un vórtex durante 1 min. El extracto ajustado, se pasó a través de la columna de extracción en fase sólida Oasis MAX® a un flujo de 1 gota por segundo (previamente acondicionada con 2 ml de metanol y después con 2 ml agua purificada). El cartucho se lavó con 2 ml de agua–metanol (95:5, v/v) y luego con 2 ml de metanol. La OTA se eluyó con 2 ml de metanol–ácido acético (95:5, v/v) y fue recogida en un vial. El extracto eluido se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió en 0.250 μ l de fase móvil de LC.

6.6.1.3 Método con acetato de cinc y extracción líquido–líquido

El método está basado en el procedimiento de Medina *et al.* (2006a). Se transfirieron 5 g de muestra de harina de trigo a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 50 ml de una disolución acuosa de bicarbonato sódico (1%, p/v). La mezcla se agitó con un agitador de alta velocidad durante 10 min y posteriormente se introdujeron 3 ml de una disolución acuosa de acetato de cinc dihidratado al 25% (p/v) para eliminar colorantes sin que afectase a los niveles de OTA. El exceso de Zn^{2+} se precipitó con hexacianoferrato (II) de potasio. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 min, y luego fue centrifugada a 4500 rpm durante 6 min recogiendo el sobrenadante.

Una alícuota de 25 ml del sobrenadante se acidificó a pH 2.8–3.0 con 400 μ l de ácido fosfórico (para la comprobación del pH se usaron rutinariamente tiras indicadoras Pehanon de pH 1.8–3.8, Macherey Nagel, Düren, Alemania) y a continuación se añadió 1 g de cloruro sódico que se agitó hasta su disolución. Posteriormente se realizó una extracción líquido–líquido en un embudo de decantación con acetato de etilo, para ello se agregaron 15 ml del disolvente. Una vez separadas las dos fases se recogió la fase orgánica, después se repitió el mismo proceso por dos veces más, pero esta vez la cantidad de disolvente orgánico utilizado fue de 10 ml. Se unificaron todas las extracciones orgánicas y la muestra se secó en un rotavapor que luego se redisolvió con 3 ml de metanol–agua (95:5, v/v). La muestra redisoluelta se transfirió a un vial de 4 ml y se evaporó con una corriente suave de N_2 a 45°C. Por último se disolvió con 0.5 ml de la fase móvil del LC.

6.6.1.4 Método de SPE con sílica

El procedimiento de análisis está basado en el método de Domijan *et al.* (2003). A 5 g de muestra de harina se le añadieron en un matraz Erlenmeyer 50 ml de acetato de etilo y 5 ml de ácido fosfórico 0.1 M. Esta mezcla se agitó durante 10 min en un agitador de alta velocidad. Después el extracto se filtró con un papel Whatman n° 4. Posteriormente se recogieron 10 ml de la fase orgánica y se añadieron 50 μ l de hidróxido de amonio (30%, v/v) para asegurarse que la muestra estaba a un pH entre

7.5–9. El extracto orgánico basificado se pasó por un cartucho de sílica (acondicionado previamente con 3 ml de acetato de etilo a un flujo de 1–2 gotas por segundo) a una velocidad de 1 gota por segundo. Luego se lavó el cartucho con 5 ml de acetato de etilo. Por último, se eluyó con 3 ml de acetato de etilo–ácido acético (95:5, v/v) y fue transferido a un vial de vidrio. El disolvente se evaporó a 45°C bajo una corriente de N₂ y el residuo se disolvió en 250 µl de fase móvil.

6.6.2 Análisis por cromatografía líquida con detector de fluorescencia

Se llevó a cabo la separación cromatográfica de igual modo que el realizado en la Sección 2.5.3.2.

6.6.3 Evaluación de la recuperación y límites de detección

Los ensayos de recuperación se desarrollaron por triplicado de acuerdo con Nakajima *et al.* (1999) en muestras de harina de trigo, previamente contaminada con 0.2, 0.6 y 1.0 µg OTA/Kg de muestra. Para ello se utilizó una muestra de harina de trigo que no contenía OTA a niveles detectables según método utilizado por Pierard *et al.* (2004) y se añadieron volúmenes apropiados de la solución estándar de OTA a matraces Erlenmeyers de 250 ml que contenían 50 g de muestra de harina de trigo. La disolución se disolvió en la muestra utilizando un baño de ultrasonidos durante 1 min y homogenizada con una ligera agitación. El disolvente se evaporó bajo una suave corriente de N₂. A continuación se operó según los procedimientos previos para el tratamiento de muestras de harina de trigo (ver Sección 6.6.1).

Para calcular los límites de detección, a la harina le fueron añadidas alícuotas de disoluciones estándar de OTA para obtener una serie de estándares donde los niveles de contaminación variaban entre 0 y 0.1 ng/ml. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento indicado en el párrafo anterior. Los límites de detección (LOD) se estimaron como la concentración de OTA que da una señal igual a $b+3S_b$, donde b es la ordenada en el origen y S_b es el error estándar de la estimación asumiendo ser el ruido (Miller y Miller 2000), los límites de cuantificación (LOQ) se estimaron como tres veces el LOD.

La cuantificación de la OTA se obtuvo midiendo el área del pico correspondiente al tiempo de retención de la OTA y comparándola con la curva de calibración calculada por las disoluciones estándar. La regresión lineal se aplicó para desarrollar la curva de calibrado, para ello se utilizó el método de regresión lineal por mínimos cuadrados (SPSS versión estándar 11.5 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

6.7 Determinación de ocratoxina A en pan

La extracción y purificación se realizó como se describe en las notas y sugerencias técnicas de Vicam (1999) para el análisis de trigo con alguna pequeña modificación. A partir de 7.5 g de masa o pan finamente molido

con un molinillo de laboratorio se extrajo OTA con 25 ml de acetonitrilo/agua (60:40, v/v) en un agitador de alta velocidad durante 5 min. La suspensión se centrifugó a 6000 rpm durante 6 min y a 4°C. A continuación se añadieron 10 ml del sobrenadante a 40 ml de agua purificada. 10 ml de la disolución se cargaron en una columna de inmunoafinidad y que pasaron a un flujo medio de 1–2 gotas/s. Seguidamente la columna se lavó con 10 ml PBS y después con 10 ml de agua pura y luego se eluyó la micotoxina con 1.5 ml de metanol a una velocidad de 1 gota/s a un vial de 4 ml. El extracto purificado se llevó a sequedad a 45°C bajo una suave corriente de nitrógeno y redisolto en 0.25 ml de fase móvil utilizada en LC.

La separación cromatográfica mediante LC–FLD (Sección 6.3) se llevó a cabo con una columna C₁₈ Phenomenex Gemini® (150 mm de longitud, 4.6 mm diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) conectada a una precolumna C₁₈ Phenomenex Gemini® SecurityGuard (4 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) rellena con la misma fase estacionaria. La columna se mantuvo a temperatura constante de 40°C. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo–agua–ácido acético (44:56:1, v/v/v) a un flujo de 1 ml/min. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 333 y 460 nm, respectivamente y el volumen de inyección fue de 0.1 ml (Medina *et al.* 2005).

La evaluación de la recuperación y límites de detección se realizó en las mismas condiciones que en las descritas en la Sección 6.6.3, pero esta vez, la muestra se contaminó con OTA para obtener una concentración de 5 ng/g.

6.8 Determinación de patulina en zumos y compotas de manzana

Para la obtención del método más apropiado para la determinación de PAT en zumos y compotas de manzana se realizaron diferentes procedimientos que contenían una fase de extracción y otra, posterior, de purificación. Por último, la determinación se realizó mediante LC–UV.

6.8.1 Extracción y Purificación

Se han ensayado los procesos de extracción y purificación, que seguidamente se describen, a muestras de manzana previamente analizadas por métodos oficiales (Arranz *et al.* 2004) para comprobar que estuvieran libres de PAT. Para determinar la recuperación de los distintos procesos estudiados, a las muestras analizadas previamente, se les añadió la alícuota apropiada de una disolución estándar de micotoxina para conseguir una concentración de 0.02, 0.05, 0.1 ó 1.0 mg de PAT/Kg en cada muestra. Las muestras contaminadas permanecieron a 4°C durante toda la noche y posteriormente se llevó a cabo la fase de extracción según se describe en los procedimientos indicados en esta sección.

6.8.1.1 Procedimiento con extracción líquido-líquido- NaHCO_3

El método está basado en el procedimiento llevado a cabo por Iha y Sabino (2006). Las muestras de zumo de manzana se homogenizaron y 5 g de muestra se introdujeron en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía 0.5 g de bicarbonato de sodio y 5 ml de acetato de etilo-hexano (96:4, v/v). El tubo de centrifuga se agitó durante 10 min en un agitador orbital a 250 rpm y posteriormente fue centrifugado durante 3 min a 3000 rpm. 3 ml de la fase orgánica se transfirieron a unos tubos de vidrio que contenían 30 μl de ácido acético, y posteriormente el disolvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Inmediatamente se le añadió 1 ml de AABS y después se agitó la mezcla vigorosamente durante 1 min con la ayuda de un vórtex. Una alícuota de 50 μl se inyectó en el cromatógrafo de líquidos.

6.8.1.2 Procedimiento con SPE con cartucho C18

Está basado en el procedimiento de Li *et al.* (2007). Los cartuchos C_{18} de extracción en fase sólida que se utilizaron se acondicionaron primero con 10 ml de metanol, después con 3 ml de una disolución acuosa al 10% (v/v) de metanol y por último con 10 ml de agua, evitando que la columna se quedara seca. 1 g de muestra con 0.5 ml de la disolución de AABS se transfirió a la columna de SPE y se hizo pasar la muestra diluida a una velocidad de unos 2/3 ml/min con la ayuda de un émbolo. Tan pronto como el disolvente pasó totalmente por el cartucho, se añadieron 5 ml de hexano, siendo estas dos eluciones descartadas. Posteriormente la columna se secó con una corriente de aire durante unos 15 min. A continuación se colocó un tubo de 50 ml con tapón de rosca debajo del cartucho. La columna se eluyó tres veces con 5 ml de una mezcla de hexano-acetato de etilo-acetona con distintas proporciones de los disolventes de la mezcla, en cada alícuota de elución (1:5:4; 1:4:5; 1:3:6; respectivamente). El flujo de cada porción se paraba durante 1 min para permitir un tiempo de contacto suficiente con el relleno de la columna. Posteriormente a la disolución combinada se le añadió 30 μl de ácido acético glacial y seguidamente se dejó secar con la ayuda de una corriente de nitrógeno a 30°C. El residuo se disolvió inmediatamente con 1 ml de AABS y 50 μl se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos.

6.8.1.3 Procedimiento de Arranz modificado

El método está basado en el estudio colaborativo de Arranz *et al.* (2005) con algunas modificaciones: se evitó la adición 2 g de tierra de mar al tubo cónico en el cual se hizo la extracción líquido-líquido y se sustituyó el uso de agua a pH 4 para redissolver el extracto con AABS. Brevemente, a un tubo cónico con tapón de rosca de 50 ml se le añadieron 15 g de Na_2SO_4 y 2 g de NaHCO_3 y se mezclaron. A continuación se añadieron 10 ml de una disolución de acetato de etilo-hexano (60:40, v/v) y se agitó suavemente. Seguidamente 10 g de la muestra se transfirieron al tubo y se agitó vigorosamente con la mano durante unos segundos y después se agitó con un agitador orbital a 250 rpm durante 5 min. Después se centrifugó a

3000 rpm durante 3 min para ayudar a la separación de las fases. Una alícuota de 2.5 ml de la fase orgánica se transfirió a un cartucho SPE de silica gel sin acondicionar y se recogió la elución, a una gota por segundo, en un vial de vidrio que contenía 50 μ l de ácido acético glacial. Inmediatamente, el cartucho se lavó con 3 ml de la disolución de acetato de etilo–hexano (60:40, v/v) para eluir la PAT purificada cuantitativamente de la columna. Los disolventes recogidos se evaporaron con la ayuda de una corriente suave de nitrógeno a 30°C. Una vez secado, se añadió rápidamente 1 ml de AABS, y se agitó el extracto redisolto con un agitador durante al menos 1 min y a continuación se cogieron 50 μ l para ser inyectados en el cromatógrafo de líquidos.

6.8.1.4 Procedimiento de MacDonald

Se aplicó el método indicado por MacDonald *et al.* (2000). Se introdujeron 10 g de zumo en un embudo de decantación de 250 ml. Se añadieron 20 ml de acetato de etilo y se agitó durante 1 min. Se dejaron separar las fases y se pusieron cada una de las fases en dos tubos cónicos distintos. Se volvió a transferir la fase acuosa al embudo de decantación y se reextrajo con otra alícuota de 20 ml de acetato de etilo, volviéndose a separar las dos fases formadas en los dos tubos que se tenían al principio para cada fase y por último se volvió a repetir la extracción de la fase acuosa por tercera vez. Después de haber separado las dos fases, la fase acuosa se descartó. La combinación de los tres extractos de acetato de etilo se introdujeron en el embudo de decantación, y 5 ml de acetato de etilo se añadieron al tubo que contenía el extracto de fase orgánica para enjuagar y posteriormente introducir también, en el embudo de decantación. Se añadieron en el embudo de decantación 4 ml de una disolución de Na_2CO_3 al 1.5% en medio acuoso y se agitó durante 30 s. Se dejaron separar las dos fases. La fase acuosa se dejó en un tubo cónico y la fase orgánica se introdujo a un matraz redondo a través de un filtro de papel que contenía 15 g de sulfato de sodio anhidro. La fase acuosa se transfirió otra vez al embudo de decantación, y seguidamente se enjuagó el tubo cónico con 10 ml de acetato de etilo que se vertieron también al embudo de decantación, que se agitó durante unos segundos. Una vez separadas las dos fases la fase acuosa se eliminó y la fase orgánica se pasó un matraz redondo a través del filtro que contenía sulfato de sodio anhidro y por último el embudo de decantación se lavó dos veces con 10 ml de acetato de etilo que se pasaron también por el filtro con sulfato de sodio anhidro al matraz. El extracto se evaporó en una corriente de nitrógeno y se redisolvió con 1 ml de AABS.

6.8.1.5 Procedimiento con extracción líquido–líquido y NaH_2PO_4

El método fue idéntico al procedimiento con extracción líquido–líquido y NaHCO_3 (Sección 6.8.1.1), pero en este caso en la fase de extracción se sustituyó bicarbonato de sodio, por fosfato monosódico en la misma cantidad.

6.8.1.6 Procedimiento con extracción líquido-líquido y NaH₂PO₄ y SPE de sílica

La primera parte de la extracción sigue los mismos pasos que el procedimiento con extracción líquido-líquido y NaH₂PO₄, hasta la recogida de 3 ml de la fase orgánica (Sección 6.8.1.5). Posteriormente, la alícuota de 3 ml se transfirió a un cartucho SPE de sílica gel sin acondicionar. La elución se recogió a un flujo de una gota por segundo, en un vial de vidrio que contenía 50 µl de ácido acético. Inmediatamente, el cartucho se lavó con 3 ml de la disolución de acetato de etilo-hexano (60:40, v/v) para eluir la PAT purificada cuantitativamente de la columna. Los disolventes recogidos se evaporaron con la ayuda de una corriente suave de nitrógeno a 30°C. Una vez secado, se añadió rápidamente 1 ml de AABS y se agitó el extracto redissuelto con un agitador durante al menos 1 min. Se cogieron 50 µl para ser inyectados en el cromatógrafo de líquidos.

6.8.1.7 Procedimiento extracción líquido-líquido y NaH₂PO₄ y SPE de C₁₈

Las muestras de manzana se homogenizaron y 5 g se introdujeron en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía 1 g de fosfato monosódico, 5 g de sulfato sódico y 5 ml de acetato de etilo-hexano (96:4, v/v). El tubo de centrifuga se mantuvo en un agitador orbital a 250 rpm durante 10 min y posteriormente fue centrifugado durante 3 min a 3000 rpm. 3 ml de la fase orgánica se transfirieron a un tubo de vidrio que contenía 30 µl de ácido acético, y el disolvente se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Inmediatamente se le añadió 2 ml de AABS en dos veces de 1 ml, tras cada adición se transfirió la mezcla a una columna C₁₈ de SPE previamente acondicionada con una mezcla de 5 ml de hexano-acetato de etilo (20:80) y después con 5 ml de agua. El extracto redissuelto se hizo pasar a una velocidad de unos 2/3 ml/min con la ayuda de un émbolo. Tan pronto como el disolvente pasó totalmente por el cartucho, se añadieron 5 ml de hexano y posteriormente se secó con una corriente de aire durante unos 15 min. Estas eluciones se descartaron y el extracto purificado se recogió en un tubo de 10 ml con tapón de rosca mediante la elución con 4 ml de una mezcla de hexano-acetato de etilo (20:80). A continuación, se añadió 30 µl de ácido acético glacial a la muestra eluida y seguidamente se dejó secar con la ayuda de una corriente de nitrógeno a 30°C. El residuo se disolvió inmediatamente con 0.5 ml de AABS y 50 µl del extracto redissuelto se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos.

6.8.2 Determinación de patulina por cromatografía líquida

Tras las etapas de extracción y purificación descritas anteriormente, las muestras se analizaron por cromatografía líquida acoplada a un espectrofotómetro de UV (Sección 6.3). La separación cromatográfica se llevó a cabo de forma idéntica a la indicada en la Sección 2.5.6, párrafos 2° y 3°.

6.8.3 Validación de métodos analíticos

Se determinó la linealidad mediante la utilización de las distintas concentraciones estándar (0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 $\mu\text{g/ml}$) por triplicado. Para ello, se aplicó la regresión lineal por mínimos cuadrados que relaciona las áreas de los picos con respecto a las concentraciones estándar.

Se estableció la precisión y la recuperación de los métodos mediante determinación de PAT en zumo de manzana y puré de manzana, cubriendo el método el intervalo de 0.02 a 1.0 $\mu\text{g/mg}$. La recuperación se determinó por comparación de las respuestas de PAT obtenidas por las muestras de los productos estudiados de la manzana con respecto a las respuestas obtenidas por los estándares de calibración. Se consideraron como aceptables los valores de recuperación entre el 70 y el 105% y de precisión con un valor de RSD inferior al 15%.

La identidad de PAT en muestras contaminadas se confirmó por comparación del espectro de UV del pico eluido al tiempo de retención de la PAT obtenido por una disolución estándar.

Se consideró el LOD como la concentración de PAT que produce una señal igual a $b+3S_b$, donde b es la ordenada en el origen de la curva de calibrado y S_b es el error estándar de la estimación asumiendo ser el blanco, y se consideró a 3 x LOD como el LOQ (Miller y Miller 2000).

7. Estudio de la estabilidad de los tricotecenos tipo B y ocratoxina A en el proceso de elaboración del pan

La dieta alimenticia varía considerablemente según las diferentes zonas geográficas, incluso en un mismo país. La Organización Mundial de la Salud (WHO) presentó un estudio comparativo relacionado con la exposición humana a las micotoxinas entre Europa, Oriente, Latinoamérica y Medio Oriente. Esta comparación demostró que en Europa, aproximadamente el 80% de la ingesta total de DON está asociada al consumo de trigo, sin embargo en Oriente, el trigo y arroz son igualmente importantes como fuente de exposición a dicha toxina (WHO 1998, WHO/FAO 2001b). Un tratamiento efectivo para la eliminación de estas micotoxinas de los productos elaborados a base de cereal es esencial para minimizar la exposición de los humanos a dichas toxinas. Se han utilizado muchos métodos físicos y químicos para reducir la contaminación en los productos alimenticios, como segregación de las semillas contaminadas de las no contaminadas, molienda, limpieza o lavado, cribado, descascarillado u horneado (Abbas *et al.* 1985, Charmley y Prelusky 1994, Osborne *et al.* 1996, Schollenberger *et al.* 2005, Scott 1991, Scudamore *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 1986, Trenholm *et al.* 1991).

Por otro lado se ha constatado un aumento de los hongos micotoxigénicos en algunos procesos de elaboración de derivados de cereales, por ejemplo en el proceso de malteado de la cebada (Hardwick, 1983), que pueden producir micotoxinas que posteriormente contaminan la bebida fermentada (Schwarz *et al.* 1995).

En base a ello, se aborda el séptimo objetivo sobre el estudio del efecto del proceso de panificación. A continuación se detalla la parte experimental de dicho estudio:

7.1 Reactivos y estándares

Los estándares de OTA y tricotecenos, que incluyen NIV, DON, 3-ADON fueron de Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España). Tolueno y bicarbonato de sodio fueron de Panreac (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Barcelona, España). Acetonitrilo, metanol se obtuvieron en J.T. Baker (Deventer, Holanda). Todos los disolventes fueron de grado HPLC. Óxido de aluminio 90 estandarizado (0.063–0.2 mm tamaño de partícula) de Merck (Darmstadt, Alemania). Carbón activo (Norit) de Fluka (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España). Filtros de microfibras de vidrio (GF/C) y papel de filtro (Whatman No. 4) de Whatman (Maidstone, UK). Anhídrido pentafluoropropiónico (PFFA) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) de Sigma. Material para extracción en fase sólida C₁₈ de Waters (Milford, MA, EEUU). Columna de purificación de inmunoafinidad OchraTest® de Vicam (Vicom Science Technology, Watertown, MA, EEUU). Tampón salino de fosfato (PBS) se preparó con cloruro de potasio (0.2 g, Panreac), fosfato de potasio dihidrógeno (0.2 g, Sigma), fosfato de disodio anhidro (1.16 g,

Panreac) y cloruro de sodio (8.0 g, J.T. Baker) en 1 l de agua pura, el pH se ajustó a 7.4. Agua pura se obtuvo de un aparato de Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EEUU) y se utilizó cuando fue necesaria. Levadura de panificación se adquirió en la CECT (*Saccharomyces cerevisiae* cepa CECT1925), y se almacenó a 4°C.

Harina de trigo libre de las toxinas, se suplementó con de DON y 3-ADON (200, 750 y 1500 µg/Kg); NIV (200, 500, 1000 µg/Kg); y OTA (2, 5 y 10 µg/Kg). Después de la homogenización de las toxinas en la harina, la harina de trigo contaminada se empleó para la elaboración de la masa del pan.

7.2 Preparación de disoluciones estándar

Cada estándar de NIV, DON, 3-ADON se disolvió en acetonitrilo a una concentración de 1.0 mg/ml y fue almacenado hasta su uso a -20°C en un vial sellado. Los estándares de trabajo (10.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 y 0.02 µg/ml) se prepararon con la apropiada disolución de volúmenes conocidos de la solución stock con acetonitrilo y fueron utilizados para obtener las curvas de calibración previa derivatización e inyección en el sistema cromatográfico.

Se preparó el estándar de OTA a partir de una solución stock de 500 mg/l que se preparó disolviendo 1 mg de OTA en 2 ml de tolueno-ácido acético (99:1, v/v). Una serie de estándares de trabajo se prepararon por evaporación de conocidas alícuotas de la solución stock y se disolvieron en la misma fase móvil empleada posteriormente en el sistema cromatográfico.

7.3 Proceso de contaminación de las muestras

La harina de trigo utilizada en los experimentos se adquirió en el comercio y se analizó previamente para determinar la posible presencia de OTA y tricotecenos tipo B. Parte de la harina de trigo se contaminó con 2, 5, y 10 µg de OTA/Kg, 200, 750 y 1500 µg de DON y 3-ADON/Kg y 200, 500 y 1000 µg de NIV/Kg por adición de volúmenes apropiados de disoluciones estándar de las micotoxinas. A continuación se homogenizó y después de la evaporación de los disolventes se empleó para preparar la masa. De las posibles combinaciones de concentración de las diferentes micotoxinas que se podían ensayar se utilizaron estas tres combinaciones:

- a) 2 µg de OTA/Kg, 200 µg de DON/Kg, 200 µg de 3-ADON/Kg y 200 µg de NIV/Kg;
- b) 5 µg de OTA/Kg, 750 µg de DON/Kg, 750 µg de 3-ADON/Kg y 500 µg de NIV/Kg y
- c) 10 µg de OTA/Kg, 1500 µg de DON/Kg, 1500 µg de 3-ADON/Kg y 1000 µg de NIV/Kg.

7.4 Preparación de la masa y horneado del pan

La masa se preparó con la harina de trigo contaminada, descrita en el apartado anterior, levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae* cepa CECT1925 de la CECT), agua y cloruro sódico (50:2:30:1, p/p/p/p). Primero se mezclaron los ingredientes secos, luego se humedeció con agua y, finalmente se incorporó la levadura (como suspensión en agua). La masa se mezcló manualmente hasta que estuviera bien ligada con un aspecto y un grado óptimo, no pegajoso, liso y satinado. El peso medio de cada pieza de masa sin fermentar con forma redondeada fue de 83 g. El tamaño de las piezas fue unos 10 cm de diámetro por 6 cm de altura.

La masa se fermentó a 30°C, cubierta con un paño húmedo durante una hora. Las muestras de masa fermentada se guardaron a -20°C hasta el momento de la determinación de las micotoxinas. Las piezas de masa fermentada destinadas al horneado, se introdujeron en un horno eléctrico (Gallur, Valencia, España) y se sometieron a los siguientes tratamientos

- a) 190°C durante 50 min.
- b) 207°C durante 40 min.
- c) 223°C durante 35 min.
- d) 240°C durante 30 min.

Estas combinaciones de temperatura/tiempo se eligieron teniendo en cuenta los procedimientos habituales de cocción del pan. Las muestras de pan correspondientes a cada tratamiento se prepararon y analizaron por triplicado.

7.5 Determinación de tricotecenos

El proceso de extracción, purificación, derivatización y determinación por GC-ECD de los tricotecenos tipo B en la masa fermentada y en el pan se realizó de la misma manera que la descrita en la sección 6.5.

7.6 Determinación de ocratoxina A

La determinación de ocratoxina A en la masa fermentada y en el pan se llevó a cabo mediante el proceso indicado en la sección 6.7.

7.7 Estadística

El análisis de la varianza (ANOVA) se llevó a cabo mediante el paquete informático SPSS ver. 14.0.2 (SPSS inc. Chicago, Illinois, EEUU).

8. Método de multidetección de micotoxinas mediante LC–MS en harina de trigo.

La importancia de la puesta a punto de métodos de multidetección de micotoxinas estriba en el hecho de que no sólo diferentes micotoxinas se pueden encontrar simultáneamente en un mismo sustrato, en este caso en el trigo, sino en la certeza de que existen efectos sinérgicos entre micotoxinas que potencian la actividad tóxica de cada una de ellas por separado. La correcta evaluación del peligro de la presencia de micotoxinas en una muestra, requiere la determinación de todas las micotoxinas presentes en la misma. La combinación analítica de varias micotoxinas sólo es posible si estas micotoxinas poseen unas propiedades fisicoquímicas similares y por tanto, pueden ser extraídas, purificadas y detectadas en un mismo proceso analítico. Debido a esto, ningún método ofrece las prestaciones que se pueden conseguir mediante el empleo de sistemas de cromatografía acoplados a detectores de espectrometría de masas debido a la capacidad de identificar simultáneamente un alto número de toxinas. Además, la selectividad del detector podría eliminar el paso de purificación en el procedimiento (Pierard *et al.* 2004, Ren *et al.* 2007, Sulyok *et al.* 2006).

Para la realización del trabajo relacionado con la consecución del octavo objetivo, el material y los métodos usados son los que se indican a continuación:

8.1 Reactivos y estándares

Los estándares de OTA, OTB, ZEA y tricotecenos tipo A y B que incluyen NIV, DON, 3-ADON, DAS, T-2 y HT-2 y las aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 de Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España). Acetonitrilo, metanol, acetona, ácido fórmico y ácido acético (grado LC) de J.T. Baker (Deventer, Holanda). Acetato de amonio de Panreac (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Barcelona, España). El agua pura se obtuvo de un aparato Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, MA, EEUU) y se usó cuando se necesitó. Microfiltros de teflón de 0.22 µm de Whatman (Maidstone, Reino Unido).

8.2 Preparación de disoluciones estándar

Cada estándar de NIV, DON, 3-ADON, DAS, T-2, HT-2, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y ZEA se disolvió en acetonitrilo a una concentración de 1.0 mg/ml y se almacenó hasta su uso en un vial sellado a -20°C. Los estándares de trabajo se prepararon con la disolución apropiada de volúmenes conocidos de la disolución stock con una disolución de metanol-agua (50:50, v/v) y se utilizaron para obtener las curvas de calibración después de inyectarlos en el sistema cromatográfico.

Los estándares de OTA y OTB se prepararon a partir de una solución stock de 500 mg/l que se preparó disolviendo 1 mg de OTA o OTB en 2 ml de tolueno-ácido acético (99:1, v/v). Una serie de estándares de trabajo se prepararon por evaporación de alícuotas conocidas de la disolución stock que posteriormente se disolvieron con el volumen apropiado de una mezcla metanol-agua (50:50, v/v).

8.3 Extracción

Se introdujeron 0.25 g de harina de trigo, comprobada previamente de estar libre de micotoxinas, en un tubo de rosca de 2 ml. Posteriormente se añadieron 1.5 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v). A continuación, la mezcla se agitó en un Vórtex durante 30 min, después se centrifugó a 10000 rpm durante 3 min. Una vez centrifugado, se recogió 1 ml del sobrenadante y se guardó a -20°C hasta su análisis por LC-MS.

8.4 Análisis por cromatografía líquida y espectrometría de masas

8.4.1 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de simple cuadrupolo y trampa de iones

8.4.1.1 Sistema cromatográfico

El sistema LC consistió en una bomba Agilent 1100 y un inyector automático Agilent 1100, se utilizó el *software* Chemstation, versión A.10.02 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) para controlar el sistema y procesar las señales. La separación cromatográfica se realizó con 20 µl de la muestra, filtrada previamente con un microfiltro de 0.22 µm, de acuerdo con las siguientes opciones:

a) En el caso de la utilización del espectrómetro de masas con trampa de iones, se utilizó una columna C₁₈ Phenomenex Gemini® (150 mm de longitud, 4.6 mm diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) conectada a una precolumna C₁₈ Phenomenex Gemini® SecurityGuard (4 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) rellena con la misma fase estacionaria, a temperatura ambiente. Como fase móvil se utilizó una variación de una mezcla de disolventes con respecto al tiempo. Como fase móvil A se utilizó una disolución acuosa de ácido acético al 1% y como fase móvil B, metanol. La variación de disolventes fue la siguiente: inicialmente 90% de A que se mantuvo durante 3 min, después se hizo una variación lineal durante 3 min hasta 70% de A. Seguidamente, se modificó la proporción de disolventes con otro gradiente lineal durante 4 min hasta un 50% de A que se mantuvo constante durante 5 min. Por último, se llevó a 1% de A en un min y se mantuvo durante otros 5 min para volver a las condiciones iniciales transcurrido 1 min. El flujo utilizado fue de 1 ml/min. Para la ionización en modo APPI la fase móvil, tanto de A como de B, contenía acetona al 0.2%.

b) En el caso de la utilización del espectrómetro de masas con simple cuadrupolo, se efectuó la separación cromatográfica con una columna C₁₈ Phenomenex Luna® (250 mm de longitud, 4.6 mm diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula), a temperatura ambiente. Para la fase móvil, se utilizó una mezcla de disolventes que variaban en función del tiempo. Como fase móvil A se utilizó una disolución acuosa de ácido fórmico al 1% y como fase móvil B, metanol también con 1% de ácido fórmico. La variación de la fase móvil durante el tiempo fue la siguiente: se empezó con un 60% de A, inmediatamente se hizo una variación lineal durante 10 min hasta llegar a un 10% de A, que se mantuvo constante durante 15 min, a continuación se modificó la proporción de disolventes con otro gradiente lineal durante 0.5 min hasta un 99% de A, que se mantuvo constante durante 3.5 min. Para finalizar se volvieron a las condiciones iniciales en un periodo de tiempo de 1 min. El flujo fue constante a 0.5 ml/min durante todo el análisis cromatográfico.

8.4.1.2 Detección por espectrometría de masas

Se utilizaron varios sistemas de espectrometría de masas para la determinación de micotoxinas:

a) Se utilizó un sistema de espectrometría de masas con una fuente ESI y analizador de trampa de iones Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: presión del gas nebulizador 40 psi, temperatura de la fuente 350°C, velocidad de flujo del gas 8 l/min. El voltaje del capilar varió en función de la masa del ión m/z seleccionado para cada micotoxina (también denominada masa diana). Se trabajó tanto en modo ión negativo como en modo ión positivo. El máximo de cuentas cargadas en la trampa de iones fue de 75000 y el tiempo máximo de adquisición de iones de 300 ms. Se usó nitrógeno como nebulizante y gas de secado (Gaslab NG LCMS 20 generator; Equicien, Madrid, España).

b) Se utilizó, también, el mismo sistema de espectrometría de masas con trampa de iones pero con una fuente APPI (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las mismas que en el caso anterior, pero además, la temperatura del vaporizador fue de 275°C, y sólo se trabajó en modo ión positivo.

c) Por otro lado, se utilizó un sistema de espectrometría de masas de simple cuadrupolo HP 1100 series con una fuente API-ES (Hewlett Packard, Palo Alto, EEUU). Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: presión del gas nebulizador 30 psi, temperatura de la fuente 350°C, velocidad de flujo del gas 13 l/min, voltaje del capilar 4.0 kV. Se trabajó en modo ión positivo, utilizándose primeramente en modo SCAN para la adquisición de iones en un intervalo de 200–500 m/z y poder determinar el tiempo de retención de cada micotoxina. Posteriormente se trabajó en modo SIM para la determinación selectiva de las micotoxinas.

8.4.2 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Se utilizaron dos sistemas de espectrometría de masas de triple cuadrupolo, uno convencional, y otro en el que se aportan las últimas tecnologías actuales en análisis por cromatografía líquida y detección por espectrometría de masas que se denominará de “última generación”.

8.4.2.1 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de triple cuadrupolo

El sistema cromatográfico estuvo compuesto por una bomba binaria Shimadzu LC-10AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) el cual permitía un flujo constante de 0.3 ml/min de la fase móvil y un inyector automático Shimadzu SIL-10AS con el que se introdujo un volumen de inyección de 20 µl de muestra. Como fase móvil se utilizó una mezcla de dos disolventes que variaban durante el tiempo. La fase móvil A fue una disolución acuosa con ácido fórmico al 0.5% y como fase móvil B metanol también con 0.5% de ácido fórmico. La variación de la fase móvil durante el tiempo fue la siguiente: se empezó con un 60% de A durante 5 min, a continuación se realizó un decrecimiento en el porcentaje de A hasta un 10% durante 2 min, seguidamente se alcanzó un porcentaje del 2% de A mediante otra disminución lineal de A en 8 min que posteriormente se mantuvo constante durante 10 min. Después se volvieron a las condiciones iniciales en 0.5 min. La columna de separación utilizada fue una columna C₁₈ Teknokroma Mediterranea Sea18 (50 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interior, 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Sant Cugat del Valles, Barcelona, España) a temperatura ambiente.

Se utilizó un sistema de espectrometría de masas de triple cuadrupolo Waters Micromass Quattro™ (Waters, Beverly, MA, EEUU) equipado con una fuente de ionización ESI con las siguientes condiciones: voltaje del capilar 3.5 kV, *skimmer* 2 V, lentes RF 0.5 V, temperatura de la fuente 120°C, temperatura de desolvatación a 150°C, flujo del gas de desolvatación a 8 l/min. La adquisición de espectros se realizó operando en modo ionización positiva y negativa por monitorización de reacción múltiple (MRM).

8.4.2.2 Cromatografía líquida y espectrometría de masas de triple cuadrupolo de última generación

El sistema consistió en un cromatógrafo UPLC® Acquity (Waters Corporation, Manchester, Reino Unido) acoplado a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo Waters Tandem Quadrupole Detector (TQD) de Waters. El software utilizado fue MassLynx™ 4.1.

En el sistema cromatográfico, el flujo de la fase móvil permaneció constante a 0.3 ml/min y el volumen de inyección de muestra introducido en el cromatógrafo fue de 20 µl. Como fase móvil se utilizó una mezcla de dos disolventes que variaban durante el tiempo. La fase móvil A consistió en

H₂O (NH₄Ac 0.5 mM, 0.01% de ácido fórmico) y la B en MeOH (NH₄Ac 0.5 mM, 0.01% de ácido fórmico). El método cromatográfico comenzó con 10% de B en la fase móvil y se fue modificando la mezcla de la fase móvil de forma lineal hasta alcanzar un 90% de B en 5 minutos, posteriormente se volvieron a las condiciones iniciales en 0.2 minutos. La columna de separación utilizada fue una columna C₁₈ Bridged Ethyl Hybrid UPLC Acquity (50 mm de longitud, 1.0 mm de diámetro interior, 1.7 μm de tamaño de partícula) (Waters Corporation, Manchester, Reino Unido) y se trabajó a temperatura ambiente.

El sistema de espectrometría de masas de triple cuadrupolo estuvo equipado con una fuente de ionización ESI en las siguientes condiciones: voltaje del capilar 3.5 kV, temperatura de la fuente 120°C, temperatura de desolvatación a 400°C, gas de desolvatación 13 l/min. La adquisición de espectros se realizó operando en modo MRM positivo y negativo.

8.5 Tratamiento de datos

Para todos los casos, los espectros de masas de las micotoxinas estudiadas se registraron y determinaron previamente, para cada sistema de espectrometría, por infusión directa a un flujo de 0.5 ml/h utilizando una jeringa de 1 ml (Agilent Technologies) y un dispensador automático (KD Scientific, Holliston, MA, EEUU). Para optimizar los parámetros para cada compuesto se utilizaron disoluciones estándar de 10 mg de micotoxina/l en una disolución de metanol-ácido acético-agua (49:1:50, v/v/v).

La cuantificación de las micotoxinas se realizó midiendo el área del pico en el tiempo de retención de las distintas toxinas y comparándose con la curva de calibrado calculada por las soluciones estándares de cada micotoxina. La determinación del límite de detección (LOD) se estimó como la concentración de los diversos metabolitos dando una señal igual a $b+3S_b$, donde b es la ordenada en el origen y S_b es el error estándar de la estimación, asumiendo ser el ruido (Miller y Miller 2000).

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la micobiota presente en trigo y manzana

1.1 Micobiota del trigo

En el estudio de la micobiota presente en las muestras de trigo, fue relativamente elevada la incidencia del género *Fusarium*. En este género, destacan por su importancia en la potencial producción de tricotecenos tipo B, la especie *F. graminearum* que se detectó en un 40% de las muestras analizadas y la especie *F. culmorum* que se encontró en el 18% de las muestras (Tabla 9). En cuanto a las especies descritas como productoras de NIV (Bottalico y Perrone 2002), fueron *F. poae* y *F. cerealis* las que se aislaron, aunque tan sólo se detectaron en un 3% de las muestras de trigo analizadas.

Recientemente se ha descrito, para diversos alimentos y bebidas, que el origen de la OTA se debe a la presencia de especies del género *Aspergillus* (Belli *et al.* 2004, Burdaspal y Legarda 1999, Jorgensen 1998, Scott y Kanhere 1995, Trucksess *et al.* 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las especies de este género que se aíslan con mayor frecuencia en trigo son *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* que se presentaron en el 100% de las muestras analizadas, seguidas por las especies *A. fumigatus*, *A. glaucus* y *A. secc. Circumdati* con un porcentaje de muestras contaminadas del 52%, 39% y 27% respectivamente. Las especies de *Aspergillus* que se presentaron con menor frecuencia en las muestras fueron *A. candidus* y las integrantes de la sección *Nigri* de *Aspergillus* (Tabla 9). De entre estas especies, cabe destacar por su potencial capacidad de producir ocratoxinas, las de *A. secc. Circumdati*, especies típicamente productoras, y diferentes especies de la sección *Nigri* encontrándose entre ellas, *A. carbonarius*, que aun produciendo cantidades moderadas de OTA, se ha descrito un amplio porcentaje de aislados de la misma que producen la toxina (Abarca *et al.* 2003, Medina *et al.* 2005).

En el estudio realizado en este trabajo, también se encontraron, otros géneros destacando entre ellos: *Rhizopus* y/o *Mucor*, *Penicillium*, y *Alternaria*. El porcentaje de muestras contaminadas con *Alternaria* spp. fue del 94 % y del 21% para *Helminthosporium* spp. De las diferentes especies de estos géneros, hay que destacar la especie *Penicillium verrucosum* debido a que puede producir OTA en climas templados (Elmholt 2002), a pesar de que en este trabajo se ha observado, que es muy baja la frecuencia con la que se presenta esta especie en el trigo comercializado en España.

Por otra parte, para evaluar cuantitativamente la incidencia de los diferentes hongos en las muestras, se calculó el porcentaje de granos totales contaminados (Tabla 9). Se observó que el género *Alternaria* fue el que se presentó con mayor asiduidad con un 26.3% de los granos contaminados. A continuación le siguió el género *Aspergillus* que se presentó en un 16.8% de los granos, siendo las especies *A. flavus* / *A. parasiticus* las que

mostraron mayor porcentaje de granos infectados con una incidencia del 14.4%, siendo este valor importante debido a que estas especies se aislaron en el 100% de las muestras. El resto de especies, se presentaron con frecuencias que oscilaron entre el 15.8% y el 0.4% de los granos, destacando por su importancia en la producción de OTA el porcentaje de 0.8 y 1.8% de las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* y *A. secc. Circumdati*, respectivamente. Autores como Accenci *et al.* (2004) también han determinado la incidencia de *Aspergillus* spp en 117 muestras de cereales. Los resultados difieren de los obtenidos en este estudio. Ellos aislaron *Aspergillus* spp. en el 57.3% de las muestras que correspondían al 1.7% del total de la población fúngica encontrada en las semillas.

Tabla 9. Incidencia de hongos en trigo comercializado en España.

Hongos aislados	Muestras estudiadas (n=237)		Porcentaje granos infectados (%)
	Nº muestras positivas	Porcentaje positivas (%)	
<i>Fusarium</i> spp.	122	51	13.9
<i>F. graminearum</i>	94	40	10.9
<i>F. avenaceum</i>	65	27	5.9
<i>F. culmorum</i>	43	18	5.0
<i>F. tricinctum</i>	29	12	3.7
<i>F. equiseti</i>	28	12	6.1
<i>F. poae</i>	7	3	0.7
<i>F. cerealis</i>	8	3	0.8
Otras especies de <i>Fusarium</i>	15	6	0.5
<i>Aspergillus</i> spp.	237	100	16.8
<i>A. glaucus</i>	92	39	1.2
<i>A. secc. Nigri</i>	35	15	0.8
<i>A. flavus</i> / <i>A. parasiticus</i>	237	100	14.4
<i>A. secc. Circumdati</i>	64	27	1.8
<i>A. candidus</i>	56	24	2.2
<i>A. fumigatus</i>	124	52	2.0
<i>Penicillium</i> spp.	208	88	7.5
<i>Alternaria</i> spp.	223	94	26.3
<i>Mucorals</i>	210	89	15.8
<i>Helminthosporium</i> spp.	50	21	0.4

Entre las 14 especies de *Aspergillus* que encontraron cabe destacar, por ser especies potencialmente productoras de OTA, las de *A. secc. Circumdati* y *A. niger* var. *niger* que presentaron una incidencia del 2.5% y 8.8%, respectivamente.

En el caso de las especies de *Fusarium* potencialmente productoras de tricotecenos tipo B, la que contaminó mayor número de granos fue *F. graminearum* con un 10.9%, siendo además la especie que presentó mayor número de muestras contaminadas. *F. culmorum*, *F. poae* y *F. cerealis*, descritas también como productoras de tricotecenos, se encontraron en un 5.0%, 0.7%, y 0.8% de los granos infectados, respectivamente. Otras especies de *Fusarium* como *F. equiseti* o *F. tricinctum* se aislaron en un porcentaje de granos del 6.1% y 3.7%, respectivamente. Los mucorales mostraron un nivel de granos contaminados de 15.8%, mientras que *Penicillium* presentó un 7.5% y en menor medida, en un 0.4% de los granos, se aisló *Helminthosporium* spp.

Otros autores, han determinado el porcentaje de muestras de trigo infectadas por el género *Fusarium*, como Moreno–Contreras *et al.* (2000) que realizó un estudio sobre 50 muestras de trigo de Venezuela, siendo las principales especies de mohos aisladas *F. poae*, en un 7.8% de las muestras, *F. sporothrichioides*, en un 7.8%, *F. acuminatum* en un 7.8%, *F. tricinctum* en un 5.2% y por último *F. solani* en un 5.2%. Al contrario que en este trabajo, estos autores encontraron niveles de contaminación en trigo con las especies *F. graminearum*, *F. avenaceum* o *F. culmorum* menores a los detectados aquí. Sin embargo Grabarkiewicz–Szczesna *et al.* (2001) determinaron en 1993 en Polonia que el 81% de las 25 muestras de trigo de invierno estudiadas estaban infectadas con *Fusarium* spp, siendo *F. graminearum* la especie predominante que se presentó en un 42% de las muestras, mientras que *F. nivale*, *F. poae*, *F. avenaceum* y *F. culmorum* se encontraron en un 35%, 35%, 31% y 12%, respectivamente, siendo estos valores superiores a los obtenidos en el presente estudio.

En otros lugares del mundo como en Népal, Desjardins *et al.* (2000), estudiaron 27 muestras de trigo y encontraron que 15 de ellas estaban infectadas por *F. graminearum*, 2 por *F. acuminatum*, 6 por *F. avenaceum*, 1 por *F. chlamydosporum*, 14 por *F. equiseti*, 8 por *F. oxysporum*, 5 por *F. semitectum*, y 3 por *F. torulosum*. Al igual que en nuestro trabajo, detectaron que la especie predominante era *F. graminearum* aunque con una incidencia ligeramente superior. En el presente trabajo también se observan especies como *F. equiseti* o *F. avenaceum*, sin embargo especies como *F. oxysporum*, detectada por estos autores, no aparecen en nuestro estudio con tanta frecuencia.

En otros países como Polonia, Czerwiecki *et al.* (2002a, 2002b), también determinaron la incidencia de hongos en 200 muestras de cereal durante 1997 y 1998. Entre los resultados obtenidos se encontraron cepas de *Penicillium* (género en la que alguna de las especies es conocida de producir OTA) que se aislaron en un 93% y 71% de las muestras del respectivo año; siendo valores similares a los obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo para cepas de *Aspergillus* (género en las que también son

conocidas especies productoras de esta micotoxina) se dieron valores inferiores a los obtenidos en este trabajo, ya que sólo se encontraron en un 7% y un 28% para cada año de estudio.

También se ha estudiado la incidencia de hongos en otros tipos de cereal como muestras de sorgo. En un estudio realizado en Brasil donde se analizó la micobiota presente en cereales desde la recolección hasta un año después. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de hongos en todas las muestras analizadas (10 muestras de grano recién cosechadas y 130 muestras procedentes de almacenes). Los géneros aislados, nombrados en orden decrecientemente a su presencia en el grano fueron: *Phoma* (57.1%), *Aspergillus* (42.7%), *Fusarium* (25.0%), *Rhizopus* (21.4%), *Mucor* (17.7%), *Curvularia* (14.3%), *Helminthosporium* (13.5%), *Penicillium* (10.0%), *Nigrospora* (8.6%), *Dreschlera* (7.1%), *Cladosporium* (6.4%), *Alternaria* (0.7%), y *Cephalosporium* (0.7%) (da Silva *et al.* 2000). Cabe indicar que los géneros como *Aspergillus*, *Alternaria* y *Penicillium* aparecen en un porcentaje inferior al hallado en nuestro estudio, esto es debido posiblemente a la variedad de cereal y a la diferente localización geográfica de las muestras.

En relación con la variabilidad de los distintos géneros en función del origen geográfico de las muestras, se han encontrado diferencias en la micobiota según la procedencia de las muestras. Dependiendo de su origen, las muestras estuvieron contaminadas con *Alternaria* spp. entre el 92% y el 98% (Tabla 10) y el porcentaje de semillas infectadas osciló entre el 18.7% y 28.9% (Tabla 11).

Tabla 10. Porcentaje de muestras de trigo contaminadas con hongos en diferentes regiones de España.

	Origen geográfico de las muestras				
	Castilla La Mancha	Rioja	País Vasco	Castilla-León	Total
Hongo	n=112	n=21	n=37	n=67	n=237
<i>Alternaria</i> spp.	92%	98%	95%	97%	94%
<i>Aspergillus</i> spp.	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Penicillium</i> spp.	92%	79%	57%	100%	88%
<i>Fusarium</i> spp.	52%	43%	74%	38%	51%
<i>Rhizopus</i> / <i>Mucor</i> spp	92%	85%	73%	94%	89%

n = número de muestras analizadas.

La distribución de las diferentes especies de *Aspergillus* varió con el origen geográfico de las muestras. Los cereales procedentes del País Vasco y Castilla La Mancha mostraron los mayores niveles de granos infectados con unos valores respectivos de 33.8 y 20.5%.

Las muestras de Castilla la Mancha tuvieron los niveles más altos de infección de las semillas por *Penicillium* spp. con un 8.5% (Tabla 11). Sin embargo, *P. verrucosum* Dierckx se aisló ocasionalmente.

Fusarium spp. mostraron una distribución irregular en las muestras de trigo estudiadas dependiendo de su procedencia, es probable, que la humedad de cada región de origen tenga un importante efecto en la colonización de los granos por *Fusarium* spp. Las especies de este género se detectaron en cerca del 74% de las muestras del País Vasco (Tabla 10), esto puede ser debido a las frecuentes precipitaciones y alta humedad relativa que suele darse en esa zona. Sin embargo, el nivel medio de *Fusarium* spp. en los granos infectados, considerando todas las muestras estudiadas, fue menor (13.9%) (Tabla 11). Así, en este estudio, con la excepción de alguna zona localizada, las especies de *Fusarium* en trigo no fueron de las más relevantes.

Tabla 11. Porcentaje de semillas infectadas con hongos en muestras de trigo de diferentes regiones de España.

	Origen geográfico de las muestras				
	Castilla La Mancha	Rioja	País Vasco	Castilla-León	Total
Hongo	n=112	n=21	n=37	n=67	n=237
<i>Alternaria</i> spp.	28.1%	22.0%	18.7%	28.9%	26.3%
<i>Aspergillus</i> spp.	20.5%	4.7%	33.8%	4.9%	16.8%
<i>Penicillium</i> spp.	8.5%	4.5%	5.6%	7.8%	7.5%
<i>Fusarium</i> spp.	15.7%	8.4%	27.4%	5.3%	13.9%
<i>Rhizopus</i> / <i>Mucor</i> spp	17.8%	20.0%	33.5%	1.4%	15.8%

n= número de muestras analizadas.

1.2 Micobiota de la manzana

El estudio de la micobiota relacionada con la manzana mostró que *Alternaria* fue el género que presentó una mayor incidencia con un 61.5% de las muestras contaminadas (Tabla 12), a continuación, le siguió el género *Penicillium* con un 54% de las muestras contaminadas. En este último género, cabe destacar por la potencial capacidad de producir PAT la especie *P. expansum* que se aisló en un 42.5% de las muestras contaminadas. Hay que indicar, que la mitad de las muestras presentaron síntomas de podredumbre por lo que los porcentajes encontrados pueden ser mayores a los que se obtendrían si la manzana estuviera completamente sana. Por último, se encontró una baja incidencia de *Aspergillus* spp. y *Mucor/Rhizopus* spp. con un 7 y 5%, de las muestras contaminadas, respectivamente.

Hasan (2001) realizó un estudio sobre la micobiota en manzanas sanas y podridas en Egipto, los resultados obtenidos fueron diferentes según el estado de la manzana. En las muestras de manzanas sanas, *Aspergillus* spp. se aisló en el 100% de ellas, el 50% estuvieron contaminadas con *Penicillium* spp. y el 50% con *Rhizopus* spp. Sin embargo en el caso de manzanas con síntomas de podredumbre, se observó que las muestras estaban contaminadas en el 100% de *Aspergillus* spp, el 53% de *Penicillium*

spp. y el 58% de *Rhizopus* spp., además aparecieron nuevos géneros como: *Alternaria*, *Fusarium* y *Cladosporium* con una incidencia de muestras contaminadas del 40%, 17% y 25%, respectivamente. La principal diferencia, con respecto a los datos obtenidos en nuestro trabajo, está en la gran incidencia de los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus* encontrados por este autor.

Tabla 12. Número y porcentaje de muestras de manzana contaminadas con hongos en España.

Hongos aislados	Número de muestras contaminadas	Porcentaje de muestras contaminadas
	Positivas/analizadas	(%)
<i>Fusarium spp.</i>	37 / 200	18.5
<i>Aspergillus spp.</i>	14 / 200	7.0
<i>Penicillium spp.</i>	108 / 200	54.0
<i>P. expansum</i>	85 / 200	42.5
<i>Alternaria spp.</i>	123 / 200	61.5
<i>Mucor / Rhizopus</i>	10 / 200	5.0

En España, algunos autores han estudiado la microbiota contaminante de la manzana resistente a distintos fungicidas como el tiabendazol. El porcentaje encontrado de cepas de *Penicillium* spp. resistentes fue de un 64.8%, de cepas de *Alternaria*, 30.6%, de cepas de *Trichoderma*, 2.3% y en menor medida de cepas de *Mucor* y *Rhizopus* con un 1.4% y 0.9% respectivamente. Sin embargo, en el caso de manzanas tratadas con imazalil, el porcentaje de cepas resistentes fueron 90.4% de *Penicillium*, 6.2% de *Alternaria*, seguidas en menor medida por los géneros *Mucor*, *Rhizopus* y *Trichoderma* con un 1.5%, 1.1% y 0.8% de cepas resistentes respectivamente (Viñas *et al.* 1991).

Otros autores como Amin y Bompeix (2005) realizaron un estudio sobre la evolución de las diferentes especies de *Penicillium* en la superficie de la manzana durante un cierto período de almacenamiento y en distintos lugares de Francia. Los resultados indicaron que la especie predominante era *P. expansum* con niveles que oscilaban entre un 30.5–62.6% sobre el total de especies de *Penicillium*, según el tiempo y lugar de almacenamiento. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en este trabajo, ya que también la especie mayoritaria fue *P. expansum*. Resultados similares obtuvieron Sanderson y Spotts (1995) en Oregon y Washington en la determinación de la microbiota de tanques de agua que habían contenido manzanas y peras. Encontraron que la especies mayoritarias de *Penicillium* eran *P. expansum* y *P. solitum* con una incidencia en las muestras de entre 65.2–76.9% y 53.8–95.6, respectivamente. Sin embargo, si los aislados se obtenían de una zona podrida, la especie predominante era *P. expansum* (61.3–100% con

respecto a todos los aislados encontrados de *Penicillium*). Según estos resultados, los autores indicaron que la diversidad de especies encontradas en fruta era relativamente baja, siendo, *P. expansum* la especie que mayoritariamente infectaba a las manzanas y peras, seguida por *P. solitum*. Además indicaron que este nivel de diversidad era considerablemente menor que la incidencia encontrada en peras y manzanas en Polonia (Borecka 1977), pero similar a la obtenida en manzanas y peras en Israel (Barkai–Golan 1974). Estos datos, también concuerdan con los obtenidos por Viñas *et al.* (1991) que indicaron que el 72.9 y el 82% de los aislados de *Penicillium* encontrados en manzanas tratadas con tiabendazol e imazalil, respectivamente, eran de *P. expansum*.

2. Estudio crítico y puesta a punto de métodos cromatográficos para la determinación de ocratoxinas, tricotecenos B y patulina en cultivos *in vitro* de las especies fúngicas productoras.

La determinación de las distintas micotoxinas contaminantes de trigo y manzana también pueden llevarse a cabo en otros medios de cultivo cuando lo que se pretende es la caracterización de los aislados fúngicos productores de micotoxinas. Con esta finalidad, fue necesario desarrollar un método analítico apropiado para cada micotoxina ensayada y medio de cultivo estudiado. Para cada método seleccionado se determinaron los límites de detección, los valores de recuperación y la linealidad de la señal analítica en función de la concentración de micotoxina. La cuantificación de las micotoxinas se calculó midiendo el área del pico en el tiempo de retención correcto y comparándola con la curva de calibración obtenida a partir de las distintas disoluciones estándar para cada micotoxina. La regresión lineal se aplicó para desarrollar la curva de calibrado, para ello se utilizó el método de regresión lineal por mínimos cuadrados (SPSS versión estándar 11.5 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Los límites de detección (LOD) se estimaron como la concentración de OTA que da una señal igual a $b+3S_b$, donde b es la ordenada en el origen y S_b es el error estándar de la estimación asumiendo ser el ruido (Miller y Miller 2000), los límites de cuantificación (LOQ) se estimaron como tres veces el LOD.

El método analítico propuesto para la determinación de micotoxinas en el cultivo de grano de trigo (Sección Experimental 2.5.1 y 2.5.3) a permitido obtener los parámetros analíticos anteriormente indicados. El límite de detección para la OTA fue de 0.011 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras los límites de detección para el grano de trigo para NIV, DON, 3-ADON y 15-ADON fueron respectivamente de 18, 7, 12 y 11 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Por otro lado, el valor de recuperación encontrado en grano de trigo contaminado con OTA (1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) fue de 72.4% y las recuperaciones obtenidas para el grano de trigo contaminado con 1 mg/Kg para cada una de las micotoxinas de NIV, DON, 3-ADON y 15-ADON fueron de 88.2%, 76.6%, 78.2%, 69.8%, respectivamente. Las curvas de calibrado obtenidas fueron lineales entre el intervalo de 0.006–0.625 mg/l para todos los tricotecenos: NIV, DON, 3-ADON y 15-ADON con unos coeficientes de determinación de 0.9986, 0.9991, 0.9992, 0.9978, respectivamente. Mientras que la curva de calibrado para la OTA fue lineal en el intervalo comprendido entre 0.1 y 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ con un coeficiente de determinación de 0.9997 (Tabla 13).

Los límites de detección obtenidos para el medio de cultivo de maíz (Sección Experimental 2.5.2) de DON, NIV, 3-ADON fueron de 8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 11 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Mientras, las recuperaciones de DON, NIV y 3-ADON para el medio contaminado con 2.5 mg/Kg de cada micotoxina fueron respectivamente de 84.9%, 63.9%, 71.6%, pero para un nivel de contaminación en el medio de maíz de 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ por micotoxina se obtuvieron las recuperaciones respectivas de 91.4%, 72.1% y 75.4%. La

curva de calibrado para los diferentes tricotecenos fue la misma que en el medio de trigo, indicado en el párrafo anterior, con unos coeficientes de determinación de 0.9994, 0.9993, 0.9985 para DON, NIV, 3-ADON, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Límites de detección, valores de recuperación y desviación estándar relativa de las distintas micotoxinas ensayadas en los diferentes medios de cultivo.

Medio	Micotoxina	Límite de detección (µg/Kg)	Recuperación (%) / nivel de muestra contaminada (µg/Kg)	RSD (%)	r ²
Grano de trigo	OTA	0.011	72.4 / 1.0	4.2	0.9997
	NIV	18	88.2 / 1000	5.6	0.9986
	DON	7	76.6 / 1000	4.8	0.9991
	3-ADON	12	78.2 / 1000	6.1	0.9992
	15-ADON	11	69.8 / 1000	7.3	0.9978
Grano de maíz	DON	8	91.4 / 250	7.6	0.9994
	NIV	15	72.1 / 250	8.4	0.9993
	3-ADON	11	75.4 / 250	6.4	0.9985
ZUA	OTA	<1.0 ^a	89.0 / 100 ^a	4.2	0.9996
YES (con polen)	OTA	0.012 ^a	89.4 / 0.1 ^a	8.2	0.9996
	OTB	0.026 ^a	82.6 / 0.1 ^a	7.5	0.9987
YES	PAT	2.5 ^a	60.1 / 55 ^a	7.3	0.9993
PDA	PAT	2.5	69.2 / 5000	4.1	0.9985
ADA	PAT	2.5	65.6 / 5000	5.0	0.9985

a) µg/l
n=3

El valor de recuperación obtenido en el medio de cultivo ZUA (Sección Experimental 2.5.5) para la determinación de OTA fue del 89% a una concentración de 100 µg/l, con un límite de detección inferior a 1.0 µg de OTA/Kg de medio, de acuerdo con la relación señal ruido de 3:1. La curva de calibrado tuvo una respuesta lineal en el intervalo 0.1 y 100 µg/l con un r² 0.9996 (Tabla 13).

Sin embargo, el límite de detección de OTA para el medio de cultivo líquido YES (con polen de abeja al 5%) (Sección Experimental 2.5.4) fue 0.012 µg/l y el LOD para la OTB en el mismo medio de cultivo líquido fue 0.026 µg/l. Para finalizar, las recuperaciones obtenidas en el medio líquido contaminado con OTA y OTB con 0.1 µg/l fueron de 89.4 y 82.6%, respectivamente y con 10 µg/l fueron de 93.4 y 84.7%, respectivamente. La curva de calibrado fue lineal en el intervalo 0.1 y 100 µg/l con un r²

0.9996 en el caso de la OTA, mientras en la OTB fue lineal entre 0.5 a 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ con un r^2 de 0.9989 (Tabla 13).

Para la patulina, el LOD obtenido en el medio de cultivo YES (Sección Experimental 2.5.6) fue de 2.5 $\mu\text{g}/\text{l}$. En el caso de las recuperaciones de PAT para el medio YES contaminado con 235 $\mu\text{g}/\text{l}$ y 55 $\mu\text{g}/\text{l}$ de toxina se obtuvieron valores de 62.7% y 60.1%, respectivamente. La curva de calibrado fue lineal para los estándares en el intervalo comprendido entre 0.1 a 100 mg/l con un r^2 de 0.9993 (Tabla 13).

Por otra parte, los valores de recuperación obtenidos en el medio de cultivo sólido PDA y ADA (Sección Experimental 2.5.7) para la PAT fueron del 69% y 65%, respectivamente a una concentración de 5 $\text{mg PAT}/\text{Kg}$ de medio, con un límite de detección para ambos casos de 2.5 μg de PAT/Kg de medio, en función de la relación señal ruido de 3:1. Los estándares de PAT utilizados están comprendidos entre 0.1–100 mg/l , siendo la respuesta de la señal lineal en todo el intervalo. El coeficiente de determinación fue 0.9985 (Tabla 13).

En general, a partir de los resultados obtenidos (Tabla 13), los métodos propuestos son adecuados para la determinación de micotoxinas en los diferentes medios de cultivo a los que se hace referencia. Por lo tanto, dichas metodologías serán utilizadas en las distintas experiencias que se plantean a lo largo de este trabajo.

3. Quimiotipado de los aislados de las especies potencialmente productoras de ocratoxinas, tricotecenos tipo B y patulina

Para la caracterización de los aislados potencialmente productores de patulina, ocratoxina A y B y tricotecenos B, estos se cultivaron en los medios y las condiciones apropiadas como se indica en la Sección Experimental 3.1 apartados 1, 2 y 3. Tras el periodo de incubación se analizaron las micotoxinas producidas en el medio. La determinación de ocratoxinas, tricotecenos tipo B y patulina se llevó a cabo por los métodos expuestos en la Sección Experimental 2.5.4, 2.5.2 y 2.5.6, respectivamente. A continuación se muestran los resultados obtenidos en relación con la caracterización de los aislados de las diferentes especies detectadas en las muestras, potencialmente productoras de dichas micotoxinas:

3.1 *Ocratoxinas en medio YES suplementado con polen de abeja*

Los resultados obtenidos tras la determinación de OTA en los cultivos de 45 aislados de *Aspergillus* sección *Nigri* mostraron que sólo 32 de ellos eran productores de dicha micotoxina. De ellos, 27 se identificaron como *A. carbonarius* y 5 se caracterizaron como *Aspergillus* del agregado *niger* (Tabla 14). Los intervalos de producción de OTA fueron 0.061–0.606 µg/l de medio (media 0.214 µg/ml) en los cultivos de *A. carbonarius* y 0.037–0.193 µg/l de medio (media 0.95 µg/l) en los cultivos de las especies de *Aspergillus* del agregado *niger*. La cantidad media de toxina encontrada en los cultivos de los 32 aislados productores de OTA fue de 0.176 µg/l de medio. La OTA y OTB se encontraron simultáneamente en el cultivo de un único aislado de *A. carbonarius* donde los niveles de toxinas registrados fueron de 0.326 µg/l de medio y 0.845 µg/l de medio respectivamente. Hay que destacar que la cantidad de OTB producida por este aislado fue superior a la de OTA lo que resulta muy interesante, cuando lo habitual es que ocurra lo contrario. En la Figura 23 se muestra un cromatograma del extracto de un cultivo del aislado de *Aspergillus carbonarius* c11d5 productor de OTA.

En el caso de las especies de *A. secc. Circumdati*, tan sólo cuatro de los 20 aislados analizados fueron productores de OTA y el nivel medio encontrado para esta toxina en los cultivos fue de 132 µg/l (intervalo 2.75–454 µg/l). Además, otros dos aislados fueron capaces de producir OTB y los niveles registrados en el medio para estas micotoxinas fueron 0.52 y 44.6 µg/l (Tabla 14).

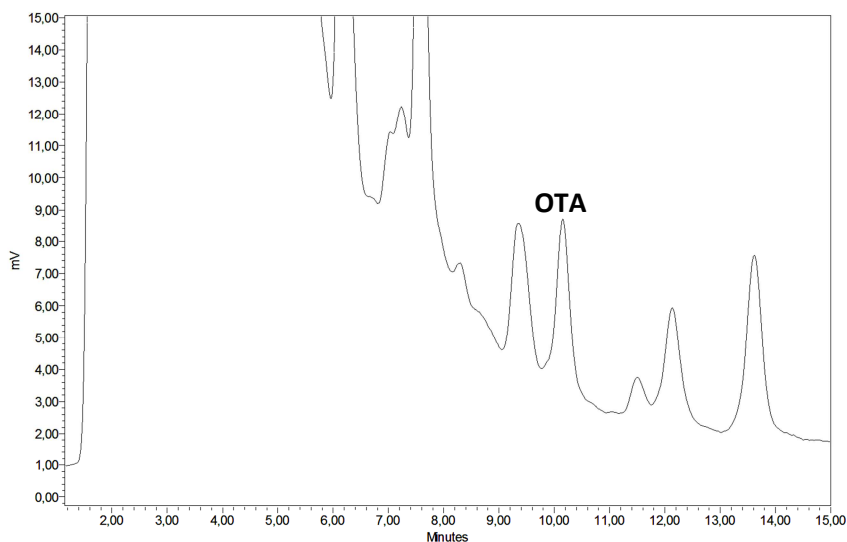


Figura 23. Cromatograma obtenido por LC-FLD de un extracto de un cultivo en medio YES- 5% polen de abeja del aislado de *Aspergillus carbonarius* c11d5. Nivel de toxina en el medio, 0.382 μg de OTA/l.

Tabla 14. Niveles de micotoxinas en los cultivos de los aislados de las especies potencialmente productoras de OTA, OTB, tricotecenos B y patulina.

Hongo	Micotoxina	Número de aislados		Nivel micotoxina ($\mu\text{g}/\text{l}$)	
		Analizados	Positivos	Media	Intervalo
<i>A. secc. Nigri</i> ^a	Ocratoxina A	45	32	0.176	0.037–0.606
	Ocratoxina B	45	1	0.845	0.845
<i>A. secc. Circundati</i> ^a	Ocratoxina A	20	4	132	2.75–454
	Ocratoxina B	20	2	22.5	0.52–44.6
<i>F. graminearum</i> ^b	NIV	40	5	55 *	45–75 *
	DON	40	33	436 *	43–1342 *
	3-/15-ADON	40	27	381 *	90–1259 *
<i>P. expansum</i> ^c	Patulina	28	26	12854	104–89396

Los medios de cultivo: a) YES-5 % (p/v) de polen de abeja; b) Granos de maíz; c) YES.

*Los valores se expresan en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de medio de cultivo seco.

n=3

Como resumen, se llega a la conclusión de que un elevado porcentaje de aislados de *Aspergillus* de la sección *Nigri* fue capaz de producir OTA aunque los niveles encontrados no fueron excesivamente elevados (Tabla 14). Si se considera la amplia incidencia de estos hongos en grano, su contribución a la presencia de OTA en muestras de trigo puede ser

significativa. Por otro lado, la baja incidencia de las especies de *A. secc. Circumdati*, especies descritas como principales productoras de OTA y OTB, indica que la presencia de OTA en muestras de trigo es debida principalmente a otros hongos, y en concreto a *Aspergillus* de la sección *Nigri* o *Penicillium spp.* Por último, considerando el elevado número de muestras estudiadas, los resultados indican que la OTB es poco probable que sea una toxina importante en el trigo comercializado en España, debido a su baja incidencia, solamente tres de los 65 aislados estudiados, dos en *A. secc. Circumdati* y uno en *A. secc. Nigri*, mostraron capacidad para producir OTB. Además, se ha descrito que esta toxina presenta, en general, baja toxicidad (Moss 1996b).

3.2 Tricotecenos tipo B en los cultivos en granos de maíz

En el estudio de los 40 aislados de *Fusarium graminearum* potencialmente productores de tricotecenos tipo B, se detectó NIV en el 12.5% de los cultivos con un nivel medio de 55 µg/Kg, mientras que el DON se encontró en el 82.5% de los cultivos con un nivel medio de 436 µg/Kg (Tabla 14). Para la suma de 3-ADON y 15-ADON el nivel medio fue de 381 µg/Kg, de los 40 aislados estudiados, 27 fueron productores de alguna de estas dos toxinas. En la Figura 24 se puede observar el cromatograma de GC-ECD obtenido del análisis del cultivo del aislado Fg5 de *F. graminearum*. Como se puede observar aparecen los picos correspondientes al DON y 3-ADON.

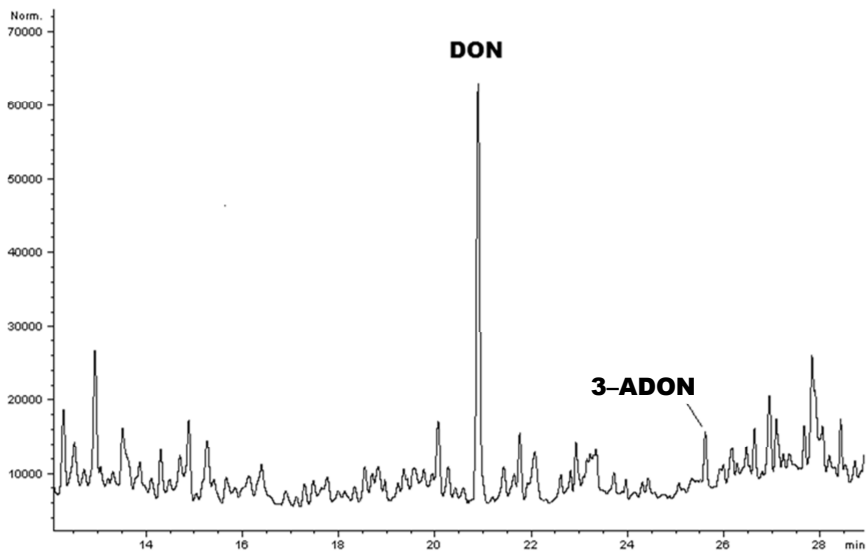


Figura 24. Cromatograma obtenido por GC-ECD de una muestra de un cultivo en maíz de *Fusarium graminearum* (aislado Fg5) que contiene 1032 µg de DON/Kg y 328 µg de 3-ADON/Kg.

Aunque en España existen pocos estudios que examinen los niveles de NIV, DON, 3- y 15-ADON en cereales (Jiménez *et al.* 1993, Medina *et al.* 2006b), en otros países, tanto en países desarrollados como en vías de

desarrollo, se ha indicado la presencia de estas micotoxinas en diversos cereales, especialmente en maíz y trigo, así como en sus productos derivados (Eriksen y Alexander 1998, MacDonald *et al.* 2004, Müller *et al.* 1997, Pacin *et al.* 1997, Quiroga *et al.* 1995, Quarta *et al.* 2006, Scott 1993b, Tanaka *et al.* 1988, 1990, Trenholm *et al.* 1981, Yoshizawa y Jin 1995). Por tanto, debido al elevado porcentaje de aislados de la especie *Fusarium graminearum* capaces de producir tricotecenos tipo B encontrado en nuestro estudio, esta especie puede ser causa, en gran parte, de la posible presencia de estas micotoxinas en el trigo.

3.3 Patulina en medio YES

La comprobación de la posible producción de PAT por los diferentes aislados de *Penicillium expansum* seleccionados indicó que, el 93% de ellos son productores de la toxina en medio YES (Tabla 13). El valor medio de patulina en los cultivos fue de 12854 $\mu\text{g}/\text{l}$ con una variación entre 104 a 89396 $\mu\text{g}/\text{l}$. Aunque los valores obtenidos son bastante elevados son similares a los descritos por otros autores. Por ejemplo, Andersen *et al.* (2004), estudiaron 85 aislados y encontraron 83 capaces de producir PAT. Otros autores han analizado manzana con síntomas evidentes de podredumbre producida por esta especie, y han encontrado que el 88% de las frutas presentaban PAT, con unos valores que podían superar los 80.5 mg de PAT/Kg (Martins *et al.* 2002). En la Figura 25 se puede observar el cromatograma obtenido por LC-UV del análisis del cultivo del aislado N(3) de *P. expansum* que contiene PAT.

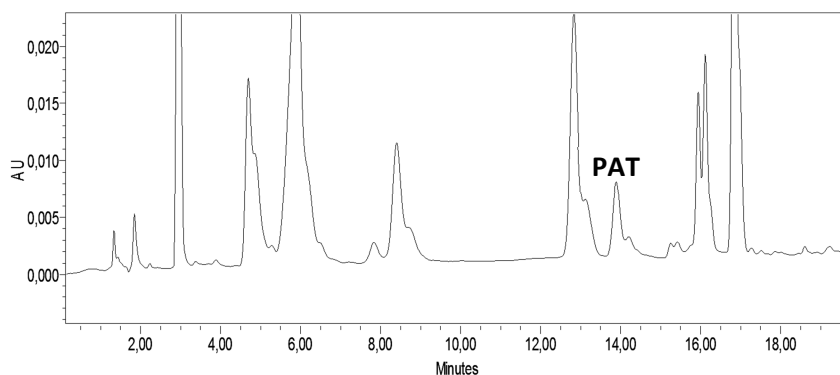


Figura 25. Cromatograma obtenido por LC-UV en el análisis de un cultivo en medio YES de *Penicillium expansum* (aislado N(3)) que contiene 104 μg de patulina/l. Longitud de onda 276 nm.

4. Estudio de la influencia de los factores fisicoquímicos en el crecimiento de los hongos y en la producción de las micotoxinas.

4.1 Crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y producción de OTA

4.1.1 Fase de inicio (fase lag)

La fase de inicio del crecimiento fúngico o fase *lag* como ya se indicó en la Sección Experimental 4.3.1 se considera el tiempo requerido para que la colonia del hongo alcance un diámetro de 5 mm. Los tiempos de inicio del crecimiento del aislado Asc14 observados en el experimento se muestran en la Tabla 15. Estos valores difieren entre sí, por lo que los efectos de a_w , temperatura y concentración de carbendazima pueden haber repercutido en el tiempo transcurrido entre el día de la inoculación y el tiempo de inicio del crecimiento del hongo. El análisis estadístico de los datos (ANOVA) revela que los tres factores ensayados y las interacciones a_w –concentración de carbendazima y a_w –temperatura, tienen efectos significativos en la duración de la fase de inicio de crecimiento (valor- $p < 0.05$). Cuando se utiliza el test de intervalo múltiple Tukey–HSD (Tukey–Diferencia honestamente significativa) a un nivel de confianza de 95%, los casos se reunieron en varios grupos homogéneos según los diferentes parámetros utilizados. El test aplicado sobre el nivel de a_w en el cultivo proporcionó dos grupos diferentes (a_w 0.98 y a_w 0.94–0.96), en donde la fase de inicio del crecimiento del hongo fue de sólo un día para los valores de a_w más altos (0.98), por tanto para este caso, el desarrollo de micelio fue visible al día siguiente de la inoculación en todos los cultivos independientemente del resto de factores estudiados. Por otro lado, según el tratamiento Tukey–HSD, la fase de inicio de crecimiento obtenida a 20°C fue incluida en un grupo separado, mientras las obtenidas a 25–28°C se incluyeron como un grupo homogéneo. Así, la temperatura más baja ensayada (20°C) produce un incremento significativo en la fase de inicio de crecimiento mientras que temperaturas 25–28°C no muestran entre sí una influencia significativa en la duración de la fase de inicio de crecimiento. Para el último factor, concentración de carbendazima, el test divide los casos en dos grupos homogéneos pero entremezclados, uno formado por el cultivo control con ausencia de carbendazima y los cultivos con 50, 150, 250, y 350 ng/ml y el otro formado por los cultivos con 250, 350 y 450 ng/ml. El nivel más alto del antifúngico (450 ng/ml) produce un incremento significativo en la fase de inicio de crecimiento (de 1 a 7 días) en comparación con el blanco (control) o el medio con 50 ng/ml (de 1 a 3 días).

Con los resultados obtenidos se puede incidir en que los tres factores estudiados afectan a la duración de la fase de inicio de crecimiento que se redujo con el aumento del contenido en agua libre y de temperaturas relativamente altas (25–28°C), mientras que los niveles de carbendazima en un intervalo de entre 50–250 ng/ml no muestran efectos significativos. Los tiempos más largos de inicio del crecimiento se observaron para a_w

0.94, temperatura 20°C, y una concentración de fungicida de 450 ng carbendazima/ml, sin embargo, el efecto de fungicida no presentó una gran influencia a los niveles ensayados excepto para el de mayor concentración ensayada. Mitchell *et al.* (2004) estudió la evolución del crecimiento de 8 cepas de *A. carbonarius* de varios países y encontró un incremento de tiempo de inicio del crecimiento con la reducción de la a_w y temperatura, de hecho, cuando utilizaron valores de temperatura de 10°C y a_w de 0.85, el tiempo de inicio del crecimiento superaba los 20 días. Los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con los indicados por dicho autor, aunque en este trabajo los experimentos no fueron tan restrictivos.

Tabla 15. Tiempo de inicio (días) del crecimiento del aislado Asc14 de *Aspergillus carbonarius* con diferentes concentraciones de carbendazima en medio sólido a base de zumo de uva (pH 4.5) y en diferentes condiciones de a_w y temperaturas de incubación.

Concentración de Carbendazima (ng/ml)	a_w								
	0.94			0.96			0.98		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	20	25	28	20	25	28	20	25	28
0	3	2	2	3	2	2	1	1	1
50	3	2	2	3	2	2	1	1	1
250	4	3	2	4	3	2	1	1	1
350	7	3	3	4	3	3	1	1	1
450	7	4	3	5	3	3	1	1	1

n=2

4.1.2 Velocidad de crecimiento

Las velocidades de crecimiento de las colonias obtenidas en los diferentes experimentos se muestran en la Tabla 16. Cuando a estos datos se les aplicó el ANOVA, éste mostró como resultado que los tres factores estudiados (temperatura, a_w y concentración de fungicida) tienen efectos significativos en la velocidad de crecimiento fúngico. También fue significativa la interacción entre a_w y temperatura (valor- $p < 0.05$). De todos los factores e interacciones que afectan a la velocidad de crecimiento, la carbendazima fue el factor menos influyente, el valor- p obtenido fue el más elevado (0.0413).

Al ser aplicado el test de intervalo múltiple de Tukey-HSD ($P=95\%$) al factor temperatura, este condujo a tres grupos homogéneos. Así, manteniendo las condiciones de a_w y la concentración de fungicida constantes, se consiguió una mayor velocidad de crecimiento cuando la temperatura aumentó para el intervalo ensayado (20–28°C).

Tabla 16. Velocidad de crecimiento (mm/día) del aislado Asc14 de *Aspergillus carbonarius* con diferentes concentraciones de carbendazima en medio sólido a base de zumo de uva (pH 4.5) y en diferentes condiciones de a_w y temperaturas de incubación.

Concentración de Carbendazima (ng/ml)	a_w								
	0.94			0.96			0.98		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	20	25	28	20	25	28	20	25	28
0	5.13	7.80	11.53	6.34	11.54	14.46	5.64	10.27	13.52
50	5.34	10.29	11.82	6.40	11.38	14.20	5.31	10.21	13.75
250	5.09	10.37	10.07	6.41	10.77	13.55	5.07	10.23	13.87
350	5.29	9.35	9.57	6.28	9.67	14.00	4.04	10.86	13.73
450	5.20	9.28	7.99	5.59	9.03	12.55	3.51	9.01	13.22

n=2

En el caso de a_w , el test de Tukey–HSD ($P=95\%$) manifestó dos grupos homogéneos, uno de ellos para a_w de 0.94 y el otro que estaba formado por los valores de a_w de 0.96 y 0.98. El valor de a_w más bajo produjo un decrecimiento significativo en la velocidad de crecimiento del aislado de *A. carbonarius*.

Se obtuvieron dos grupos entremezclados aplicando el mismo test a los niveles de carbendazima en el medio (0, 50, 250 y 350 ng/ml y 0, 250, 350 y 450 ng/ml). La carbendazima no tuvo un efecto negativo en la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* a una concentración de 50 ng/ml en comparación con el blanco. En general, no existieron diferencias significativas en relación con los niveles de carbendazima en la velocidad de crecimiento, excepto en el caso de concentraciones entre 50 y 450 ng/ml.

Con el objetivo de predecir la velocidad de crecimiento fúngico como una función de los factores ensayados, se calculó un posible modelo mediante análisis de regresión múltiple. Las velocidades de crecimiento fueron transformadas en sus logaritmos decimales [log (velocidad de crecimiento)] para obtener la función más adecuada a los resultados obtenidos. La ecuación en la que se obtiene un valor más alto de r^2 fue:

$$\begin{aligned} \log(\text{velocidad de crecimiento}) = & -143.073 - 0.3399 \times T + \\ & + 306.804 \times a_w - 3.34 \times 10^{-7} \times ([\text{Carbendazima}])^2 - 0.0029 \times (T)^2 - \\ & - 166.243 \times (a_w)^2 + 0.5473 \times a_w \times T \end{aligned} \quad \text{[Ec. 3]}$$

Donde, T es la temperatura en °C, los coeficientes de cada término indican la importancia de los diferentes factores, el último término representa la interacción entre T y a_w .

El estadístico r^2 (0.9552) indica que el modelo explica adecuadamente el 95.5% de la variabilidad en el log (velocidad de crecimiento).

Se puede observar en la Tabla 16 que en el cultivo estudiado, la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* estuvo favorecida por una elevada a_w y unas temperaturas relativamente altas. Sin embargo, la adición de carbendazima en los niveles ensayados no tuvo una influencia apreciable en la velocidad de crecimiento fúngico.

4.1.3 Acumulación de OTA

Se estudió la acumulación de OTA como una función de cuatro variables: a_w , concentración de carbendazima, temperatura y tiempo. En la Figura 26 se muestra la concentración de OTA en el medio de cultivo a diferentes días de incubación, temperaturas y niveles de carbendazima manteniendo a_w constante a 0.98 y en la Tabla 17 están indicados los niveles de OTA que se encontraron en el medio de cultivo en el día 15 desde el tiempo de inicio del crecimiento.

Tabla 17. Acumulación de OTA (ng/g) en el medio de cultivo sólido a base de zumo de uva en el día 15 desde el día de inicio del crecimiento en cultivos del aislado Asc14 de *Aspergillus carbonarius*.

Concentración de Carbendazima (ng/ml)	a_w								
	0.94			0.96			0.98		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	20	25	28	20	25	28	20	25	28
0	324.5	122.7	31.4	1028	326.7	126.7	2743	2006	862.4
50	273.8	81.2	28.4	1211	283.2	79.8	3437	2022	815.6
250	235.3	171.1	38.6	1365	524.5	123.2	4449	2163	972.9
350	542.3	121.8	123.9	1476	634.2	158.9	5122	2757	1696
450	161.6	366.1	661.9	1928	885.9	413.5	5955	4301	2058

n=2

El tratamiento estadístico de los datos por ANOVA mostró que todos los factores tienen efectos significativos en la acumulación de OTA (valor $-p < 0.05$), además, también existen dos interacciones estadísticamente significativas (a_w -temperatura y temperatura-tiempo).

El test de Tukey-HSD ($P=95\%$) produjo varios agrupamientos en función de cada factor estudiado. El factor de a_w contenía tres grupos independientes. Los valores más elevados de OTA se encontraron a 0.98 y decrecieron cuando a_w disminuyó. Así, la cantidad disponible de agua influencia positivamente la acumulación de OTA. Con respecto al tiempo, también se observaron 3 grupos homogéneos no superpuestos (día 3, 7 y 15), en donde, se aprecia un aumento de la acumulación de OTA a lo largo del tiempo, en el medio de cultivo. Con respecto a la temperatura aparecieron 2 grupos homogéneos, uno formado por las temperaturas de 25 y 28°C, y el otro por la de 20°C, que fue la más favorable para la producción de OTA. También se observó un doble grupo al estudiar el

factor del fungicida. Los dos grupos aparecen superpuestos, como en el caso de la velocidad de crecimiento. Un grupo corresponde a cultivos que contienen 0–350 ng carbendazima/ml y el otro donde las concentraciones estaban comprendidas entre 250–450 ng/ml. La concentración del fungicida influye positivamente la acumulación de OTA, y por tanto, se obtienen valores más elevados de acumulación de OTA cuando las concentraciones de fungicida son más altas.

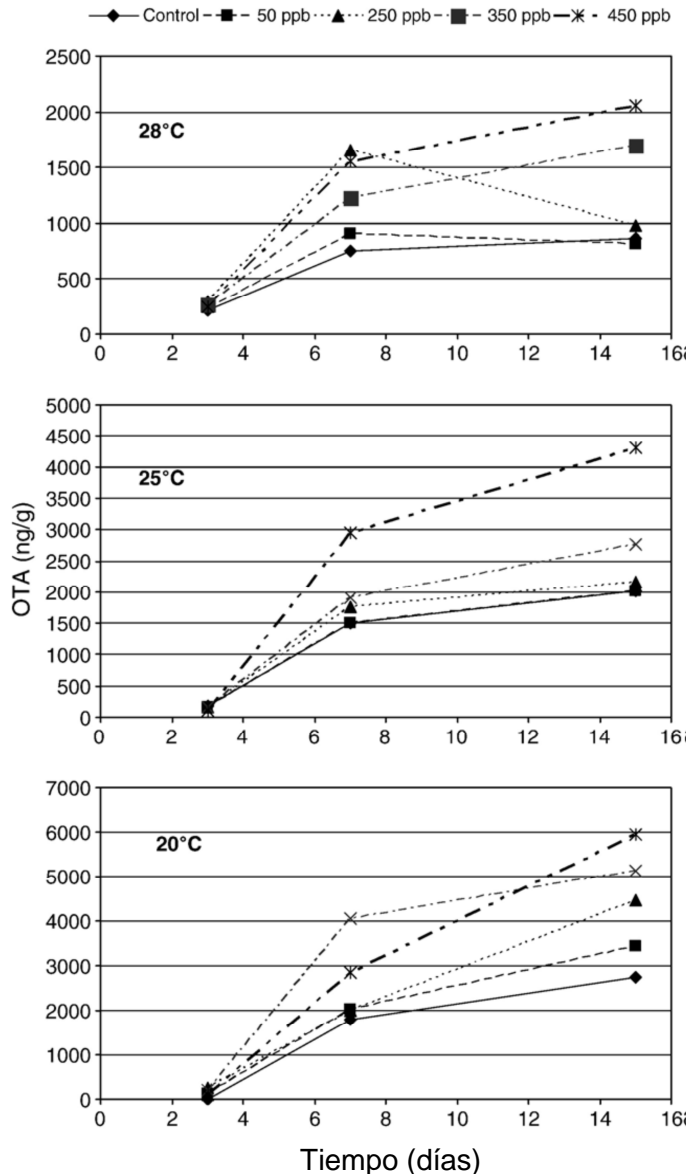


Figura 26. Evolución durante el tiempo (en días transcurridos después de la fase de inicio de crecimiento) del nivel de OTA (ng/g) en el medio de cultivo sólido a base de uva a a_w 0.98, a varias temperaturas y diferentes niveles de carbendazima en cultivos del aislado Asc14 de *Aspergillus carbonarius*.

Al igual que en la velocidad de crecimiento, también se determinó un posible modelo para poder predecir la acumulación de OTA en función de los parámetros estudiados mediante análisis de regresión múltiple. La mejor ecuación obtenida fue:

$$\begin{aligned} \text{Acumulación de OTA} = & 602931 - 1.44084 \times 10^6 \times a_w - \\ & - 52.6 \times [\text{carbendazima}] + 688.7 \times t + 5739.2 \times T - 5888.3 \times a_w \times T - \\ & - 15.68 \times t \times T + 55.992 \times [\text{carbendazima}] \times a_w + 842763 \times (a_w)^2 - \\ & - 10.137 \times (t)^2 \end{aligned} \quad \text{[Ec. 4]}$$

Donde, T es la temperatura en °C y t es el tiempo en días después de la fase de inicio del crecimiento.

El valor de r² (0.7743) indica que el modelo explica adecuadamente el 77.4% de la variabilidad en la acumulación de OTA en el medio producida por la cepa estudiada.

Por tanto, los efectos de la carbendazima en las concentraciones ensayadas (50–450 ng/ml) se pueden resumir como sigue: a) no incrementan la fase de inicio del crecimiento en el aislado de *A. carbonarius* estudiado, excepto para a_w y temperaturas relativamente bajas, aunque el mayor retraso fue sólo de 4 días con respecto a la muestra control; b) aparentemente no se observó una sustancial disminución de la velocidad de crecimiento fúngico, pero probablemente incrementó la acumulación de OTA en el medio; c) si esto último es así, como la carbendazima es ampliamente utilizada contra las infecciones fúngicas en diversos cultivos antes de la cosecha, podría también influenciar positivamente la producción de OTA por *A. carbonarius* a nivel de campo. Esto estaría de acuerdo con Battilani *et al.* (2003) que han encontrado que algunos fungicidas pueden estimular la síntesis de OTA en cultivos de cepas productoras de OTA pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*. Además, se ha indicado que los fungicidas fluazinam y procimidona tuvieron un efecto potenciador de la producción de OTA en medios de cultivo sintéticos de uva en aislados de *A. carbonarius*, sin embargo, la producción de OTA no se incrementó significativamente cuando se añadió sulfuro al medio que contenía fungicidas inorgánicos (Bellí *et al.* 2006). A pesar de ello, otros autores han obtenido como resultado una reducción de la producción de OTA y ocratoxina B en cultivos de *A. ochraceus* en medio de extracto de levadura-sacarosa y en granos de maíz cuando se añadió diclorvos (un pesticida organofosforado) a niveles superiores a 300 mg/l en medio líquido ó 300 mg /Kg en maíz (Wu y Ayres 1974). Por otro lado, de acuerdo con Tjamos *et al.* (2004), la carbendazima no fue efectiva para controlar la población de *A. carbonarius* en las viñas, como consecuencia, cuando se aplicó este fungicida, la especie *A. carbonarius* prevalece sobre otras especies del agregado *A. niger*. Por tanto, la carbendazima no puede ser considerado un buen fungicida porque provoca la predominancia de *A. carbonarius* sobre otras especies menos ocratoxigénicas y puede incrementar la producción de OTA como se ha demostrado en este trabajo en condiciones *in vitro*.

Con respecto al efecto de la a_w y la temperatura en el crecimiento de *A. carbonarius* y la producción de OTA, los resultados en este trabajo están de

acuerdo con los de otros autores (Leong *et al.* 2006, Marín *et al.* 2006), en donde se favorece el crecimiento del hongo para a_w y temperaturas elevadas, mientras que la producción de OTA se incrementa a temperaturas medias (aproximadamente 20°C) y a_w de 0.96–0.98.

4.2 Crecimiento de *Penicillium expansum* y producción de PAT

4.2.1 Fase de inicio del crecimiento

Los datos obtenidos de inicio del crecimiento del aislado Pe7 de *Penicillium expansum* en los medios estudiados se muestran en las Tablas 18 y 19. Se observa un retardo en el crecimiento del hongo a medida que aumenta la concentración de sulfato de imazalil, llegando a un valor en el que se inhibe totalmente el crecimiento. Esta concentración de inhibición varía según el resto de factores estudiados. También se observa un aumento en el tiempo de inicio del crecimiento de la colonia a medida que disminuye la temperatura de incubación. En los distintos medios de cultivo estudiados se observa que el hongo deja de crecer a una concentración de sulfato de imazalil de 40 µg/Kg en el medio PDA, mientras que en el medio ADA crece hasta incluso a concentraciones de 500 µg/Kg en función de las condiciones de ensayo. Para comprobar si estas diferencias eran significativas se realizó un ANOVA con todos los datos. Se obtuvo como resultado que el tipo de medio de cultivo es un factor estadísticamente significativo (valor- $p < 0.05$), con lo cual, el aislado se comporta de manera distinta según el medio utilizado. En este caso, el medio más favorable para el crecimiento del hongo fue el medio a base de manzana que coincide con el sustrato en donde se suele encontrar principalmente PAT. Además, la necesidad de utilizar una mayor concentración de sulfato de imazalil para inhibir el crecimiento del hongo indica que el aislado presenta una mayor resistencia a dicho fungicida en medio de manzana, probablemente por una mejor adaptación a ese sustrato.

Tabla 18. Tiempo de inicio (horas) del crecimiento de las colonias del aislado Pe7 de *Penicillium expansum* en función de la concentración de sulfato de imazalil en medio PDA (pH 5.5) y de los niveles de a_w y temperatura.

Concentración de sulfato de imazalil (µg/Kg)	a_w								
	0.93			0.96			0.99		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	4	14	24	4	14	24	4	14	24
0	NC	100	50	249	43	41	126	64	30
10	NC	150	56	363	105	74	454	95	42
40	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
70	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

NC no se observa crecimiento
n=2

A continuación, se realizó un ANOVA para estudiar los efectos de los diversos parámetros considerados para cada tipo de medio.

En el ANOVA realizado para el medio de cultivo PDA, los factores que se encontraron estadísticamente significativos fueron la concentración de imazalil y la temperatura, mientras que la a_w no mostró valores significativos (valor- $p > 0.05$). Al utilizar el test de intervalo múltiple Tukey-HSD a un nivel de confianza de 95%, los casos se reunieron en varios grupos homogéneos según los diferentes parámetros utilizados. En el caso de la a_w , no se obtuvo una separación completa de los distintos grupos aunque existe una tendencia, así para a_w 0.96 y 0.99 se comportaron de igual forma mientras que a_w a 0.93 apareció con unos valores ligeramente superiores de tiempo de inicio del crecimiento del micelio. En el caso del factor concentración de imazalil, el test de Tukey-HSD, mostró claramente dos grupos, uno formado por las concentraciones de control y 10 μg sulfato imazalil/g, y el otro grupo por el resto de concentraciones ensayadas en las cuales no se observó crecimiento alguno. Aunque se agrupan juntos los resultados de la experiencias control y de concentración de 10 μg sulfato imazalil/g, se puede indicar que el control tuvo un valor medio algo inferior al valor medio de la concentración de 10 μg sulfato imazalil/g. Por último, el test de Tukey-HSD reveló que en función del factor de temperatura se pueden distinguir dos grupos, uno formado por la temperatura de 4°C en el cual el tiempo de inicio es superior al otro grupo formado por el resto de temperaturas ensayadas.

Tabla 19. Tiempo de inicio (horas) del crecimiento de las colonias del aislado Pe7 de *Penicillium expansum* en función de la concentración de sulfato de imazalil en medio ADA (pH 5.5) y de los niveles de a_w y temperatura.

Concentración de sulfato de imazalil ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	a_w								
	0.93			0.96			0.99		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	4	14	24	4	14	24	4	14	24
0	525	67	47	340	75	63	154	55	50
10	492	126	44	464	107	74	172	66	38
40	510	134	52	453	113	75	192	52	37
70	534	128	55	444	123	66	190	63	36
255	NC	154	37	NC	154	60	291	82	75
500	NC	NC	NC	NC	NC	NC	324	145	94

NC no se observa crecimiento
n=2

En el caso del medio ADA, los resultados obtenidos por ANOVA indicaron que todos los factores son estadísticamente significativos. Se utilizó el test de Tukey-HSD para separar los diferentes efectos por grupos. Para el factor de temperatura el test reveló que a 4°C el tiempo de inicio del aislado fue mayor que a temperaturas de 14 y 24°C, mientras que estos dos últimos se

comportaron de una manera similar. En el caso de la concentración de fungicida, el test de Tukey-HSD indicó un comportamiento similar para el control y concentraciones bajas de sulfato de imazalil, apareciendo el tiempo de inicio del crecimiento del hongo a valores relativamente bajos, por el contrario a partir de concentraciones de 255 $\mu\text{g/g}$ se empezó a observar un ligero aumento del tiempo de inicio del crecimiento. Por último a concentraciones altas de 500 μg sulfato imazalil/g aparece otro grupo independiente donde se comprobó que el tiempo de inicio del crecimiento sufre un aumento en el retardo con respecto a las otras concentraciones. En el caso de la a_w , se obtuvieron tres grupos distintos para cada a_w estudiada (0.93, 0.96, 0.99) aumentado el tiempo de inicio del crecimiento del micelio a medida que disminuía la cantidad de agua disponible.

En general, como resumen de los resultados estadísticos analizados, se puede indicar que el comportamiento en relación con el inicio del crecimiento del aislado en los dos medios estudiados fue distinto según las distintas condiciones estudiadas de a_w y concentración de fungicida, mientras que fue similar para el factor temperatura.

Existen algunos estudios que tratan sobre la efectividad de los fungicidas contra el moho azul en manzanas (*P. expansum*) con resultados muy diversos según el fungicida y experiencia desarrollada. En ellos se ha comparado la acción de los fungicidas, sobre todo la posibilidad de generar resistencias en los hongos. Por ejemplo, varios ensayos fueron realizados por Viñas *et al.* (1991, 1993), en el primero realizaron una exposición directa de placas Petri conteniendo PDA con tiabendazol a 40 $\mu\text{g/ml}$ en los almacenes de frutas y en un segundo ensayo introduciendo el tiabendazol directamente en las frutas; este estudio condujo a un promedio de cepas de hongos resistentes al fungicida del 32% y del 40%, respectivamente. Estos autores también realizaron una experiencia similar con el fungicida imazalil para determinar la incidencia de cepas resistentes al imazalil en almacenes de frutas; en dicho trabajo no encontraron ninguna cepa de *Penicillium* resistente al imazalil. También realizaron la identificaron de los aislados obtenidos de la podredumbre de la manzana de cepas de *Penicillium*, de estos, el 84% fueron resistentes al tiabendazol y de dicho grupo, el 87% fue identificado como *P. expansum*; mientras las manzanas con síntomas de podredumbre tratadas con imazalil durante el almacenamiento se identificaron como *Penicillium* sólo el 34%, y no se encontró ningún aislado de *P. expansum* (Viñas *et al.* 1991, 1993). Otros autores estudiaron los efectos de la manzana madura, temperatura, condiciones de almacenamiento y concentración de esporas inoculadas en la eficacia de los fungicidas para el control del moho azul (*P. expansum*). Los fungicidas iprodiona y imazalil fueron solamente efectivos cuando la concentración de inóculo fue baja, mientras procloraz fue altamente efectivo en el control de la podredumbre en frutas inoculadas con 3×10^6 esporas/ml. La iprodiona fue más efectiva a temperaturas altas (19°C) que a temperaturas bajas (6°C) durante el almacenamiento, sin embargo con el imazalil ocurrió al contrario fue más efectivo a temperaturas bajas. El procloraz y la etaconazola fueron efectivos para cortos periodos de

almacenamiento a 20°C. Por el contrario, otros fungicidas como captán, benomilo o vinclozolin fueron inefectivos o poco eficaces en todas las condiciones de almacenamiento ensayadas (Penrose *et al.* 1989). Otra experiencia realizada en España por Pérez-Zúñiga (1985) en manzanas inoculadas con *P. expansum* y a continuación tratadas con el fungicida con el principio activo kasugamicin a una concentración de entre 50–500 mg/l o imazalil a una concentración de 500 mg/l, obtuvo como resultado que el kasugamicin proporcionaba un control inferior al 20% en la podredumbre de *Penicillium* en Golden Delicious y se obtuvieron valores similares e igualmente inefectivos en la variedad Belleza de Roma, por el contrario, el imazalil proporcionó un control superior al 50% en la podredumbre de Belleza de Roma, sin embargo fue menos efectivo en la variedad de Golden Delicious, así, estos autores llegaron a la conclusión que se obtenía un peor control de la podredumbre de *Penicillium* con kasugamicin que con imazalil durante la post-cosecha. Otro estudio de varios fungicidas proporcionó como resultado, que los benzimidazoles son inefectivos contra el 70% de los aislados de *Penicillium expansum*, mientras procloraz, imazalil y etaconazola fueron más activos contra los aislados de *P. expansum* (Romano *et al.* 1983).

Además de lo comentado en el párrafo anterior, se puede indicar que cada fungicida actúa de una manera más eficaz a unas determinadas concentraciones. Por ejemplo, Florianowicz (1991) determinó el efecto en el crecimiento de micelio de *Penicillium expansum* de cuatro fungicidas: mancozeb, iprodiona, metil tiofanato, y oxiclورو de cobre, a diferentes concentraciones en medio de cultivo Czapek conteniendo extracto de levadura al 0.2% y glucosa al 0.8%. Las concentraciones más pequeñas de fungicidas que inhiben el crecimiento del micelio de *P. expansum* fueron mancozeb al 1%, iprodiona al 0.1%, y metil tiofanato al 0.1%, sin embargo el oxiclورو de cobre al 1% inhibe sólo el crecimiento del micelio en el 53%.

4.2.2 Velocidad de crecimiento

Las Tablas 20 y 21 reproducen los datos de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Penicillium expansum*. Se observa que con un aumento de la concentración de fungicida la velocidad de crecimiento decrece, también se observa que a medida que disminuye la temperatura de incubación decae la velocidad de crecimiento. Cuando se comparan los distintos medios entre sí, se pudo observar que en medio PDA no crece a una concentración de sulfato de imazalil de 40 µg/Kg o superior y por tanto no se pudo estudiar la velocidad de crecimiento, mientras en el medio ADA existe una velocidad de crecimiento incluso a concentraciones de 500 µg/Kg, según las condiciones. De estas observaciones, se supuso que debería incluirse como covariable el tiempo de inicio de crecimiento del inóculo debido a que podría influir significativamente junto con los otros factores estudiados en los resultados del análisis estadístico (ANOVA).

Una vez realizado el ANOVA se comprobó que la covariable de tiempo de inicio fue estadísticamente significativa (valor- $p < 0.05$) y que el tipo de

medio de cultivo no influye en la velocidad de crecimiento (valor- $p > 0.05$), por lo que como se había deducido, en este caso, la covariable tiempo de inicio es un factor importante que afecta a la velocidad de crecimiento, produciendo una menor velocidad si el tiempo de inicio es mayor. Esta covariable como se ha indicado en el apartado anterior, depende, entre otros factores, del tipo de medio de cultivo, por lo que indirectamente el medio influirá en la velocidad de crecimiento.

A continuación se realizó un análisis estadístico (ANOVA) para estudiar el comportamiento de los distintos factores ensayados para cada tipo de medio.

Tabla 20. Velocidad de crecimiento (mm/hora) de las colonias del aislado Pe7 de *Penicillium expansum* en función de la concentración de sulfato de imazalil en medio PDA (pH 5.5) y de los niveles de a_w y temperatura.

Concentración de sulfato de imazalil ($\mu\text{g/Kg}$)	a_w								
	0.93			0.96			0.99		
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
	4	14	24	4	14	24	4	14	24
0	NC	0.032	0.058	0.018	0.066	0.151	0.025	0.092	0.108
10	NC	0.037	0.063	0.012	0.063	0.099	0.027	0.094	0.128
40	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
70	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

NC no se observa crecimiento
n=2

Los resultados estadísticos obtenidos en el medio de PDA, indicaron que la covariable tiempo de inicio y temperatura son factores que afectan significativamente (valor- $p < 0.05$) a la velocidad de crecimiento, mientras que los factores de a_w y concentración de sulfato de imazalil no afectan significativamente a la velocidad de crecimiento del hongo en las condiciones ensayadas. Un aumento del tiempo de inicio produjo una disminución en la velocidad de crecimiento.

Se utilizó el test de Tukey-HSD para realizar las distintas agrupaciones en los diferentes factores estudiados. Se observa, en el caso de la concentración de imazalil, que para los ensayos de control y el de 10 μg de fungicida/g se produce una velocidad de crecimiento algo superior al resto de concentraciones aunque según el ANOVA no fueron estadísticamente significativas. Por otro lado, la temperatura originó tres grupos individuales, uno para cada temperatura, aumentando la velocidad de crecimiento a medida que la temperatura aumentaba. Por último la a_w no produjo valores significativos según el test de Tukey-HSD, sin embargo, la variable a_w a 0.99 proporcionó un valor de crecimiento medio algo superior al resto de a_w ensayadas.

Para poder predecir la velocidad de crecimiento fúngico como una función dependiente de los factores estudiados, se calculó un posible modelo mediante análisis de regresión múltiple. Las velocidades de crecimiento fueron transformadas en sus logaritmos decimales [log (velocidad de crecimiento)] para obtener la función con un valor de r^2 más elevado:

$$\log(\text{velocidad de crecimiento}) = -122.852 + 0.4146 \times T + 238.986 \times a_w - 118.033 \times (a_w)^2 - 0.00221 \times (T)^2 - 0.322 \times (a_w)^2 \times T \quad \text{[Ec. 5]}$$

Donde, T es la temperatura expresada en °C y la concentración de fungicida viene expresada en µg/Kg, los coeficientes de cada término indican la importancia de los diferentes factores.

El valor de r^2 de 0.9749 indica que el modelo explica adecuadamente el 97.5% de la variabilidad en el log(velocidad de crecimiento).

De la Ecuación 5 se puede deducir que la velocidad de crecimiento de los cultivos de *P. expansum* está favorecida por una elevada a_w y unas temperaturas relativamente altas como se observa en la Tabla 20. Sin embargo, en el análisis del ANOVA se obtuvo un valor $-p$ de la variable a_w que no es estadísticamente significativo. Por otra parte, la adición de sulfato de imazalil a los niveles ensayados no tuvo una influencia significativa sobre la velocidad de crecimiento fúngico en el aislado estudiado, en función de los datos obtenidos por la Ecuación 5 y el ANOVA.

Tabla 21. Velocidad de crecimiento (mm/hora) de las colonias del aislado Pe7 de *Penicillium expansum* en función de la concentración de sulfato de imazalil en medio ADA (pH 5.5) y de los niveles de a_w y temperatura.

Concentración de sulfato de imazalil (µg/Kg)	a_w								
	0.93			0.96			0.99		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	4	14	24	4	14	24	4	14	24
0	0.007	0.024	0.031	0.011	0.052	0.087	0.030	0.132	0.213
10	0.007	0.025	0.027	0.006	0.032	0.070	0.030	0.127	0.200
40	0.007	0.026	0.030	0.009	0.030	0.073	0.030	0.131	0.199
70	0.008	0.025	0.028	0.009	0.030	0.069	0.030	0.126	0.198
255	NC	0.030	0.039	NC	0.034	0.059	0.033	0.091	0.131
500	NC	NC	NC	NC	NC	NC	0.025	0.079	0.032

NC no se observa crecimiento

n=2

En el medio ADA, los resultados obtenidos mediante el ANOVA indicaron que todas las variables y covariables estudiadas fueron estadísticamente significativas. La velocidad de crecimiento depende del tiempo de inicio, temperatura, concentración de imazalil y a_w y al igual que en medio PDA, un aumento del tiempo de inicio produce una disminución de la velocidad de crecimiento.

Para comprobar como afecta cada uno de estos factores se realizó el test de Tukey–HSD. En el caso de la temperatura, se pudieron separar tres grupos correspondientes a las temperaturas ensayadas, por lo que cada temperatura se diferencia del resto, provocando un aumento en la velocidad de crecimiento cuando se incrementa la temperatura. Para la a_w , se observaron dos grupos uno formado por las dos a_w menores y otro por a_w de 0.99, observándose un aumento de la velocidad de crecimiento cuando la a_w es mayor. Y por último, al realizar el test de Tukey–HSD sobre la concentración de sulfato de imazalil se observaron dos grupos diferenciados, el primero formado por aquellos de concentración baja hasta 255 $\mu\text{g/g}$, en los cuales la velocidad de crecimiento fue relativamente elevada y otro formado por la concentración de 500 $\mu\text{g/g}$ donde la velocidad de crecimiento fue mucho menor según el test utilizado. En el primer grupo formado por sulfato de imazalil a bajas concentraciones, la concentración de 255 $\mu\text{g/g}$ presentó una ligera disminución de la velocidad con respecto al resto de las concentraciones de este mismo grupo.

En general, la dinámica de la velocidad de crecimiento en la especie fúngica fue similar en los distintos medios aplicados, pero en el caso del medio ADA, los valores de velocidad de crecimiento se incrementaron más acusadamente y por tanto se observaron diferencias significativas en todas las variables estudiadas.

Con la idea de encontrar una función que pudiera predecir la velocidad de crecimiento fúngico en función de los factores ensayados, se realizó un análisis de regresión múltiple para la obtención de dicho modelo. La ecuación que se obtuvo con un valor más alto de r^2 fue:

$$\begin{aligned} \text{Velocidad de crecimiento} &= 28.3559 - 0.08431 \times T + \\ &+ 0.0019755 \times [\text{Imazalil}] - 59.5249 \times a_w + 31.2146 \times (a_w)^2 - \\ &- 8.42 \times 10^{-6} \times T \times [\text{Imazalil}] + 0.09271 \times T \times a_w - \\ &- 0.0020301 \times a_w \times [\text{Imazalil}] \end{aligned} \quad [\text{Ec. 6}]$$

Donde, T es la temperatura expresada en $^{\circ}\text{C}$ y la concentración de fungicida viene expresada en $\mu\text{g/Kg}$. Como en los otros modelos, los coeficientes de cada término indican la importancia de los diferentes factores. En este caso aparecen interacciones entre las diferentes variables dependientes como temperatura y concentración de fungicida, temperatura y a_w y la cantidad de concentración y a_w .

El modelo con el valor de r^2 (0.9391) explica adecuadamente el 93.9% de la variabilidad en la velocidad de crecimiento.

Desde la observación de la Tabla 21 y la aplicación de la ecuación del modelo obtenida mediante análisis por regresión múltiple [Ec. 6] se puede indicar que, la velocidad de crecimiento de la cepa estudiada de *P. expansum* en estos cultivos está favorecida cuando a_w y temperatura fueron elevadas. Además, la adición de sulfato de imazalil en los niveles ensayados tuvo una influencia significativa produciendo una disminución de la velocidad de crecimiento micelial cuando la concentración aumentaba.

4.2.3 Acumulación de PAT

El estudio de la acumulación de PAT se llevó a cabo en función de cuatro factores independientes (a_w , concentración de fungicida, temperatura y tiempo). Las Figuras 27 y 28 muestran las concentraciones observadas de PAT en los medios de cultivo ADA y PDA a diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones de sulfato de imazalil con a_w a 0.99; en las Tablas 22 y 23 se indican los niveles de PAT para ambos medios estudiados en el día 15 desde el tiempo de inicio del crecimiento del aislado.

Aunque se puede incluir un quinto factor, medio de cultivo utilizado, se optó por realizar el estudio estadístico de los medios por separado debido a que este factor afecta sólo en el inicio de crecimiento micelial. De todas formas se realizó un ANOVA para comprobar el comportamiento de la producción de PAT en los distintos sustratos ensayados, obteniéndose como resultado que la acumulación de PAT no fue significativamente distinta de un medio a otro (valor- $p < 0.05$). Por tanto, no existieron evidencias estadísticas de que la producción de PAT pudo ser afectada por un medio u otro.

Tabla 22. Acumulación de PAT (mg/Kg) en el medio de cultivo PDA en el día 15 desde el día de inicio del crecimiento en función de la concentración de sulfato de imazalil, a_w y temperatura en cultivos del aislado Pe7 de *Penicillium expansum*.

Concentración de sulfato de imazalil ($\mu\text{g/Kg}$)	a_w								
	0.93			0.96			0.99		
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
	4	14	24	4	14	24	4	14	24
0	NC	0.011	ND	0.084	0.781	81.4	39.8	313.2	207.4
10	NC	ND	ND	ND	ND	23.7	28.7	279.9	330.1
40	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
70	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

NC no se observa crecimiento fúngico; ND por debajo del límite de detección
n=2

En el tratamiento estadístico se introdujo como variable dependiente la concentración de PAT por superficie de placa ocupada por el aislado fúngico. Esto se realizó para minimizar los efectos que se pueden producir sobre la acumulación de PAT debido al distinto tiempo de inicio de crecimiento y de velocidad de crecimiento que se producen en las distintas condiciones de ensayo.

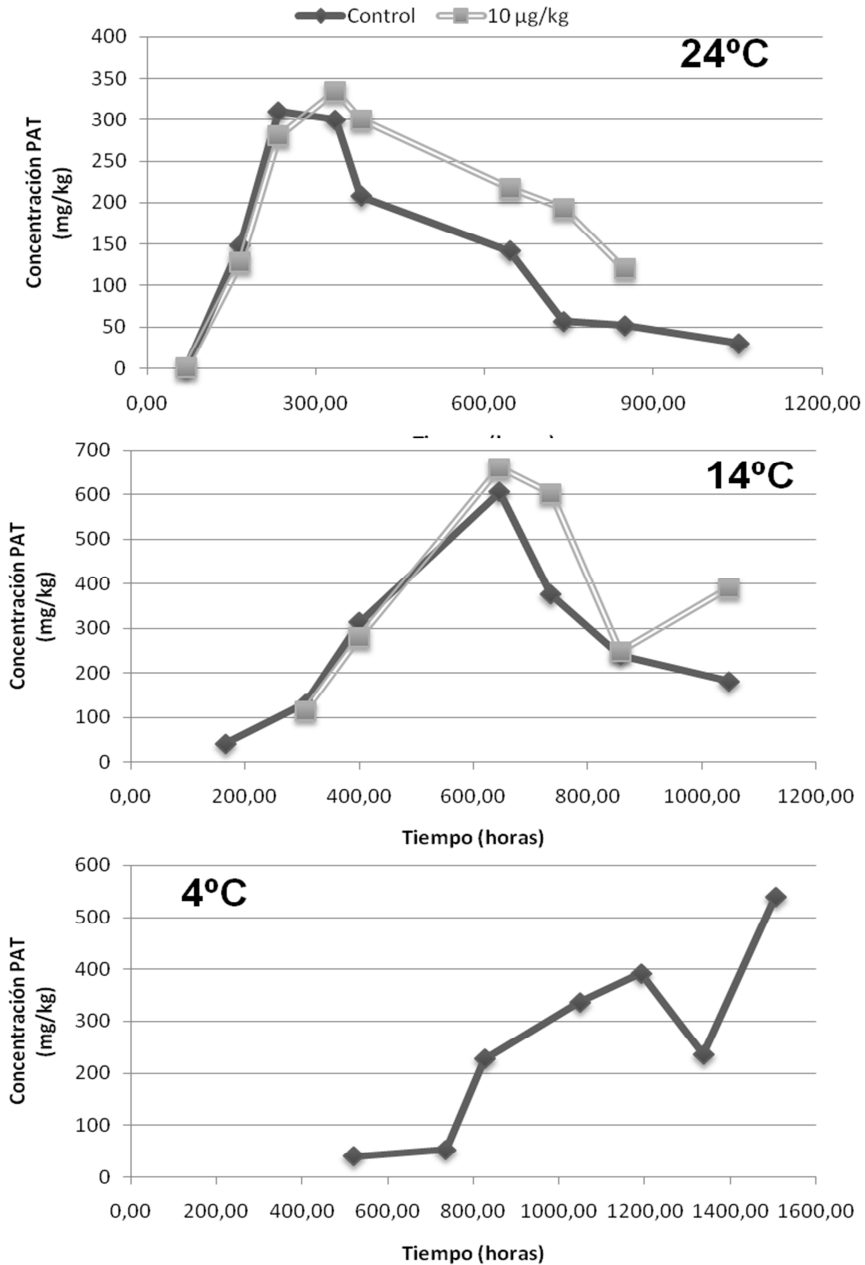


Figura 27. Evolución del nivel de PAT (mg/Kg) en los cultivos en PDA con a_w 0.99, a varias temperaturas y diferentes niveles de sulfato de imazalil en cultivos del aislado Pe7 de *Penicillium expansum*.

El tratamiento estadístico de los datos por ANOVA para cada tipo de medio ensayado mostró que todos los factores menos la temperatura tienen efectos significativos en la acumulación de PAT/superficie de colonia (valor $-p < 0.05$), con lo cual, el tiempo, la a_w y la concentración de imazalil fueron

factores que afectaron estadísticamente a la acumulación de PAT, mientras la temperatura no fue un factor determinante en la acumulación de PAT/superficie de la colonia. En las Figuras 27 y 28 se puede observar que a medida que la temperatura desciende, el tiempo de inicio de crecimiento y la velocidad de crecimiento fueron menores como se ha indicado anteriormente, y por tanto, el aislado, empezaba más tarde a producir PAT, pero también se puede observar que finalmente todos alcanzaban valores máximos de acumulación de PAT similares. Otro hecho observado fue un descenso paulatino de la PAT acumulada en el medio, una vez que la placa había sido completamente ocupada por la colonia fúngica. En el caso de la temperatura de 24°C (Figuras 27 y 28) se observó claramente este descenso debido a que son las condiciones más favorables para el crecimiento fúngico y por tanto la placa se ocupó antes que en cualquier otra temperatura ensayada. A 14°C también se observó un descenso en la cantidad de PAT en el medio, sin embargo a 4°C la colonia no llega a cubrir la superficie del medio y además continúan ascendiendo el nivel de PAT en el periodo de tiempo que dura el ensayo. Esto puede indicar que cuando los recursos del hábitat empiezan a escasear el aislado recurre a otras fuentes de energía, como puede ser parte de la PAT producida por el propio hongo. Hasan (2000) realizó un ensayo en el que un aislado de *P. expansum* se inoculaba en un medio de cultivo de glucosa–Czapek–manzana durante un periodo de 20 días a una temperatura que variaba entre 15 y 30°C, produciéndose el crecimiento óptimo al décimo día a 15°C y al quinto día a 20°C, obteniendo la máxima cantidad de PAT a 15°C después de 15 días y a 20°C después del décimo día. Esto indicó que la producción de PAT se incrementaba cuando el crecimiento había alcanzado la última fase estando próxima a agotarse la fuente de energía en el medio y se habían acumulado suficientes compuestos intermedios. Posteriormente, estos autores, observaron un decrecimiento en la acumulación de PAT durante el periodo de incubación, a partir del vigésimo día a 15°C, que podía ser debido a la degradación de la toxina por algunos compuestos químicos como los ácidos orgánicos filtrados desde la vacuola y/o por el propio hongo. Como se ha indicado en nuestro estudio, también se observó una disminución en la acumulación de PAT una vez el micelio ocupaba la totalidad de la placa.

En el caso del medio PDA, el test de Tukey–HSD a un nivel de confianza del 95% produjo varios agrupamientos. Con la a_w se obtuvieron tres grupos homogéneos. Los niveles más elevados de PAT se encontraron en una a_w de 0.99 y decrecieron cuando a_w decreció, así, una cantidad elevada de a_w influenciaba positivamente en la acumulación de PAT. Con respecto al tiempo, también aparecen varios grupos entrelazados entre sí; se observa que la acumulación de PAT/superficie de colonia se incrementa muy lentamente. Para el factor temperatura se pueden distinguir dos grupos no separados entre sí; uno formado por la temperatura a 24°C, y otro por las temperaturas 4°C y 14°C, que fueron algo más favorables para la producción de PAT/superficie de colonia. También se observaron dos grupos al utilizar el test de Tukey–HSD ($P=95\%$) con respecto a las concentraciones de sulfato de imazalil: un grupo corresponde a los cultivos

que contienen entre 0–10 μg sulfato imazalil/g y el otro entre 40–70 $\mu\text{g/g}$, donde la acumulación de PAT/superficie de colonia estuvo influenciada negativamente cuanto más alta era la concentración de fungicida en el medio de PDA.

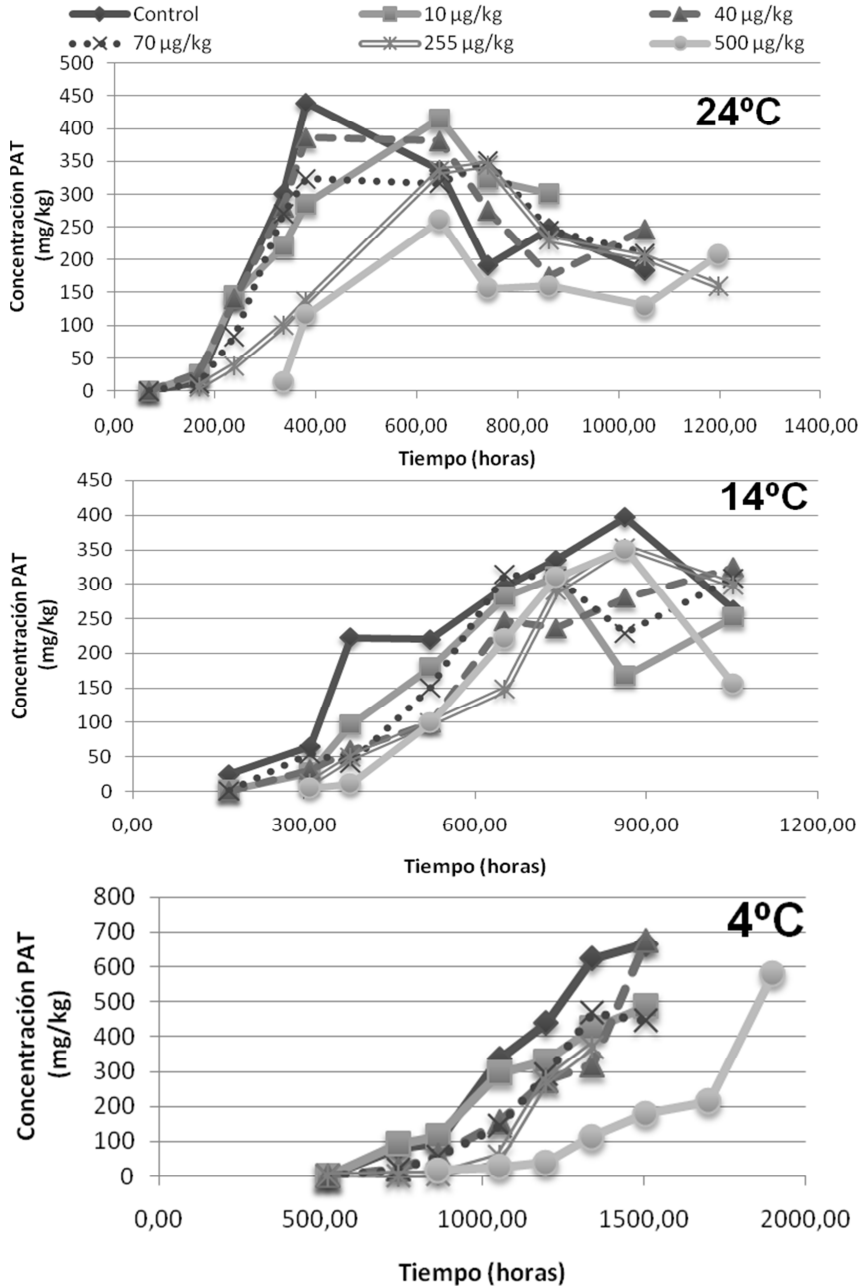


Figura 28. Evolución del nivel de PAT (mg/Kg) en los cultivos del aislado Pe7 de *Penicillium expansum* en ADA con a_w 0.99, a varias temperaturas y diferentes niveles de sulfato de imazalil.

Cuando se aplicó el test de Tukey–HSD al 95% en el medio ADA, se observaron similitudes a las obtenidas en el medio PDA. Con respecto a la a_w se obtuvieron dos agrupamientos formados uno por 0.93 y 0.96 y otro por 0.99, observándose una mayor acumulación de PAT/superficie cuando la a_w aumentaba. En el estudio de la concentración de sulfato imazalil se observaron varios grupos entrelazados entre sí, observándose una menor cantidad de PAT/superficie de la colonia a medida que los niveles de fungicida en el medio se incrementaban. En el caso de la temperatura, no existe un desdoblamiento evidente entre grupos, aunque a la temperatura de 14°C se produce una pequeña disminución en la acumulación de PAT/superficie de la colonia con respecto a las otras dos temperaturas ensayadas. Para finalizar, el factor tiempo produjo un ligero aumento de acumulación de PAT/superficie de la colonia a medida que el tiempo transcurre.

Tabla 23. Acumulación de PAT (mg/Kg) en el medio de cultivo a base de manzana (ADA) en el decimoquinto día desde el inicio del crecimiento del aislado Pe7 de *Penicillium expansum* en función de concentración de sulfato de imazalil, a_w y temperatura.

Concentración de sulfato de imazalil ($\mu\text{g/Kg}$)	a_w								
	0.93			0.96			0.99		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	4	14	24	4	14	24	4	14	24
0	ND	ND	ND	ND	0.005	ND	0.923	222	438
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.062	97.8	285
40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.279	59.8	386
70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.571	41.1	323
255	NC	ND	ND	NC	ND	ND	ND	44.7	146
500	NC	NC	NC	NC	NC	NC	ND	100	124

NC no se observa crecimiento fúngico; ND por debajo del límite de detección.
n=2

Los posibles modelos para la acumulación de PAT se calcularon en función de los parámetros estudiados mediante análisis de regresión múltiple. Las ecuaciones que mejor se adaptaron según los distintos medios PDA y ADA fueron respectivamente:

$$\begin{aligned} \log(\text{acumulación de PAT en medio PDA}) = & -740.042 + \\ & + 9.114 \times 10^{-4} \times t + 1469.061 \times a_w + 0.2741 \times T - 3.14552 \times [\text{imazalil}] - \\ & - 729.721 \times (a_w)^2 - 0.006847 \times (T)^2 + 3.19303 \times [\text{imazalil}] \times a_w \quad [\text{Ec. 7}] \end{aligned}$$

Donde, T es la temperatura en °C y t es el tiempo en horas desde el inicio del crecimiento, la concentración de fungicida viene dada en $\mu\text{g/Kg}$.

El valor estadístico r^2 (0.6988) indica que el modelo explica adecuadamente el 69.9% de la variabilidad en la acumulación de PAT en el medio producida por la cepa estudiada. Como resultado este modelo no

explicaría completamente la evolución de la producción de PAT en las condiciones estudiadas.

$$\begin{aligned} \log(\text{acumulación de PAT en medio ADA}) = & 2169.35 + 0.007393 \times t - \\ & - 4617.04 \times a_w + 0.353 \times T - 9.3 \times 10^{-4} \times [\text{imazalil}] - 2.125 \times 10^{-6} \times (t)^2 + \\ & + 2446.32 \times (a_w)^2 - 0.00573 \times (T)^2 - 1.678 \times 10^{-4} \times t \times T \end{aligned} \quad \text{[Ec. 8]}$$

Donde, T es la temperatura en °C y t es el tiempo en horas desde el inicio del crecimiento y la concentración de sulfato de imazalil viene expresada en µg/Kg.

El modelo propuesto explica el 96.0% de la variabilidad en la acumulación de PAT en el medio ADA producido por el aislado ensayado según el valor de r² de 0.9600).

La resistencia de los *Penicillium* a los fungicidas y particularmente a la familia de los benzimidazoles como el tiabendazol es debido principalmente a un uso inadecuado en la utilización de fungicidas que, por un proceso de selección natural, puede producir la aparición de poblaciones resistentes, lo que provoca el aumento de la dosis de fungicida con el consecuente aumento de residuos, costos y peligro para la salud humana y el medio ambiente. Ello, también es el motivo por el cual se están buscando nuevos productos contra la podredumbre producida por *Penicillium* spp. Por lo general, el tiabendazol era comúnmente utilizado para el control de enfermedades post-cosecha en manzana, pero la resistencia generada por *P. expansum* a los fungicidas del grupo de los benzimidazoles (benomilo y tiabendazol) los hicieron inadecuados para el control del moho azul (Bertrand y Saulie-Carter 1978, Errampalli 2004, 2006, Rosenberger y Meyer 1979). Posteriormente, se utilizó la difenilamina generalmente combinada con fungicidas como un pretratamiento de almacenamiento y que se utilizaba como agente para el control de la escaldadura. La difenilamina inhibía la resistencia de las cepas de *P. expansum* a los benzimidazoles con lo que el tiabendazol podía controlar los aislados de *Penicillium* (Rosenberger y Meyer 1985, Rosenberger *et al.* 1991). Actualmente, la mayoría de aislados de *P. expansum* son resistentes a la combinación de difenilamina-tiabendazol debido a los continuos tratamientos efectuados (Sholberg *et al.* 2005b, Errampalli *et al.* 2006, Li y Xiao 2008). Por tanto, en la actualidad se han buscado nuevos fungicidas como ciprodinil, fludioxonil y pirimetanil para ser utilizados en el tratamiento post-cosecha de manzana. Estos fungicidas fueron efectivos en el control del moho azul, incluyendo aislados resistentes al tiabendazol (Errampalli y Crnko 2004, Errampalli 2004, Shoberg *et al.* 2005a). Finalmente, para mantener los fungicidas como el imazalil como control efectivo contra el moho azul de manzana será necesario un uso moderado para no generar resistencias en los hongos (Sholberg *et al.* 2005b).

Algunos autores han constatado que ciertos fungicidas como captán, carbendazima y bupirimato estimulan la producción de PAT en relación al crecimiento de hongo en determinados aislados de *P. expansum*, sin embargo en otras cepas de la misma especie no se observó este incremento

del metabolito secundario. Con otros fungicidas (vinclozolin, metalaxil-M, micobutanil) la producción de PAT apareció inalterada aunque se redujo el crecimiento de los hongos. Esto puede tener implicaciones para el control de la roña en la fruta por *Penicillium* spp. El hecho de que los efectos sean específicos de cada cepa, hacen que el control de la especie sea más compleja (Russell y Paterson 2006). Sin embargo, a partir de la experiencia desarrollada en este trabajo con el aislado de *P. expansum* estudiado no se observó una estimulación de la producción de PAT en ninguno de los dos medios de cultivo estudiados, ni a altas ni a bajas concentraciones de fungicida. Florianowicz (1991) tampoco observó una posible estimulación de producción de PAT por bajas concentraciones de mancozeb, iprodiona, metil tiofanato, y oxiclóruo de cobre.

Según varios autores (Baert *et al.* 2007, Drusch y Ragab 2003), la velocidad de crecimiento y la producción de PAT en las cepas de *P. expansum* están influenciadas por muchos factores medioambientales y factores endógenos típicos del sustrato. Dos de los factores más importantes son a_w y temperatura, aunque la atmósfera controlada y el pH también tienen una gran influencia (Northolt *et al.* 1978, McCallum *et al.* 2002). Según Baert *et al.* (2007), el crecimiento está fuertemente influenciado por la temperatura mientras que no afecta el uso de la atmósfera controlada. Por otro lado la producción de PAT depende de la temperatura y del nivel de oxígeno. Sin embargo el uso de condiciones estimulantes o supresoras de la producción de PAT depende de la cepa. En general, establecieron que niveles intermedios de estrés estimulan la producción de PAT, mientras que bajas temperaturas a 1°C y niveles de O₂ al 1% reducen la producción de PAT. Estos autores observaron que la máxima velocidad de crecimiento o inicio de crecimiento se produjo a 25°C, en un ensayo realizado entre 2°C y 30°C, aunque obtuvieron valores no significativos entre 16–30°C para la velocidad de crecimiento y en tiempos de inicio de crecimiento entre 10–30°C. Sin embargo, cuando la superficie de la colonia en la placa era de 45 cm² para cada inóculo estudiado, los resultados de acumulación máxima de PAT que se obtuvieron fueron diferentes; un inóculo producía el máximo de PAT a una temperatura de 1°C, otro cuando la temperatura era de 20°C, y otros a valores intermedios entre 4 y 10°C en una experiencia realizada entre 1–20°C. Como se ha comprobado en este trabajo dichas variables (temperatura, a_w) pueden influenciar en la velocidad de crecimiento y en la acumulación de PAT. Además, Paster *et al.* (1995) investigaron la capacidad de producción de PAT en tres cepas de *P. expansum* en manzanas y peras a varias temperaturas (0, 3, 6, 17 y 25°C), uno de los aislados no produjo PAT ni a 0°C y ni a 25°C mientras que los otros dos produjeron PAT a cualquier la temperatura ensayada, siendo la máxima producción de PAT a 25°C en peras mientras que en manzanas se produjo a 17°C. En nuestro caso, la máxima velocidad de crecimiento se obtuvo a una temperatura de 24°C y la máxima producción de PAT se obtuvo en cualquiera de las temperaturas ensayadas a una a_w de 0.99, para el aislado de *P. expansum* estudiado, que concuerda con los datos dados por Baert *et al.* (2007).

En este estudio, se observó que la producción máxima de PAT no está limitada directamente por la temperatura sino indirectamente debido a la dificultad de crecer a bajas temperaturas. Un ejemplo se obtiene de los resultados aportados por Errampalli (2006) donde utilizó fludioxonil contra la germinación conidial y el crecimiento micelial de aislados sensibles y resistentes al tiabendazol de *P. expansum*, en manzanas dañadas e inoculadas de la variedad Empire y Gala siendo efectivo durante 6 días a 20°C (Errampalli 2004). Mientras el fungicida también produjo control de protección contra el moho azul durante más de 62 días en la variedad Empire a 4°C (Errampalli y Crnko 2004).

En una experiencia realizada por Morales *et al.* (2008a) en la que se comparó el crecimiento y la capacidad de producir PAT por los aislados de *P. expansum* encontrados en una industria de procesamiento de manzanas durante los periodos de 2004 y 2005 según los factores de a_w , temperatura y resistencia al imazalil, obtuvieron como resultado que las dos poblaciones estudiadas de *P. expansum*, una en cada periodo, presentaron poca tolerancia a valores bajos de a_w , sin observar una variabilidad importante de esta característica entre los aislados de cada población. También indicaron que el crecimiento varía dependiendo del tipo de medio. Además, se indicó que la temperatura óptima para producir mayor acumulación de PAT por los aislados de *P. expansum* era de 25°C, a pesar de que el periodo de incubación de los aislados fue mayor a 10°C que a 25°C con una diferencia de 9 días. Por tanto, el almacenamiento de manzana a temperatura ambiente puede permitir una fuerte acumulación de PAT en cortos periodos antes de que sean procesadas las manzanas. Por otro lado, el imazalil no fue completamente eficaz en la prevención del crecimiento del hongo en medio PDA durante el periodo 2004, debido a que el 15% de los aislados estudiados presentaron algún grado de resistencia al imazalil; sin embargo, para los aislados estudiados en el 2005 este fungicida fue completamente eficaz.

Pitt y Hocking 1997 han indicado que *Penicillium expansum* es un hongo que crece incluso por debajo de 0°C. Así, un almacenamiento a bajas temperaturas no es suficiente para evitar el crecimiento del moho azul, a pesar de que puede crecer el hongo, Morales *et al.* (2007) no detectaron PAT en frutas almacenadas a 1°C, sólo fue evidente en frutas almacenadas a 20°C. Este mismo grupo de trabajo (Morales *et al.* 2008b) estudió como afectaba la temperatura en la etapa de inicio de crecimiento, velocidad de crecimiento y producción de PAT en manzanas inoculadas por *P. expansum*, como resultado se obtuvo que la etapa de inicio del crecimiento se incrementaba considerablemente a bajas temperaturas (2.72 días a 20°C vs 28.8 días a 1°C), mientras la velocidad de crecimiento disminuía (1.83 cm/día a 20°C vs 0.155 cm/día a 1°C). También se mostró que a 1°C, la acumulación de PAT fue significativamente menor que a 20°C (33.33 ng/g vs 91.66 ng/g). Aunque el inicio del crecimiento y la velocidad de crecimiento presentaron similitudes con nuestros resultados, sin embargo, en el caso de la acumulación de PAT, los resultados obtenidos por estos autores difieren en algunos aspectos con los obtenidos en la experiencia desarrollada en este trabajo. En el presente estudio la máxima producción

de PAT no se obtuvo a 25°C sino que no se observan valores significativos entre las distintas temperaturas ensayadas. Estas diferencias, debidas principalmente a la acumulación de PAT a distintas temperaturas, pueden ser debidas al sustrato utilizado, Morales *et al.* (2008a) trabajaron con frutas y en nuestro estudio se utilizaron medios de cultivo preparados y además como se ha constatado anteriormente por diversos autores, cada aislado de *P. expansum* sigue una pauta distinta al resto de aislados de la misma especie bajo las mismas condiciones de estudio.

5. Diseño y aplicación de modelos de superficie de respuesta para la predicción de la producción de deoxinivalenol por *Fusarium graminearum* y de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* en trigo

5.1 Producción de deoxinivalenol en trigo por *F. graminearum*

5.1.1 Análisis de la varianza

Se realizó un análisis de la varianza de la acumulación de DON en trigo en función de las variables independientes: diámetro de disco de inóculo, tiempo, temperatura y a_w . Los resultados indicaron que todas las variables son estadísticamente significativas (valor- $p < 0.05$). A continuación se realizó el test de Tukey-HSD a un nivel de confianza de 95% para las distintas variables estudiadas. El valor más elevado de acumulación de DON se presentó a una a_w de 0.98 que indica un nivel de humedad elevado, mientras a a_w más bajas los niveles de la toxina alcanzan valores relativamente bajos. Para el factor tiempo, se observó un incremento de la concentración de DON a medida que aumentaba el tiempo, al principio, el aumento de la cantidad de DON fue suave, después ese incremento fue más acusado y al final de la experiencia, los valores de DON aumentan más lentamente. Este comportamiento sería el que haría posible aplicar el modelo de RS-Baranyi para el análisis por superficies de respuesta. Para la variable diámetro de disco de inóculo, se observó una mayor acumulación de DON con un valor de 1.1 cm mientras la menor cantidad de DON se registró cuando la colonia presentó 0.7 cm. Por último, se observó un mayor incremento de DON a temperaturas de 20°C, seguido por las experiencias a 25°C y al final por las de 15°C.

5.1.2 Modelos predictivos para la acumulación de deoxinivalenol en trigo

Para la ejecución de los modelos predictivos, las réplicas de los valores de concentración de DON se promediaron en cada experimento. En la matriz de datos, los niveles resultantes fueron considerados como variable independiente.

5.1.2.1 Modelo de RS-Baranyi

Las ecuaciones proporcionadas por el programa macro DMFit divide el comportamiento de los hongos con respecto a la producción de toxina en tres etapas. La etapa inicial, como se ha explicado en la Sección Experimental 5.3.3, es paralela al desarrollo de los hongos en el sustrato (granos de trigo). Su duración es variable dependiendo de los valores seleccionados para cada factor estudiado. La acumulación de DON durante este estado es indeterminada, esto significa que su nivel puede variar pero está por debajo del LOQ (0.020 µg/g). Como no se puede proporcionar un valor entre cero y el LOQ, para este intervalo se determinó usar arbitrariamente cero en el tratamiento matemático. Por tanto, las

ecuaciones para este estado son: concentración DON = 0 para tiempo de 0 a t_I , donde t_I es el tiempo donde empieza la segunda fase y es proporcionada por el programa DMFit. La Ecuación 9 establece la duración de este estado (etapa inicial) como una combinación lineal de los tres factores estudiados. El valor de t_I es calculado como el tiempo de inicio.

$$t_I = 10 \wedge [-55.1876 + 60.2822 \times (a_w)^2 - 5.9280 \times a_w \times D - 84.5932 \times a_w \times T + 38.3773 \times (a_w)^2 \times T + 0.26105 \times a_w \times (T)^2 + 5.3040 \times D + 0.02169 \times D \times T + 45.9347 \times T - 0.253691 \times (T)^2] \text{ [Ec. 9]}$$

Donde, T es la temperatura de experimentación en °C y D es el diámetro de disco de inóculo utilizado en cm y el tiempo de inicio (t_I) viene expresado en días.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 97.85% de la variabilidad en $\log(t_I)$. El r^2 ajustado que es más adecuado para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 91.41%.

En la Tabla 24 están representados los valores de tiempo iniciales obtenidos de las ecuaciones de Baranyi para cada combinación ensayada. En ella, se puede comprobar que el tiempo de inicio de la acumulación suele estar entre 10 y 32 días en las condiciones de estudio. De las combinaciones (-1.-1.-1) y (-1.-1.1) no se obtuvo ningún resultado de acumulación, por lo que no se pudieron obtener las ecuaciones de Baranyi. A estas combinaciones corresponden los ensayos con un diámetro de disco de inóculo y a_w más bajos. El máximo tiempo de inicio de acumulación de DON se obtuvo para la combinación (0.-1.0) el cual corresponde a una a_w mínima de 0.94.

Los coeficientes de determinación obtenidos para las distintas ecuaciones de Baranyi (Tabla 24), se ajustan bastante bien a los datos obtenidos. Las ecuaciones con valores inferiores de r^2 de 0.9, se corresponden con las que producirán un mayor error en el modelo.

Después de obtener las ecuaciones de Baranyi y los valores de t_I , se utilizó la regresión múltiple para ajustar dichos valores a la ecuación [Ec. 9], válida para todo el intervalo de condiciones consideradas. De todas las regresiones múltiples ensayadas, la que dio mejores resultados y por tanto mejor representa el tiempo de la fase 1 fue la que se calcula por la Ecuación 9.

Al aplicar la regresión múltiple, algunos parámetros, como el diámetro del disco inoculado, no fueron estadísticamente significativos (valor- $p > 0.05$). Sin embargo no se han obviado, debido a que el coeficiente de determinación disminuye considerablemente, indicando un peor ajuste del modelo. En este caso, lo que se pretendió no fue eliminar el mayor número de parámetros, sino que la ecuación obtenida se ajustara lo mejor posible a los valores obtenidos por las ecuaciones de Baranyi.

Tabla 24. Periodo inicial previo al inicio de la producción de DON (fase 1), velocidad de producción de DON (fase 2) y máximo nivel de DON (fase 3) en cultivos del aislado c21d32 de *Fusarium graminearum* mediante aplicación de las ecuaciones de Baranyi para cada combinación ensayada. Para cada ecuación se indica el coeficiente de determinación.

Combinación probada	Tiempo fase 1 (días)	Velocidad de producción en fase 2 ($\mu\text{g/g}\cdot\text{día}$)	Máximo nivel de DON en fase 3 (ng/g)	r^2
-1.-1.-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
-1.-1.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
-1.0.0	10.5143	0.0265	0.1431	0.9474
-1.1.0	26.8762	0.2725	2.63	0.9775
-1.1.1	21.5817	0.1726	3.2407	0.9783
0.-1.0	32.2321	0.013	0.0411	0.6834
0.0.-1	10.6403	0.0245	0.1812	0.7349
0.0.0 ^a	9.8734	0.0797	0.1969	0.7491
0.0.1	9.7158	0.0136	0.1938	0.9569
0.1.0	21.2604	0.5591	9.01	0.9917
1.-1.-1	15.6789	0.0051	0.0699	0.9428
1.-1.1	28.8577	0.0136	0.14	0.9998
1.0.0	12.8238	0.01186	0.211	0.8913
1.1.-1	18.5483	0.3098	1.79	0.9897
1.1.1	22.7186	0.4936	4.45	0.9915

N.D: no determinado

a) por cuadruplicado, resto por duplicado

De la representación tridimensional de la Ecuación 9 se obtiene la RS del tiempo de inicio de la acumulación de DON por el modelo de Baranyi (Figura 29). Como existe una variable independiente y tres variables dependientes no es posible representar en un único diagrama todas las RS, por lo que se ha representado la variable independiente (t_i) frente a dos parámetros independientes (a_w y T), manteniendo la tercera variable fija (D).

De la representación gráfica (Figura 29) se puede deducir, independientemente del diámetro del disco que constituye el inóculo y de la temperatura, que existe un tiempo mínimo de inicio de producción para un valor de a_w próximo a 0.96, y sufre un retardo al aumentar o disminuir la a_w , siendo mayor el retardo cuando la a_w decrece. De hecho, en las combinaciones ensayadas (-1.-1.-1) y (-1.-1.1), para las que no se produce DON, el modelo necesitaría un tiempo de inicio tan elevado que no se llega a observar la producción de DON.

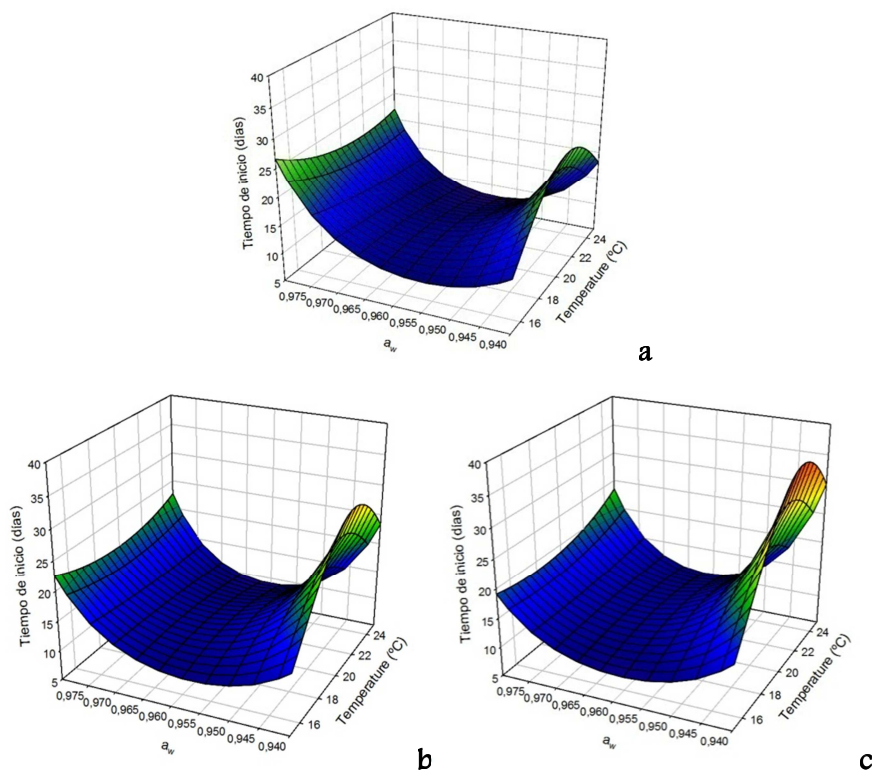


Figura 29. Representación de las superficies de respuesta obtenidas de las ecuaciones de Baranyi para el tiempo de la fase 1 frente a a_w y temperatura a diferentes valores de diámetro de disco (inóculo) para la predicción de la producción de DON en trigo por c21d32 (aislado *Fusarium graminearum*). a) 0.7 cm; b) 1.1 cm; c) 1.5 cm.

La segunda etapa está asociada, como previamente se ha indicado, con un rápido incremento en la acumulación de toxina en el cultivo. Este incremento se observó en varias series experimentales, pero en algunas donde el valor de a_w fue 0.94 no se observó, esto está de acuerdo con otros trabajos (Hope *et al.* 2005).

En la Tabla 24 además del t_I también están representados los valores de velocidad de acumulación de DON en la segunda fase obtenidos de las ecuaciones de Baranyi para cada combinación experimental estudiada. Se comprueba que la velocidad de acumulación de DON suele estar comprendida entre 0.01 y 0.56 $\mu\text{g/g}\cdot\text{día}$ en las condiciones de ensayo. La máxima pendiente o velocidad de acumulación se obtuvo para la combinación (0.1.0), mientras la mínima se obtuvo para la combinación (1.0.0).

Después de obtener las ecuaciones de Baranyi y los valores de velocidad de acumulación se utilizó la MLR para ajustar esos valores a una ecuación válida para todo el intervalo de condiciones ensayadas. La Ecuación 10

representa el modelo que mejor se ajusta a los valores obtenidos en las ecuaciones de Baranyi.

La Ecuación 10 proporciona el valor de la velocidad de acumulación durante la fase 2. Se asume que la velocidad es la pendiente máxima de los gráficos concentración DON vs tiempo y se asemeja a los diagramas de crecimiento de microorganismos vs tiempo.

$$\begin{aligned} \text{Velocidad de acumulación} = & [675.17 - 1244.32 \times a_w + 563.84 \times (a_w)^2 + \\ & + 15.581 \times a_w \times T + 14.096 \times a_w \times D - 0.3793 \times a_w \times (T)^2 - 14.932 \times T + \\ & + 0.3625 \times (T)^2 - 14.262 \times D + 0.034 \times D \times T] \end{aligned} \quad \text{[Ec. 10]}$$

La velocidad de acumulación viene expresada en $\mu\text{g/g}\cdot\text{día}$, mientras temperatura (T) esta expresada en $^{\circ}\text{C}$ y diámetro de disco de inóculo (D) en cm.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 99.09% de la variabilidad en velocidad de acumulación. El r^2 ajustado que es más adecuado para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 96.34 %.

De la representación de la Ecuación 10 se obtiene el gráfico RS del método de Baranyi (Figura 30) para la velocidad de acumulación. Debido a que para la aplicación de la ecuación es necesario una variable independiente y tres dependientes no es posible representar en una única figura todas las RS, por lo que se ha representado la variable independiente (velocidad de acumulación) frente a dos parámetros independientes (a_w y T), manteniendo la otra variable constante (D).

La velocidad de acumulación tiene tendencia a ser máxima a a_w elevadas (0.98) y temperaturas moderadas (20–25 $^{\circ}\text{C}$). (Figura 30). En estas condiciones de velocidad de acumulación máxima, también se observan velocidades ligeramente superiores cuando el tamaño de inóculo es más grande. Por otro lado para a_w bajas la velocidad de acumulación tiende a ser lenta.

De los valores de acumulación y utilizando las ecuaciones de Baranyi se pueden determinar los valores de t_1 y t_2 para cada combinación testada, siendo t_2 el límite de la segunda etapa donde se obtiene la acumulación máxima.

En la Tabla 24, se encuentran los resultados de la acumulación máxima de DON, para la cepa ensayada. Los valores detectados oscilan entre 0.04 y 9.01 $\mu\text{g/g}$ según las condiciones de estudio. La máxima acumulación se obtuvo para la combinación ensayada de (0.1.0) que coincide con el valor máximo obtenido de la pendiente de acumulación de la fase 2, mientras la mínima acumulación de la fase 3 se obtuvo para la combinación (0.–1.0).

En este caso, también se utilizó la regresión múltiple para ajustar los valores de las ecuaciones de Baranyi en una sola ecuación (Ec. 11) válida para todo el intervalo de condiciones ensayadas. Así pues, los resultados encontrados por la Ecuación 11 son los que mejor se ajustan a los valores obtenidos en las ecuaciones de Baranyi. En el modelo obtenido la variable

independiente diámetro de disco de inóculo no aparece, por tanto la acumulación máxima no depende de dicha variable.

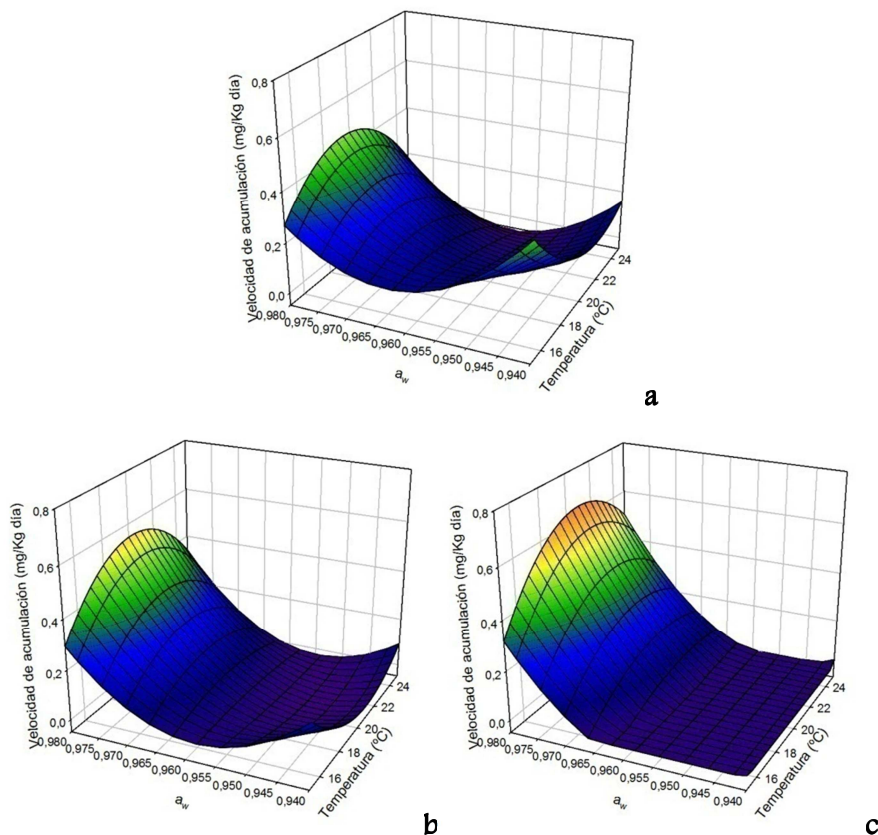


Figura 30. Representación de las superficies de respuesta obtenidas de las ecuaciones de Baranyi para la velocidad de acumulación de DON durante la fase 2 frente a a_w y temperatura a diferentes diámetros de inóculo para la predicción de DON en trigo por c21d32 (aislado *Fusarium graminearum*). a) 0.7; b) 1.1; c) 1.5 cm.

En la última fase se toma en consideración mantener constante la cantidad de micotoxina expresada como producción máxima. La acumulación máxima viene dada por:

$$\begin{aligned} \text{Acumulación máxima} = & 10 \wedge [279.349 - 292.221 \times a_w + \\ & + 60.822 \times (a_w)^2 \times T - 81.5567 \times a_w \times T - 0.88418 \times a_w \times (T)^2 + \\ & + 22.2841 \times T + 0.847814 \times (T)^2] \end{aligned} \quad \text{[Ec. 11]}$$

La acumulación máxima viene expresada en $\mu\text{g/g}$, mientras temperatura (T) esta expresada en $^{\circ}\text{C}$.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 99.40% de la variabilidad en $\log(\text{acumulación máxima})$. El r^2 ajustado que es más adecuado para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 98.79%.

De la representación de la superficie de respuesta, se observa que para a_w y temperaturas bajas el valor de acumulación máxima es muy pequeño, observándose un aumento a medida que se aumenta a_w , y se obtiene el máximo a una a_w de 0.98 y T del orden de 21°C independientemente del tamaño de inóculo (Figura 31).

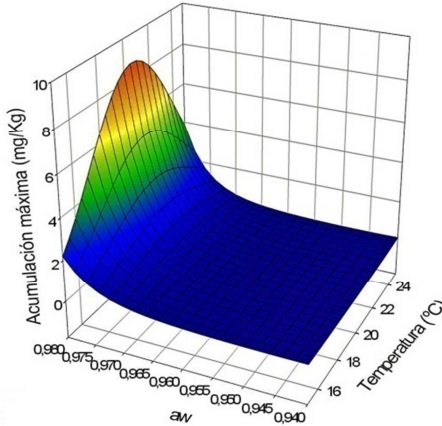


Figura 31. Representación de la superficie de respuesta obtenida de las ecuaciones de Baranyi para la acumulación máxima de DON en la fase 3 frente a a_w y temperatura, independientemente del diámetro de disco de inóculo para la predicción de DON en trigo por c21d32 (aislado *Fusarium graminearum*).

En trabajos previos de Llorens *et al.* (2004), se ha comprobado cual es la temperatura más adecuada para la producción de DON en granos de maíz. Los resultados indicaron que la temperatura más adecuada de las ensayadas fue de 28°C para la producción de DON seguida de la de 20°C. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores como Miller (1994) y Miedaner y Perkowski (1996). Versonder *et al.* (1982) mostraron que la producción óptima de DON en maíz por una cepa de *F. graminearum* con una a_w de 0.99 durante 40 días era de 29–30°C. Otros autores (Ramírez *et al.* 2006) observaron que la máxima producción de DON ocurre a 30°C en grano de trigo. Las variaciones observadas en los diferentes estudios, sin duda se deben a que se han realizado con diferentes cepas.

Por otro lado, varios estudios han indicado que la producción de DON se incrementa con el contenido de humedad en el sustrato, al igual que ocurre en esta experiencia (Miller 1994, Mateo *et al.* 2001, Ramírez *et al.* 2006).

Una vez establecidos las diferentes fases de la ecuación se toma la siguiente consideración para el cálculo de acumulación de DON:

Fase 1: de 0 a t_1 (fase en la que no se detecta DON en el medio)

Acumulación de micotoxina = 0

Fase 2: de t_1 a t_2 (de t_1 a t_1 + acumulación máxima/velocidad de acumulación)

Acumulación de micotoxina = (tiempo - t_1) × Velocidad de acumulación

Fase 3: de t_2 en adelante (mayor de t_1 + acumulación máxima/velocidad de acumulación)

Acumulación micotoxina = acumulación máxima

Una vez calculado el valor de la acumulación de la toxina se realiza la representación de las superficies de respuesta en función de las variables a estudio (Figura 32).

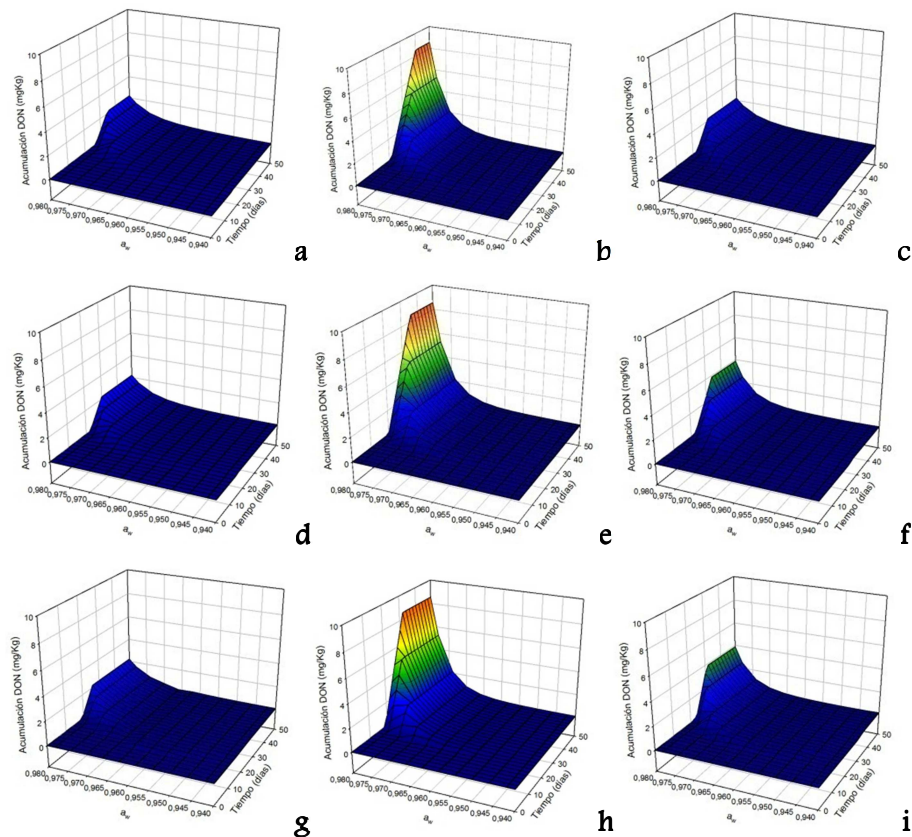


Figura 32. Representación de las superficies de respuesta obtenidas mediante las ecuaciones de Baranyi para la acumulación de DON en trigo por c21d32 (aislado *Fusarium graminearum*) frente a tiempo y a_w para diferentes valores de diámetro de disco de inóculo y temperatura. a) 0.7 cm, 15°C; b) 0.7 cm, 20°C; c) 0.7 cm, 25°C; d) 1.1 cm, 15°C; e) 1.1 cm, 20°C; f) 1.1 cm, 25°C; g) 1.5 cm, 15°C; h) 1.5 cm, 20°C; i) 1.5 cm, 25°C.

Las superficies de respuesta obtenidas para la acumulación de DON en trigo se representan en la Figura 32. En todas ellas, se observa una silueta similar. A tiempos y a_w bajos no se observa acumulación de micotoxina y a medida que transcurre el tiempo, se observa un aumento del valor de acumulación, siendo muy poco observable para valores bajos de a_w , mientras que para a_w elevadas se observa un incremento sustancial de la acumulación de DON. Por último, los últimos días se observa un valor

constante del valor de la acumulación que coincide con la fase 3, donde se supone que la acumulación de toxina es constante. En todos los casos, se presentó el valor máximo de toxina a una temperatura de 20°C y un valor de 0.98 para a_w (Figura 32b, 32h, 32h), mientras el valor mínimo de acumulación máxima se obtuvo a una temperatura de 15°C en las mismas condiciones de a_w (0.98) (Figura 32a, 32d, 32g). Por otro lado, no se observaron diferencias de acumulación independientemente del tamaño de inóculo.

5.1.2.2 Modelo de RS–MLR

La mejor información proporcionada por el programa Statgraphics utilizando la regresión lineal múltiple sobre el comportamiento de los hongos con respecto a la producción de toxina viene dada en la Ecuación 12.

$$\begin{aligned} \text{Acumulación de micotoxina} = & 10^{\wedge} [-4216.31 + 74.5167 \times t + \\ & + 1573.22 \times D + 8709.28 \times a_w - 4502.03 \times (a_w)^2 - 8.02 \times 10^{-4} \times (t)^2 - \\ & - 0.0067 \times (T)^2 - 3247.53 \times a_w \times D + 0.280 \times a_w \times T - 155.4151 \times a_w \times t + \\ & + 1675.92 \times (a_w)^2 \times D + 81.0976 \times (a_w)^2 \times t] \end{aligned} \quad \text{[Ec. 12]}$$

La acumulación de toxina viene expresada en $\mu\text{g/g}$, mientras temperatura (T) esta expresada en °C, el tiempo (t) en días y el diámetro de disco de inóculo (D) en cm.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 87.93% de la variabilidad en $\log(\text{acumulación de micotoxina})$. El r^2 ajustado que es más adecuado para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 86.40%. El coeficiente de determinación obtenido mediante la regresión múltiple es inferior a 0.9 por lo que su aproximación a los valores obtenidos presentarían un error que puede ser considerable.

En la representación de las superficies de respuesta (Figura 33) se observan formas geométricas similares a las obtenidas por el método de Baranyi, en el que se observaba valores de toxina mínimos a tiempos iniciales y a_w bajos, mientras que a medida que aumentaba el tiempo, esa acumulación de DON también aumentaba, siendo mucho mayor para a_w elevadas. En este caso, los valores de acumulación continúan creciendo durante el tiempo, a diferencia del modelo de Baranyi en el que se alcanzaba un valor máximo constante. Para este modelo, los mayores valores se obtuvieron a 20°C y a_w de 0.98, como en el de Baranyi. También se puede indicar que en el modelo de Baranyi la acumulación máxima de micotoxina era independiente del diámetro de disco de inóculo, sin embargo por el método de MLR, la acumulación depende del inóculo, y se observa que a medida que aumenta el tamaño de inóculo también lo hace la acumulación de DON (Figuras 33b, 33e, 33h). La menor acumulación de DON se obtiene a la temperatura de 15°C y diámetro de disco de inóculo de 0.7 cm para a_w 0.98 y tiempo de 55 días (Figura 33a).

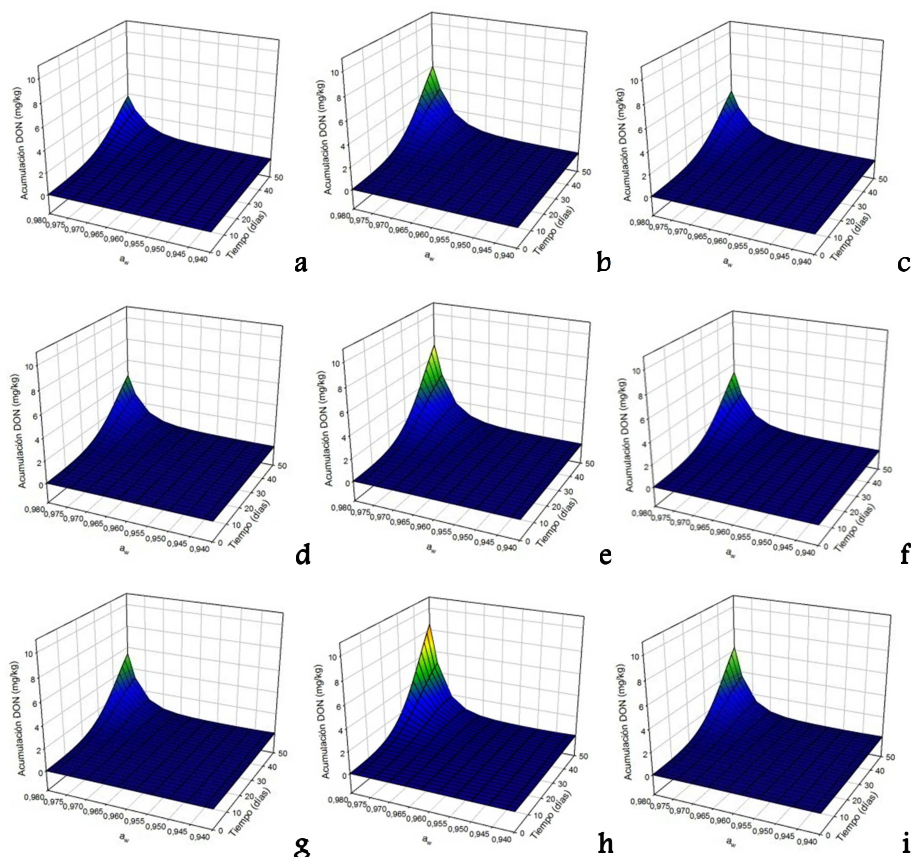


Figura 33. Representación de las superficies de respuesta obtenidas mediante regresión múltiple para la acumulación de DON en trigo por c21d32 (aislado *Fusarium graminearum*) en función de a_w y tiempo a diferentes diámetros de inóculo y temperaturas. a) 0.7 cm, 15°C; b) 0.7 cm, 20°C; c) 0.7 cm, 25°C; d) 1.1 cm, 15°C; e) 1.1 cm, 20°C; f) 1.1 cm, 25°C; g) 1.5 cm, 15°C; h) 1.5 cm, 20°C; i) 1.5 cm, 25°C.

5.1.2.3 Validación de modelos predictivos para la acumulación de deoxinivalenol

En este caso, se desarrollaron como estrategias para la validación, la calculada sobre la misma colección de datos y la validación cruzada.

Las estadísticas de validación que se calculan sobre la misma colección de datos que se utilizan para construir el modelo, conlleva la desventaja de que no explica los efectos de sobremedida, por realizar la serie arbitrariamente al modelo compacto, pudiendo hacer el valor de la función arbitrariamente pequeño. En el caso extremo de interpolación de modelos compactos, el valor de cada función puede ser igual a cero o muy pequeño. Sin embargo, lo que se debería de calcular no es la capacidad de interpolar sino la capacidad de predecir mediante el modelo.

Para poder validar más correctamente, es necesario que se pueda desempeñar una validación cruzada o mediante pruebas con una colección de datos independiente de la que se utilizó para obtener el modelo predictivo. Para ello, primero se divide el conjunto de datos en dos conjuntos distintos. Un conjunto de estimación, usado para seleccionar la función de predicción y otro conjunto de validación usado para probar o validar dicha función. La motivación de esta división está en validar la función sobre un conjunto de datos diferente al empleado para estimar los parámetros. Una desventaja importante de este último procedimiento es que se debe desarrollar un tiempo extra para el trabajo experimental.

En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos en las distintas validaciones de los modelos predictivos estudiados. El SEP fue menor utilizando el modelo predictivo de Baranyi frente al modelo de regresión múltiple, en el caso de la validación sobre la misma colección de datos fue de 42.5% y 156.0%, respectivamente. Por tanto, el modelo que mejor refleja los datos observados frente a los predichos fue el modelo predictivo de Baranyi. También se puede indicar que la validación mediante la colección de datos produce menor error que la validación cruzada, como es lógico debido a que no explica los efectos de sobremedida como se ha comentado anteriormente.

Tabla 25. Validación de los modelos aplicados para la predicción de DON.

Modelo	Validación cruzada		Validación sobre los mismos datos	
	RMSE	SEP (%)	RMSE	SEP (%)
RS-Baranyi	0.42858	75.6	0.21698	42.5
RS-MLR	1.04003	127.3	0.79685	156.0

RMSE: raíz cuadrada del error cuadrático medio

SEP: error estándar de la predicción

En el modelo predictivo de Baranyi, los valores de SEP calculados son algo elevados, 75.6% y 42.5% para la validación cruzada y la validación sobre los mismos datos, respectivamente. Sin embargo, aunque presentan un error relativamente grande reflejan bastante bien el comportamiento del hongo en la acumulación de micotoxina. El error puede ser debido a que la acumulación de micotoxina no llega a alcanzar un valor constante como se ha supuesto en la fase 3 del modelo de Baranyi, sino que es posible que el hongo utilice al metabolito secundario como nutriente cuando empiezan a escasear los otros nutrientes del medio generando variaciones en la cantidad de micotoxina. En los ensayos realizados, se pudo observar pequeñas variaciones de acumulación durante el tiempo.

*5.2 Acumulación de ocratoxina A en trigo por inoculación de *A. ochraceus**

5.2.1 Análisis de la varianza

El análisis de la varianza realizado a la variable concentración de OTA en función de los factores de estudio: tiempo, concentración de esporas, temperatura y a_w a un nivel de confianza del 95%, indicó que todas las variables excepto la concentración de esporas tienen efectos significativos sobre la variable dependiente. Por tanto, la concentración de esporas inicial no va a tener una influencia significativa en el resultado final de la acumulación de OTA. La aplicación de test de Tukey–HSD a un nivel de confianza de 95% sobre las distintas variables indicaron que el aumento de temperatura influye aumentando la cantidad de OTA, registrándose los mayores valores de OTA a 25°C. Para la a_w , el test de Tukey–HSD indicó que un aumento de a_w favorece la producción de OTA. Por último, se observó un aumento de la acumulación con el transcurso del tiempo, pero esta vez al principio fue un aumento lento, a continuación fue algo más acusado y al finalizar parece que se mantuvo constante o incluso empezó a disminuir tímidamente, no siendo significativa esta disminución.

5.2.2 Modelos predictivos para la acumulación de ocratoxina A en trigo

En la ejecución de los modelos predictivos, las réplicas de los valores de concentración de OTA se promediaron para cada experimento ensayado. Los niveles resultantes fueron considerados como variable independiente en la matriz de los datos.

5.2.2.1 Modelo de RS–Baranyi

Para cada combinación ensayada de concentración de suspensión de esporas, a_w y temperatura de incubación, se aplicó el programa DMFit para hallar una curva que se ajuste al par de valores tiempo–concentración de OTA siguiendo el modelo de Baranyi. Sin embargo, los conceptos cinéticos aplicados al crecimiento microbiano mediante el método de Baranyi como tiempo de inicio, velocidad de crecimiento y población máxima alcanzada no tienen sentido en la producción de micotoxina, con lo que estos parámetros cinéticos fueron solamente relacionados con la producción de micotoxina. Por ello, estos parámetros de tiempo de inicio, velocidad de crecimiento y población máxima se asociaron respectivamente a las fases 1, 2 y 3 de acumulación de OTA generada por el hongo. Durante la fase 1 el nivel de OTA está por debajo del LOD o es ligeramente más alto a este valor por tanto se puede suponer que la producción de micotoxina es despreciable (por debajo del límite de cuantificación del método que es de 0.03 ng/g). Durante la fase 2, el hongo produce OTA rápidamente y fue, en algunos casos, difícil de determinar adecuadamente la velocidad de producción debido a que los intervalos de tiempo de análisis del cultivo se separaron por días y no por espacios de tiempo más cortos. En la mayoría de los experimentos los niveles de OTA pasaron rápidamente de ser valores indetectables a ser muy elevados, dependiendo de las condiciones de

ensayo. Con el tiempo, estos valores de OTA, permanecerán supuestamente estables, que correspondería a la fase 3. Esta última fase, está asociada con el periodo donde la acumulación es máxima y completa el periodo de tiempo probado (40 días). No se estudió la correlación entre el crecimiento de micelio en los granos de trigo y la acumulación de OTA debido a la imposibilidad de medir el peso del micelio.

El análisis de la superficie de respuesta se computó por el programa informático Statgraphics, en el que se obtuvieron ecuaciones multilineales relacionadas con los niveles de OTA en función de las siguientes variables: concentración de suspensión de esporas (inóculo), a_w , temperatura de incubación y tiempo. Los diagramas tridimensionales sólo permiten fijar los valores de dos parámetros, por lo que los demás parámetros independientes se tuvieron que mantener constantes en el estudio.

En la Tabla 26 están representados los valores de tiempo de inicio de la acumulación de OTA, obtenidos de las ecuaciones de Baranyi para cada combinación probada durante la primera fase. Se puede comprobar que el tiempo de inicio de la acumulación está entre 3 y 24 días en las experiencias estudiadas de (1.1.1) y (0.0.1), respectivamente. Estos resultados son inferiores a los obtenidos en la cepa de *F. graminearum* para la determinación de la acumulación de DON que fueron de 10 a 32 días aunque, la experiencia se realizó en otras condiciones de ensayo (Sección 5.1). El mínimo tiempo de inicio se obtuvo para la combinación probada (1.1.1) el cual corresponde a los máximos valores de los parámetros estudiados de concentración de esporas (10000 esp/g), a_w (0.99) y temperatura (25°C).

Los coeficientes de determinación obtenidos (Tabla 26) para las distintas ecuaciones de Baranyi difieren bastante del valor ideal de 1, por lo que el modelo no se va a ajustar perfectamente a los valores obtenidos en la experiencia.

A continuación se procede a la utilización de la regresión múltiple para ajustar a una ecuación, los valores de inicio de acumulación de toxina (t_i) obtenidos de las ecuaciones de Baranyi, y que es válida para todo el intervalo de condiciones estudiadas [Ec. 13]. De todas las regresiones múltiples ensayadas, la que proporcionó mejores resultados y es la que mejor representa el tiempo de la fase 1 está indicada como Ecuación 13.

$$t = 10 \wedge [-86.767 + 7.0967 \times T + 120.791 \times a_w - 0.0314869 \times C - 23.664 \times (a_w)^2 - 2.553 \times 10^{-8} \times (C)^2 - 0.17448 \times (T)^2 + 0.0669964 \times a_w \times C - 8.101 \times a_w \times T - 4.408 \times 10^{-6} \times C \times T - 0.0352204 \times (a_w)^2 \times C + 0.19966 \times (a_w) \times (T)^2] \quad [\text{Ec. 13}]$$

Donde T es la temperatura de experimentación en °C y C la concentración de la suspensión de esporas utilizado en esporas/g, t_i viene expresado en días.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 96.49% de la variabilidad en log(tiempo de inicio). El r^2 ajustado que es más adecuado

para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 83.60%.

Tabla 26.. Valores obtenidos de tiempo de la fase 1, velocidad de producción en la fase 2 y máximo nivel en la acumulación de OTA mediante las ecuaciones de Baranyi para cada combinación ensayada. También se indica el coeficiente de determinación obtenido para cada ecuación.

Combinación probada	Tiempo fase 1 (días)	Velocidad de producción en fase 2 (ng/g·día)	Máximo nivel de OTA en fase 3 (ng/g)	r ²
-1.-1.-1	13.8129	727.1753	2303.9327	0.6623
-1.-1.1	14.4961	806.987	7947.1898	0.6617
-1.0.0	5.5298	155.6411	4879.582	0.7654
-1.1.0	9.1731	478.7047	8176.4911	0.3487
-1.1.1	13.4275	2864.6638	8820.3533	0.9063
0.-1.0	13.6811	325.9095	2164.1876	0.9413
0.0.-1	22.0898	301.6219	3475.3077	0.7775
0.0.0 ^a	10.5193	807.6463	4738.212	0.7634
0.0.1	23.8397	787.6588	7945.1664	0.6021
0.1.0	4.3338	465.7122	8205.8229	0.7440
1.-1.-1	8.3306	567.0544	4306.2185	0.5481
1.-1.1	5.4367	183.0111	3645.7329	0.8844
1.0.0	10.6035	511.3981	9832.3243	0.6447
1.1.-1	10.9696	558.7123	6645.2024	0.8650
1.1.1	3.3705	402.4589	9010.7494	0.4587

a) por cuadruplicado, resto por duplicado

De la MLR, se pudo observar, que algunos parámetros como a_w^2 no son estadísticamente significativos (valor- $p > 0.05$). Sin embargo no se han eliminado, debido a que el coeficiente de determinación disminuía considerablemente, y por tanto se obtenía un mayor error en el ajuste del modelo. En este caso, se buscó una ecuación que representará, lo más fielmente posible, los valores obtenidos por las ecuaciones de Baranyi y no eliminar el mayor número de parámetros.

De la representación de la Ecuación 13 se obtienen las gráficas de RS del método de Baranyi para el tiempo de la fase 1 (Figura 34). Debido a la existencia de una variable independiente y tres variables dependientes no es posible representar en sólo una figura la RS, por lo que se ha representado la variable independiente (t_i) frente a dos parámetros independientes (a_w y T), manteniendo la otra variable como constante (C).

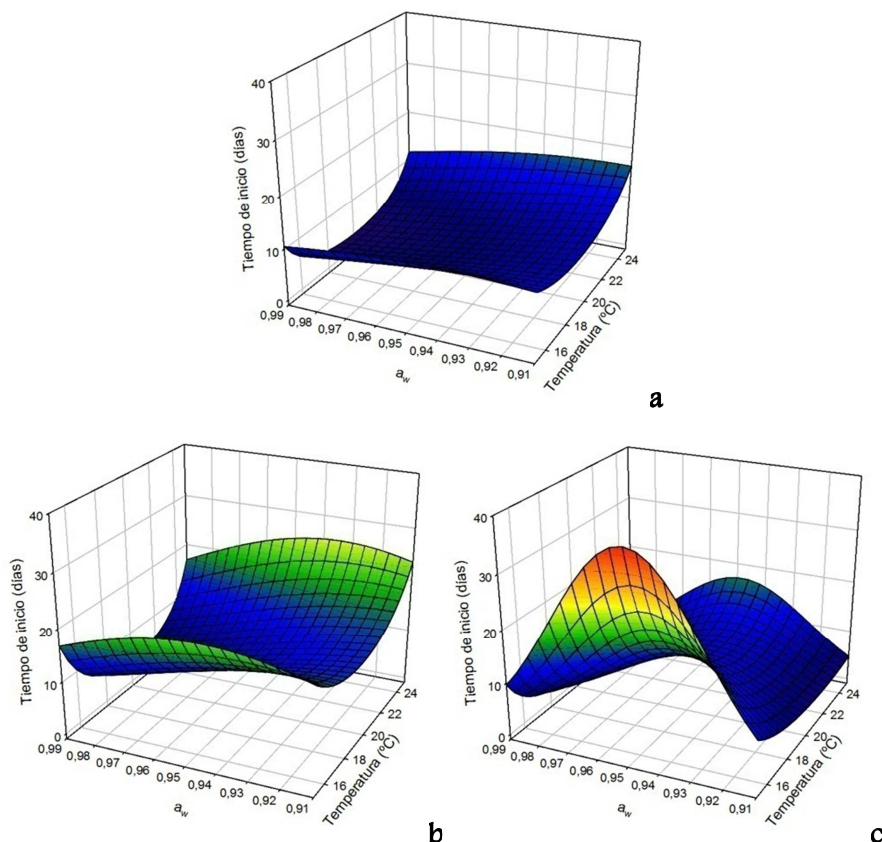


Figura 34. Representación de las superficies de respuesta obtenidas a partir de las ecuaciones de Baranyi para el tiempo de la fase 1 frente a a_w y temperatura a diferentes concentraciones de suspensión de esporas para la determinación de la acumulación de OTA en cultivos de Aso2 (aislado *Aspergillus ochraceus*. a) 100 esp/g; b) 1000 esp/g; c) 10000 esp/g.

De la representación del gráfico de la Figura 34, se puede observar, independientemente de la concentración de inóculo, un tiempo de inicio mínimo a una T sobre 20°C y un retardo al aumentar o disminuir la T siendo mayor ese retardo de inicio de producción cuando la T fue, por lo general, incrementada. También se observa que ese aumento del incremento del tiempo de inicio aumenta con el tamaño de inóculo.

Posteriormente se realizó el estudio de la segunda etapa o fase que está relacionada con un aumento rápido en la acumulación de toxina en el cultivo.

En la Tabla 26 están representados los valores obtenidos de velocidad de acumulación en la segunda fase de las ecuaciones de Baranyi para cada combinación ensayada. Se puede comprobar que la velocidad de acumulación de OTA suele estar entre 156 y 2860 ng/g día para las condiciones utilizadas. La máxima pendiente se obtuvo para la

combinación ensayada (-1.1.1), mientras la mínima se obtuvo para la combinación (-1.0.0).

Se utilizó la regresión múltiple, después de obtener las ecuaciones de Baranyi y los valores de velocidad de acumulación, para ajustar esos valores a la Ecuación 14 válida para todo el intervalo de condiciones ensayadas y describe el modelo que mejor se ajusta a los valores obtenidos en las ecuaciones de Baranyi.

La Ecuación 14 proporciona el valor de la velocidad de acumulación durante el periodo de la segunda fase. En esta variable velocidad se asume que la pendiente máxima de los gráficos concentración DON *vs* tiempo, sea semejante a los diagramas de crecimiento de microorganismos *vs* tiempo.

$$\text{Velocidad de acumulación} = 10^{\wedge} [135.668 - 0.4363 \times T - 269.148 \times a_w - 0.0374672 \times C + 140.037 \times (a_w)^2 + 0.0792781 \times a_w \times C - 7.562 \times 10^{-6} \times C \times T - 0.0417358 \times (a_w)^2 \times C + 0.0126 \times a_w \times (T)^2] \quad \text{[Ec. 14]}$$

La velocidad de acumulación viene expresada en ng/g-día, mientras temperatura (T) esta expresada en °C y concentración de suspensión de esporas (C) en esporas/ g de trigo.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 76.27% de la variabilidad en log(velocidad de acumulación). El r^2 ajustado, que es más adecuado para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 44.63%.

Si se representa la Ecuación 14 se obtiene el gráfico de RS del método de Baranyi para la velocidad de acumulación (Figura 35). Debido a que para la aplicación de la ecuación es necesario cuatro dimensiones (una variable independiente y tres dependientes), no fue posible representar en una sola figura todas las RS, por lo que se representó la variable independiente (velocidad de acumulación) frente a dos parámetros independientes (a_w y T), manteniendo fija la otra variable (C).

La velocidad de acumulación tuvo tendencia a ser máxima a a_w y temperaturas elevadas (0.99 y 25°C) y a ser mínima a a_w y temperaturas bajas (0.91 y 15°C) para una concentración de esporas de 100 y 1000 esp/g (Figura 35). Sin embargo, a una concentración de esporas de 10000 esp/g la forma de la gráfica difiere totalmente de las anteriores siendo máximo a temperaturas bajas y a_w medias (15°C y 0.95), aunque los valores de velocidad máximos fueron inferiores a los valores máximos obtenidos en los gráficos anteriores, y los valores mínimos se obtuvieron a a_w bajas (Figuras 35a y 35b).

De los datos de acumulación se pueden determinar los valores de t_1 y t_2 . Donde t_2 es el límite de la segunda etapa a partir de donde se obtiene la acumulación máxima.

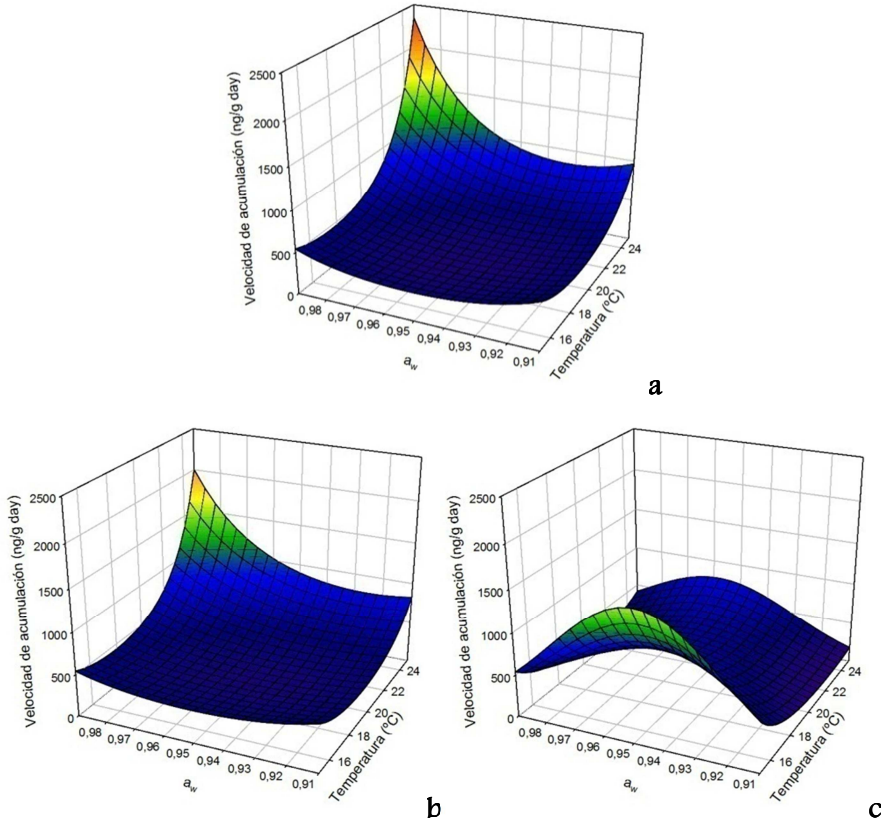


Figura 35. Representación de las superficies de respuesta obtenidas de las ecuaciones de Baranyi para la velocidad de acumulación de la fase 2 frente a a_w y temperatura a varias concentraciones de suspensión de esporas para la determinación de la acumulación de OTA en cultivos de Aso2 (aislado *Aspergillus ochraceus*). a) 100 esp/g; b) 1000 esp/g; c) 10000 esp/g.

En la Tabla 26, se observa que la acumulación máxima de OTA suele estar, para la cepa productora de OTA ensayada, entre 2160 y 9800 ng/g en las condiciones utilizadas. La máxima acumulación se obtuvo para la combinación probada (1.0.0), mientras la mínima acumulación en la fase 3 se obtuvo para la combinación (0.-1.0).

Con la ayuda de la regresión múltiple y los valores de velocidad de acumulación obtenidos de las ecuaciones de Baranyi se obtuvo una ecuación [Ec. 15] válida para todo el intervalo de condiciones estudiadas. En este caso, la variable inóculo (expresado como concentración de esporas) sí que aparece en la ecuación, cosa que no ocurría en la ecuación de acumulación máxima para la determinación de DON en el apartado anterior (Sección 5.1.1).

En la última fase, como se ha indicado anteriormente, se considera mantener constante la cantidad de micotoxina expresada como producción

máxima. La Ecuación 15 permite obtener la acumulación máxima de OTA para la cepa estudiada:

$$\begin{aligned} \text{Acumulación máxima} = & 10^{[47.7325 - 5.30688 \times T - 45.3582 \times a_w -} \\ & - 0.0190561 \times C + 0.137927 \times (T)^2 + 0.04031732 \times a_w \times C +} \\ & + 5.44793 \times a_w \times T - 2.8622 \times 10^{-6} \times C \times T - 0.02122431 \times (a_w)^2 \times C -} \\ & - 0.140889 \times a_w \times (T)^2] \end{aligned} \quad \text{[Ec. 15]}$$

La acumulación máxima viene expresada en ng/g, mientras la temperatura (T) esta expresada en °C y la concentración de suspensión de esporas (C) en esporas/g de trigo.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 87.94% de la variabilidad en $\log(\text{acumulación máxima})$. El r^2 ajustado, que es más adecuado para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 66.23%.

De la representación de la Ecuación 15 se obtuvo la Figura 36.

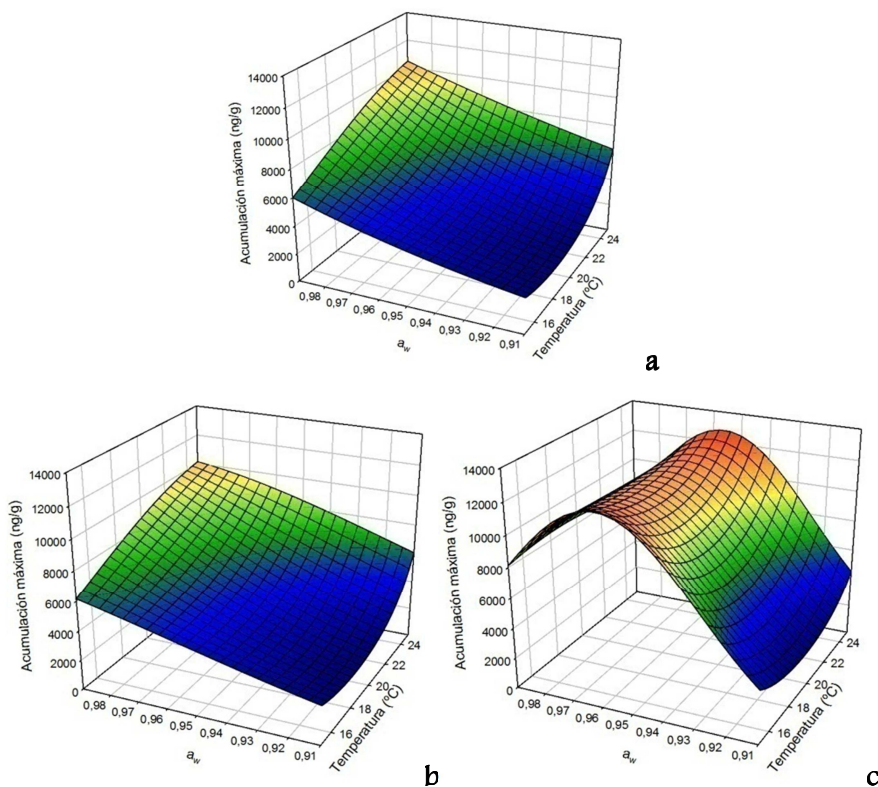


Figura 36. Representación de las superficies de respuesta obtenidas a partir de las ecuaciones de Baranyi para la acumulación máxima de OTA en la fase 3 frente a a_w y temperatura para varias concentraciones de suspensión de esporas para la determinación de la acumulación de OTA en cultivos de Aso2 (aislado *Aspergillus ochraceus*). a) 100 esp/g; b) 1000 esp/g; c) 10000 esp/g.

En la Figura 36, se observan dos gráficos totalmente diferentes, los que contienen una concentración de suspensión de esporas de 100 y 1000 esp/g, los cuales presentan un máximo de acumulación de OTA para temperaturas y a_w altas y una acumulación mínima a temperaturas y a_w bajas (Figuras 36a y 36b) y por otro lado, a concentración de suspensión de esporas de 10000 esp/g que presenta un máximo prácticamente independiente de la T a a_w intermedias (0.96–0.97), siendo su valor máximo, superior al valor obtenido por los dos casos anteriores (Figura 36c). Por el contrario, los valores de acumulación máxima de la toxina con el máximo tamaño de inóculo fueron también obtenidos a temperaturas y a_w bajas.

Pardo *et al.* (2004) analizaron tres cepas de *A. ochraceus* a diferentes temperaturas desde 10°C hasta 30°C y a_w desde 0.90 a 0.99. La a_w mínima encontrada para la producción de OTA fue de 0.90, sin embargo, otros autores encontraron producción de OTA a valores de 0.80–0.87 (Adebajo *et al.* 1994, Kozakiewicz y Smith 1994, Northolt *et al.* 1979). En las condiciones estudiadas en este trabajo la cepa produce OTA a a_w de 0.91 aunque en muy poca cantidad, como se observa en la Figura 36. Northolt *et al.* (1979) encontraron el nivel óptimo de a_w , para producción de OTA por aislados de *A. ochraceus*, a 0.99 en medios de cultivo de extracto de malta y de Czapek maíz, estos resultados se obtuvieron en sustratos artificiales y podrían no representar con precisión la capacidad real de crecimiento del hongo en un sustrato natural, de hecho se ha sugerido que según las diferentes fuentes de nutrientes pueden afectar bajando el a_w mínima necesaria para el crecimiento del hongo (Wearing y Burgess 1979), pudiendo estar más dispuesto en medios artificiales, por tanto podría influenciar en la producción de OTA. Según distintos autores, se encontró que el nivel de a_w a 0.98–0.99 es el óptimo para la producción de OTA en granos de cebada (Pardo *et al.* 2004, Ramos *et al.* 1998). Estos datos concuerdan con los obtenidos en este estudio, donde se concluye que a una a_w máxima a 0.99 con poca cantidad de inóculo constituyen las mejores condiciones para la producción de OTA (Figuras 36a, 36b).

Además, Pardo *et al.* (2004) encontraron una cepa que producía OTA a 10°C a una a_w de 0.95 aunque la concentración de toxina producida fue baja. Sin embargo, otros autores no observan producción de OTA por aislados de *A. ochraceus* a 10°C, en cultivos líquidos (Sansing *et al.* 1973) ni en granos de cebada autoclavados (Häggbloom 1982, Damoglou *et al.* 1984). Esto sugiere que la temperatura es un factor crítico que influye de manera importante en la producción del metabolito secundario, esto se puede observar perfectamente en la Figura 36a y 36b.

También, Pardo *et al.* (2004) indicaron que las condiciones óptimas para producción de OTA por tres aislados de *A. ochraceus* en cebada fueron a a_w de 0.99 y 30°C, siendo la producción de OTA marcadamente inferior para a_w 0.95 y 30°C. A 20°C sólo se producía OTA a a_w 0.99 y 0.95 para dos aislados mientras el otro aislado producía OTA a 0.90. A 10°C, sólo uno de los dos aislados que producía a 20°C y a a_w 0.99 y 0.95, produce OTA a a_w de 0.95. Más recientemente, Abdel-Hadi y Magan (2009) han observado

que la producción óptima de OTA es producida a a_w 0.99, para especies de *A. steynii* a 30 °C, para *A. westerdijkiae* a 25°C y para *A. ochraceus* a 20°C; mientras que con un estrés de a_w de 0.95, la temperatura de producción máxima de OTA cambiaba, para *A. steynii* y *A. westerdijkiae* a 35°C, y para *A. ochraceus* a 25°C. En nuestro estudio, las condiciones óptimas para la producción de OTA en medios con poca cantidad de inóculo (condiciones normales en la naturaleza), fueron a a_w 0.99 y temperatura de 25°C, que fueron los valores máximos de ensayo.

Hägglblom 1982 observó, en uno de los dos aislados de *A. ochraceus* estudiados, diferencias en la producción de OTA según la cantidad de esporas inoculadas, encontrando mayor cantidad de toxina en los medios con mayor concentración de esporas. Esto puede evidenciar que el inóculo del aislado de *A. ochraceus* puede influir en la acumulación de OTA, como ocurre en nuestro estudio.

Una vez establecidas las diferentes fases de la ecuación se toma la siguiente secuencia para el cálculo de acumulación de OTA:

Fase 1: de 0 a t_1 (fase en la que no se detecta OTA en el medio)

Acumulación de micotoxina = 0

Fase 2: de t_1 a t_2 (de t_1 a t_1 + acumulación máxima/velocidad de acumulación)

Acumulación de micotoxina = (tiempo - t_1) × Velocidad de acumulación

Fase 3: de t_2 en adelante (mayor de t_1 + acumulación máxima / velocidad de acumulación)

Acumulación micotoxina = acumulación máxima

Las superficies de respuesta obtenidas se representan en la Figura 37. Para la concentración de esporas de 100 y 1000 esp/g (Figuras 37a–37f) se observa un comportamiento bastante similar: al inicio del tiempo la acumulación de micotoxina es mínima y al poco tiempo empieza a aumentar hasta que se estabiliza a un valor de toxina máxima, que permanece constante. También se observa que a medida que a_w es mayor la acumulación máxima también aumenta y cuando se incrementa la temperatura es mayor la cantidad de OTA en la matriz.

Por otro lado, cuando se trabaja en las condiciones de concentración de esporas de 10000 esp/g, el comportamiento de las superficies de respuesta a través del tiempo es el mismo que los anteriores, al principio, la acumulación de micotoxina es mínima o indetectable y con el tiempo aumenta hasta que llega a un máximo. Sin embargo, para estas condiciones se pueden encontrar otras dos posibilidades. La primera cuando la temperatura es de 15°C en donde se observa que a a_w medias (0.94–0.96), la acumulación de toxina crece muy poco, debido a que el modelo indica que el inicio de crecimiento en estas condiciones es grande. Pero en condiciones de a_w elevadas o bajas, aumenta la acumulación considerablemente (Figura 37g). En la segunda situación, si la T es de 20 ó

25°C se observa el efecto contrario, aumenta más la acumulación en OTA a a_w intermedios (0.95) que a a_w bajos o elevados (Figuras 37h, 37i).

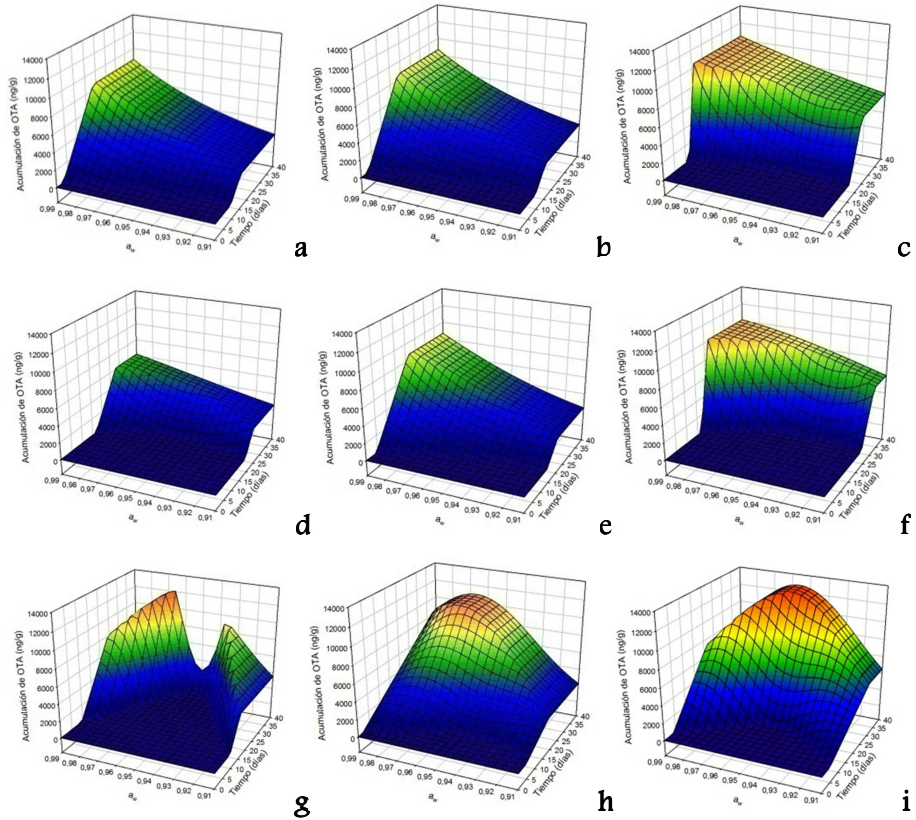


Figura 37. Superficies de respuesta obtenidas mediante las ecuaciones de Baranyi para la acumulación de OTA frente a a_w , tiempo, tamaño del inóculo y temperatura en cultivos de Aso2 (aislado *Aspergillus ochraceus*). a) 100 esp/g, 15°C; b) 100 esp/g, 20°C; c) 100 esp/g, 25°C; d) 1000 esp/g, 15°C; e) 1000 esp/g, 20°C; f) 1000 esp/g, 25°C; g) 10000 esp/g, 15°C; h) 10000 esp/g, 20°C; i) 10000 esp/g, 25°C.

5.2.2.2 Modelo de RS-MLR

La mejor ecuación proporcionada por el programa Statgraphics sobre el comportamiento de los hongos con respecto a la producción de toxina está indicada en la Ecuación 16.

$$\begin{aligned} \text{Acumulación de micotoxina} = & 10^{\wedge} [1319.68 - 47.553 \times T - \\ & - 14.5327 \times t + 3.53 \times 10^{-4} \times C - 2798.09 \times a_w + 1471.09 \times (a_w)^2 - \\ & - 0.012619 \times (t)^2 - 0.0220 \times (T)^2 + 101.777 \times a_w \times T + 31.1876 \times a_w \times t + \\ & + 1.3845 \times 10^{-4} \times (t)^3 - 3.646 \times 10^{-4} \times (a_w)^2 \times C - 53.356 \times (a_w)^2 \times T - \\ & - 15.9632 \times (a_w)^2 \times t + 8.02 \times 10^{-4} \times (T)^2 \times t - 0.03351 \times a_w \times T \times t] \quad [\text{Ec. 16}] \end{aligned}$$

La acumulación de toxina viene expresada en ng/g, mientras temperatura (T) esta expresada en °C y concentración de suspensión de esporas (C) en esporas/g trigo.

El r^2 indica que el modelo, como está construido, explica el 68.07% de la variabilidad en log(acumulación de micotoxina). El r^2 ajustado que es más adecuado para la comparación de modelos con diferentes número de variables independientes, es 64.17%. El coeficiente de determinación obtenido mediante la regresión múltiple es inferior a 0.9 por lo que su aproximación a los valores obtenidos presentarían un error que puede ser bastante considerable.

La representación de las superficies de respuesta se muestra en la Figura 38.

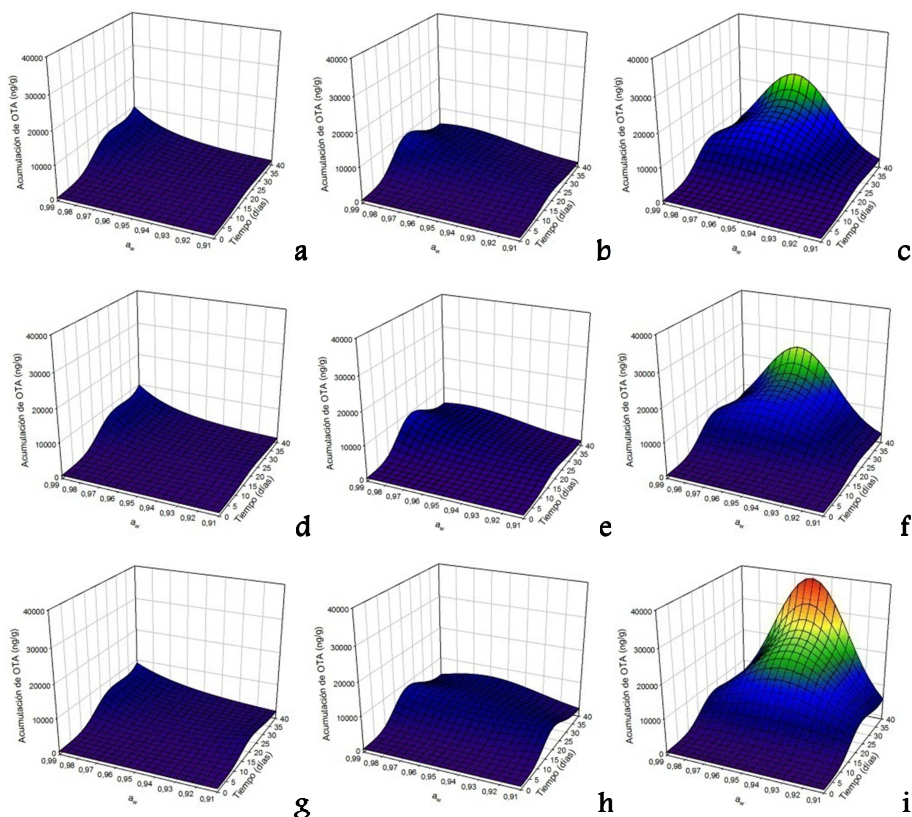


Figura 38. Representación de superficies de respuesta obtenidas mediante regresión múltiple para la acumulación de OTA en trigo en función de a_w , tiempo, tamaño del inóculo y temperaturas en cultivos de Aso2 (aislado *Aspergillus ochraceus*). a) 100 esp/g, 15°C; b) 100 esp/g, 20°C; c) 100 esp/g, 25°C; d) 1000 esp/g, 15°C; e) 1000 esp/g, 20°C; f) 1000 esp/g, 25°C; g) 10000 esp/g, 15°C; h) 10000 esp/g, 20°C; i) 10000 esp/g, 25°C.

Las gráficas que se obtienen son bastante distintas aunque se pueden agrupar por su distribución en el espacio en tres grupos. El primero sería aquel donde la T es de 15°C e independientemente del inóculo, el máximo

de OTA se presenta a a_w y tiempos elevados (Figuras 38a, 38d, 38g). Un segundo grupo se presenta cuando la temperatura de trabajo es de 20°C, en este caso, la máxima acumulación de toxina ocurre también en medios con a_w elevadas, pero a tiempos de incubación de 30 días, sufriendo un ligero descenso posteriormente (Figuras 38b, 38e, 38h). Por último, a T de 25°C la máxima acumulación de la toxina tiene lugar a a_w intermedias y tiempos grandes (Figuras 38c, 38f, 38i). La máxima acumulación, para este modelo, se obtiene a a_w 0.95, tiempo de 40 días, T de 25°C y C 10000 esp/g. También se puede indicar que los valores de acumulación máxima de toxina en condiciones de 25°C son muy superiores a los valores máximos obtenidos, según este modelo, a temperaturas de 15 y 20°C. Si se comparan las RS con las obtenidas mediante el modelo de Baranyi, se observa que las gráficas tienen formas totalmente diferentes según el resultado obtenido de los respectivos modelos. Las únicas superficies de respuesta que muestran un aspecto similar para ambos modelos aparecen en los cultivos a T 25°C y concentración de esporas de 10000 esp/g de trigo (Figuras 37i y 38i).

5.2.2.3 Validación de modelos predictivos para la acumulación de ocratoxina A

Por último se procede a la validación de los dos modelos utilizados para predecir la acumulación de OTA. Como en el caso de la acumulación de DON, se usaron como estrategias para la validación, la calculada sobre la misma colección de datos y la validación cruzada.

Los datos obtenidos en las distintas validaciones de los modelos predictivos se muestran en la Tabla 27. El SEP fue menor utilizando el modelo predictivo de Baranyi frente al modelo de regresión múltiple, para ambos tipos de validación. Por tanto, el modelo que mejor refleja los datos observados frente a los predichos fue el modelo predictivo de Baranyi. Sin embargo dado los valores de SEP elevados, 84.3% y 66.3% para la validación cruzada y la validación sobre los mismos datos respectivamente, se puede indicar que el modelo no refleja satisfactoriamente el proceso de acumulación de OTA. Esto es debido a que en el proceso de acumulación producida por un hongo en un sustrato como es el caso del trigo, no llega a ser constante, como se ha supuesto en la fase 3 del modelo de Baranyi, sino que sufre unas variaciones producidas por la escasez de otros nutrientes en el medio, entonces, los hongos pueden consumir sus propios metabolitos secundarios y producir un decrecimiento de los niveles de estos metabolitos. Así, el nivel del metabolito secundario en la tercera fase sería relativamente alta pero bastante variable en función de la producción y consumo de dichas toxinas. En la experiencia, se observaron que estas variaciones de acumulación sufridas durante la experiencia fueron bastante elevadas.

Tabla 27. Validación de los modelos aplicados para la predicción de OTA

Modelo	Validación cruzada		Validación sobre los mismos datos	
	RMSE (ng/g)	SEP (%)	RMSE (ng/g)	SEP (%)
RS-Baranyi	2862.8	84.3	2255.2	66.3
RS-MLR	4325.5	127.4	3067.3	90.1

RMSE: raíz cuadrada del error cuadrático medio

SEP: error estándar de la predicción

6. Optimización de la metodología para la determinación de ocratoxina A, tricotecenos B y de patulina en cereales y frutas. Análisis de muestras alimentarias

Para la aplicación de la metodología propuesta se ha llevado a cabo un estudio comparativo de los distintos métodos empleados para la determinación de tricotecenos tipo B en trigo, de OTA en harina de trigo y derivados y de PAT en derivados de manzana. Los resultados obtenidos en dicho estudio, que se presentan a continuación, han permitido establecer metodologías para la determinación de OTA, tricotecenos tipo B y PAT en el análisis de muestras alimenticias.

6.1 Determinación de tricotecenos tipo B en trigo

Para desarrollar los distintos métodos de determinación de tricotecenos que se proponen se utilizaron muestras de trigo y de harina de trigo procedentes de diferentes comercios, que no contenían tricotecenos tipo B a niveles detectables según el método de Langseth *et al.* (1999).

6.1.1 Procedimientos de purificación por SPE

Los métodos de purificación para tricotecenos tipo B en trigo que han sido ensayados en este trabajo proporcionaron recuperaciones muy diferentes dependiendo del procedimiento y el tipo de cartucho de SPE utilizado. En todos los casos, la determinación de las micotoxinas se llevó a cabo por GC-ECD utilizando una columna HP-5, previa derivatización con PFFA. Los resultados mostrados en la Tabla 28 indicaron que las mejores recuperaciones se obtuvieron cuando la muestra se purificó con MycoSep 225®, con el cartucho con relleno de alúmina-carbón activo-C₁₈ (opción c) y con el cartucho de alúmina-carbón activo-silica. En estos protocolos, el proceso es generalmente sencillo y rápido debido a que el extracto es transferido directamente al vial para concentrar y derivatizar posteriormente sin otra operación previa. Entre estos tres procedimientos, la columna MycoSep 225 proporcionó los mejores resultados en términos de recuperación para el DON, 3-ADON y 15-ADON. En el caso de NIV, el mejor resultado se obtuvo con el cartucho que contenía alúmina-carbón activo-C₁₈ (opción c). Entre los adsorbentes que contiene el material empaquetado de la columna de MycoSep 225, están incluidos: el carbón activo, el Celite 545 y la resina de intercambio iónico, obteniéndose con esta columna valores de recuperación de cerca del 90% para el DON y alrededor del 75% para el NIV, 3-ADON y 15-ADON. Otros autores que han utilizado este tipo de columna (Langseth *et al.* 1999) indicaron una recuperación media de 88 y 70% de DON y NIV respectivamente al añadir 0.400 mg de cada micotoxina/Kg de muestra de trigo, siendo las recuperaciones obtenidas similares a las encontradas en este trabajo. Sin embargo, la principal desventaja de esta columna con respecto a los cartuchos realizados en el laboratorio que contienen alúmina-carbón

activo-C₁₈ o alúmina-carbón activo-silica es su elevado coste. Cuando se utilizaron los cartuchos preparados en el laboratorio las recuperaciones variaron aproximadamente entre 73–87% para el DON, 102–110% para NIV y 58–70% para 3- y 15-ADON dependiendo del procedimiento de purificación aplicado. Otros autores (Mirocha *et al.* 1998, Tacke y Casper 1996) han encontrado recuperaciones medias cercanas al 100% para el DON, en muestras de cebada contaminadas con 0.5 y 1.0 mg de DON/Kg usando cartuchos que contenían alúmina-carbón activo-C₁₈.

Tabla 28. Influencia del procedimiento de purificación en la recuperación de los tricotecenos tipo B en trigo (contaminado con 1.0 mg de micotoxina/Kg) mediante GC utilizando una columna HP-5. Solo se añadió una micotoxina en cada experimento de recuperación. La derivatización se realizó con PFPA.

Columna de SPE	Tricoteceno							
	DON		NIV		15-ADON		3-ADON	
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)
Mycosep 225	89.6	8.3	75.6	7.8	75.1	8.9	72.6	9.4
Cartucho de Florisil	55.1	16.0	70.7	21.3	68.2	10.4	66.6	8.0
Mezcla Celite 545-alúmina-carbón activo (con desgrasado previo del extracto)	42.2	34.4	47.3	16.2	29.0	14.3	21.8	16.7
Mezcla Celite 545-alúmina-carbón activo (sin desgrasado previo del extracto)	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
Alúmina-carbón activo	131.9	58.0	121.0	25.5	103.9	28.5	108.5	43.3
Alúmina- (a) carbón activo-C ₁₈ (b)	72.8	10.2	102.7	11.9	64.1	10.6	61.3	12.4
(c)	86.1	11.1	101.8	9.8	69.4	11.0	65.3	9.7
Alúmina-carbón activo-silica	87.3	19.3	105.7	20.8	69.9	14.9	68.4	19.4

a) 1.18 g de alúmina-carbón activo-C₁₈ (75:3:40, p/p/p); a través del cartucho se pasaron 3 ml de extracto de muestra. b) 1.16 g de alúmina-carbón activo-C₁₈ (75:1:40, p/p/p); a través del cartucho se pasaron 5 ml de extracto de muestra. c) La misma mezcla que b); a través del cartucho se pasaron 3 ml de extracto de muestra, después el cartucho se lavó con 2 ml de acetonitrilo-agua (84:16, v/v) y todo el eluyente se recogió en el mismo vial

ND: Por debajo del límite de detección

n = 5

El procedimiento que emplea los cartuchos de alúmina-carbón activo-C₁₈ se puede desarrollar mediante tres opciones distintas (Sección Experimental

6.4.2.5 a, b y c). La mejor recuperación (más próxima a 100%) fue obtenida utilizando la opción c, además, con este procedimiento, se consiguió una repetitividad aceptable (RSD 9.7–11.1%) y una menor interferencia de picos en la línea base.

Cuando se utilizó el cartucho de Celite 545–alúmina–carbón activo sin desgrasado previo del extracto de la muestra, no se detectaron los diferentes tricotecnos ensayados. Sin embargo, el cromatograma muestra una buena línea base y con pocos picos, que llevan a suponer que los tricotecnos y otros compuestos fueron retenidos por el cartucho de SPE, quizás debido a su elevada proporción de Celite 545, ya que las señales de los tricotecnos aparecen cuando los cartuchos contienen sólo alúmina y carbón activo en proporciones similares, pero no utilizando Celite 545.

Sin embargo, se encontraron resultados satisfactorios en los cartuchos que contenían Celite 545–alúmina–carbón activo, cuando previamente el extracto se desgrasó con hexano. Pero, en este procedimiento, después de eliminar los componentes grasos de la matriz y tras cargar la muestra en el cartucho, los tricotecnos se eluyen con una gran cantidad de disolvente, que puede provocar una co-elución con otros compuestos que pueden interferir. Además, la evaporación del disolvente eluido en el evaporador giratorio debe ser realizada a muy baja presión debido a su alto contenido en agua, que podría llevar a pérdidas en los analitos de interés. Otros autores (Langseth y Clasen, 1992) han usado cartuchos de Celite 545–alúmina–carbón activo con desgrasado en un extracto de maíz fortificado con 80 ng de micotoxina/ml de extracto y han obtenido unas recuperaciones medias para el DON, NIV y 3–ADON de 94%, 94% y 81% respectivamente, lo que no concuerda con nuestros resultados.

Como en el caso anterior, en el cartucho de Florisil se tuvo que evaporar una considerable cantidad de agua después de pasar el extracto a través de él. A pesar de ello, las recuperaciones obtenidas para el 3– y 15–ADON fueron comparables a las obtenidas con los cartuchos de alúmina–carbón activo–C₁₈ o alúmina–carbón activo–sílica. Sin embargo, las recuperaciones para el DON fueron relativamente bajas (media de 55.1%), a pesar de que análisis realizados por otros autores (Onji *et al.* 1998) usando cartuchos de Florisil en muestras de cebada contaminadas con 67 µg de DON y 3–ADON/g mostraron recuperaciones de 75.8% y 82%, respectivamente.

Con el cartucho que contenía alúmina–carbón activo se obtuvieron recuperaciones muy elevadas para todos los analitos (>100%), pero aparecieron picos interferentes junto con los tricotecnos, motivo por el cual fueron tan elevadas las recuperaciones, especialmente en el caso de DON. Por tanto, esta mezcla de adsorbentes fue poco apropiada para la purificación de estos compuestos en el sustrato utilizado. A pesar de ello, Croteau *et al.* (1994), que utilizaron este material empaquetado, encontraron valores de recuperación de 108%, 60%, 65% y 69% para DON, NIV, 3–ADON y 15–ADON, respectivamente, en maíz contaminado con 0.250 mg de toxina/Kg.

Por los resultados obtenidos, los procedimientos de SPE que pueden ser útiles en términos de fiabilidad, bajo costo y menor tiempo de análisis son los que implicaban a los cartuchos que contenían alúmina-carbón activo-C₁₈ (opción c) y cartuchos de alúmina-carbón activo-silica. Ambos métodos se compararon utilizando un mayor número de experiencias para estudiar la recuperación en la determinación de los tricotecenos. Los resultados obtenidos en estas experiencias se muestran en las Tablas 28 y 29. Estos dos cartuchos de SPE se compararon utilizando una columna capilar HP-1701 después de la derivatización con PFFA de una muestra de trigo que había sido contaminada con 1.0 y 0.1 mg de cada tricoteceno/Kg de muestra. Los resultados presentados en la Tabla 29 son muy similares a los mostrados en la Tabla 28, sin embargo, se ha observado una línea base más irregular y con mayor número de picos próximos a los analitos cuando se han utilizado los cartuchos que contenían alúmina-carbón activo-silica. Este comportamiento provocó que las desviaciones estándar relativas de las recuperaciones de los tricotecenos fueran más altas que las alcanzadas cuando se usaron los cartuchos que contenían alúmina-carbón activo-C₁₈ durante el proceso de purificación.

Tabla 29. Influencia de los procedimientos de purificación mediante SPE seleccionados en la recuperación de los tricotecenos de tipo B (1.0 y 0.1 mg de micotoxina/Kg) en trigo mediante GC utilizando una columna HP-1701. La muestra se contaminó con una mezcla de las cuatro micotoxinas. La derivatización con PFFA.

Cartucho de SPE	Nivel de contaminación (mg/Kg)	Tricotecenos							
		DON		NIV		15-ADON		3-ADON	
		Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)
Alúmina-carbón activo-C ₁₈	1.0	82.6	9.6	98.4	8.4	64.2	18.48	76.8	7.4
	0.1	98.3	25.8	95.6	19.7	125.1	30.5	120.2	39.1
Alúmina-carbón activo-silica	1.0	98.4	23.0	109.3	10.9	67.0	21.3	85.9	26.8
	0.1	65.9	36.5	94.1	28.4	55.8	29.8	60.2	34.9

n = 5

6.1.2 Derivatización y condiciones de GC

La derivatización y las condiciones óptimas de separación de los compuestos por GC es una etapa fundamental en la determinación de los tricotecenos tipo B en trigo. La Figura 39 muestra dos cromatogramas de una mezcla de DON, NIV, y 3-ADON derivatizados con HFBA (Figura 39A) o PFFA (Figura 39B) y separados usando una columna HP-5. Los límites de detección (LOD) (concentración analítica que proviene de una señal igual

a la del blanco más 3 x SD de la señal del blanco) (Miller y Miller 1993) fueron prácticamente las mismas para NIV, 3-ADON y 15-ADON, sin tener en cuenta el agente derivatizante (Tabla 30). En el caso del DON se observó que para la misma cantidad de estándar, la señal obtenida con HFBA fue superior a la obtenida con PFFA, de este modo, el primer reactivo produce mayor sensibilidad debido a su mayor contenido en flúor en su derivado (Tabla 30). Esta diferencia de sensibilidad está de acuerdo con los límites de detección obtenidos utilizando estos dos reactivos.

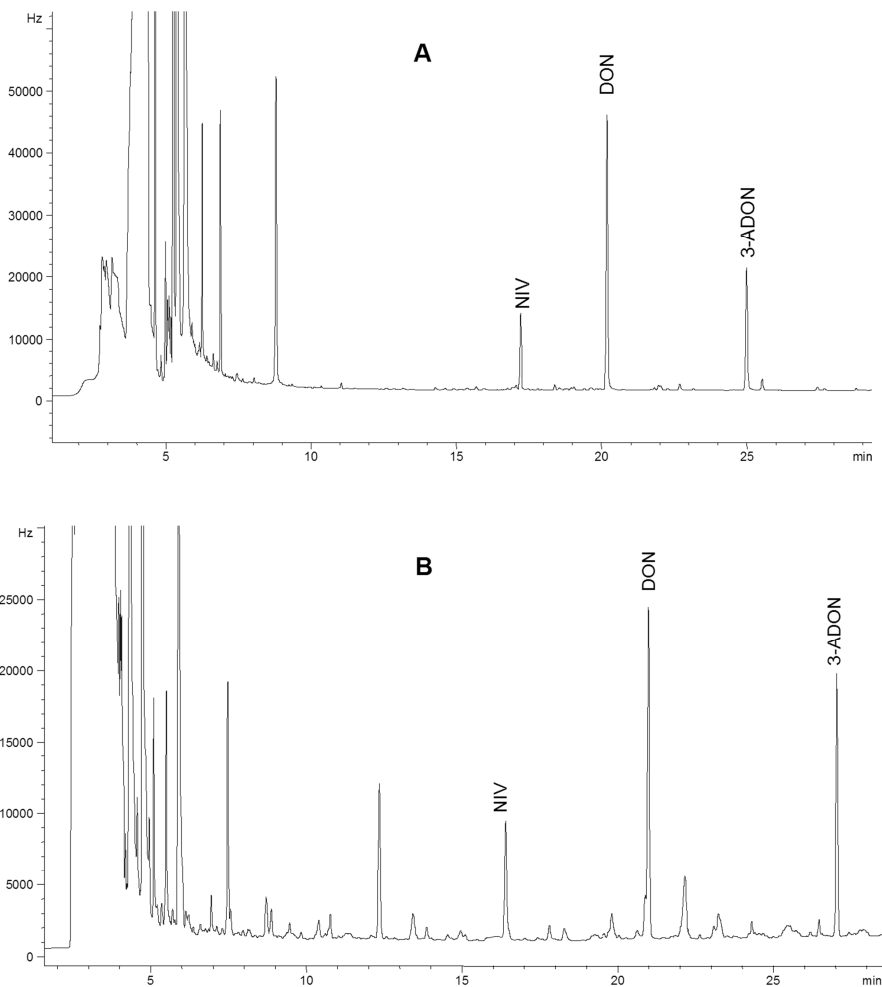


Figura 39. Cromatogramas de una mezcla de DON, NIV, y 3-ADON derivatizados con (A) HFBA y (B) PFFA. Purificación: cartucho alúmina-carbón activo-C₁₈ (opción c). Columna: HP-5. Volumen de inyección: 1 μ l de 1 mg de cada micotoxina/l.

Tabla 30. Límites de detección (LOD), pendiente y coeficientes de determinación (r^2) de las curvas de calibrado para derivados pentafluoropropionilos y heptafluorobutirilos de tricotecenos tipo B separados con columnas capilares HP-5 y HP-1701.

Tricoteceno	Columna	Agente de derivatización					
		PFPA			HFBA		
		LOD (mg/Kg)	r^2	Pendiente (Hz/mg L^{-1})	LOD (mg/Kg)	r^2	Pendiente (Hz/mg L^{-1})
DON	HP-5	0.007	0.9993	248254	0.004	0.9964	386268
	HP-1701	0.016	0.9982	204359	0.007	0.9977	229096
NIV	HP-5	0.017	0.9975	146493	0.020	0.9962	123060
	HP-1701	0.028	0.9900	110919	0.039	0.9902	103728
3-ADON	HP-5	0.010	0.9995	203877	0.010	0.9990	211380
	HP-1701	0.016	0.9974	188763	0.012	0.9991	199473
15-ADON	HP-5	0.011	0.9991	175328	0.012	0.9987	163728
	HP-1701	0.018	0.9963	134815	0.014	0.9974	134635

n = 5

Las curvas de calibrado obtenidas fueron lineales entre el intervalo de 0.006–0.625 mg/l para ambos tipos de derivados aunque el coeficiente de determinación fue mejor cuando se utilizó como derivatizante PFPA (Tabla 30). El reactivo HFBA presentó un mayor costo, menor estabilidad contra la humedad y las recuperaciones no fueron significativamente mejores. Por lo tanto, el reactivo PFPA se seleccionó como agente derivatizante para las subsiguientes determinaciones de tricotecenos tipo B.

La separación de los compuestos derivatizados de 3- y 15-ADON no pudo ser realizada satisfactoriamente cuando se utilizó una columna HP-5 (no polar), debido a que estos compuestos aparecieron en el mismo tiempo de retención. Para solventar este problema, la determinación se llevó a cabo con una columna HP-1701 (carácter polar bajo/medio), que produjo una separación cromatográfica entre estos dos compuestos, y por tanto sirvió para diferenciar dichos derivados acetilados de tricotecenos. En la Figura 40 aparecen los cromatogramas de una muestra de trigo contaminado con tricotecenos tipo B utilizando ambos tipos de columna, como se puede observar se obtienen dos picos bien separados cuando se utilizó la columna HP-1701 para 3- y 15-ADON respectivamente. Por tanto, todos los tricotecenos analizados se separaron en esta columna HP-1701, pero los límites de detección (Tabla 30) fueron, para todas las toxinas, superiores a los obtenidos con la columna HP-5.

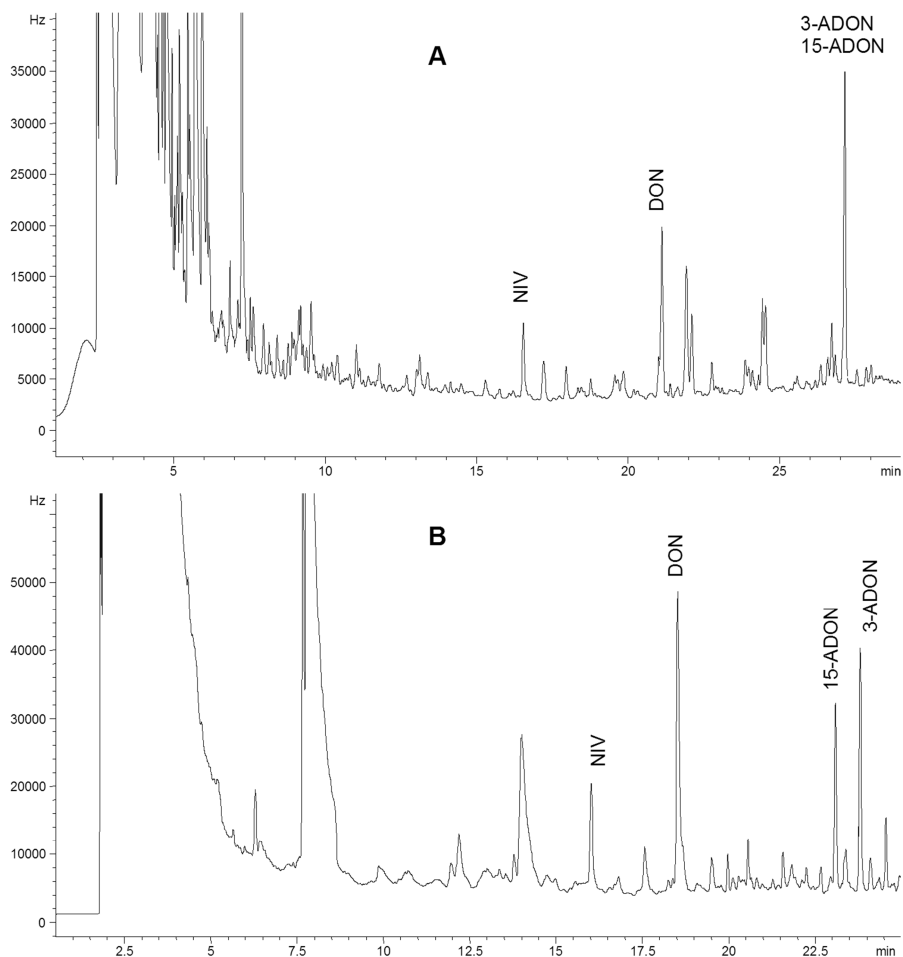


Figura 40. Cromatogramas de un blanco de una muestra de trigo contaminado con los tricotecenos DON, NIV, 3-ADON y 15-ADON. Formación de derivados con PFFA. (A) Niveles de tricotecenos 1.0 mg/Kg y separados con la columna HP-5. (B) Niveles de tricotecenos 2.5 mg/Kg y separados con la columna HP-1701. Purificación: cartucho de alúmina-carbón activo-C₁₈ (opción c).

6.2 Determinación de ocratoxina A en harina de trigo

Para desarrollar los distintos métodos de análisis que se proponen en la Sección Experimental 6.6 se usaron muestras de harina de trigo libres de OTA, según el método de Pierard *et al.* (2004), obtenidas en diferentes comercios. La selección de los métodos propuestos se basó en la rapidez y sencillez de los mismos, evitando etapas excesivamente duraderas y/o complejas en su aplicación. En todos los casos, la determinación de la OTA se llevó a cabo por LC-FLD.

Por su parte, la selección de los procedimientos de extracción de la OTA, para su posterior purificación, estuvo basada en la mejor adaptación del medio extrayente para ser aplicado, a continuación, en la fase de

purificación, sin que se tuviera que efectuar ninguna etapa intermedia que pudiera implicar un mayor tiempo de análisis o pérdida de muestra. Así por ejemplo, para el método de purificación con acetato de etilo en medio ácido mediante una extracción líquido-líquido, fue necesario que la muestra fuera previamente extraída con una disolución acuosa, inmisible con la fase orgánica de la etapa de purificación. En el caso del método de IAC, la extracción de la OTA a partir de la harina se realizó con una mezcla de acetonitrilo-agua (60:40, v/v) a la cual posteriormente se le añadió, antes de pasarla por la columna de inmunoafinidad, una gran cantidad de agua para evitar que la presencia de un elevado contenido en acetonitrilo desnaturalizase los anticuerpos de la columna. Para la columna de intercambio iónico/fase reversa, el analito se extrajo previamente con una disolución acuosa en medio básico a la que después de precipitar algunos interferentes y ajustar a un pH determinado, se pasó por la columna en la que se jugó con los disolventes y el pH para purificar y eluir correctamente la OTA del extracto de harina. En el caso de la SPE con silica, fue necesaria que la mezcla de extracción fuera orgánica para conseguir que el lecho sólido retuviera la OTA, por lo que la extracción se realizó con acetato de etilo en medio ácido.

Los resultados obtenidos al aplicar los diversos métodos utilizados para la determinación de OTA en harina de trigo se pueden observar en la Tabla 31. En ella se puede comprobar que los mejores resultados se obtuvieron con el método en el que se utiliza cartuchos de inmunoafinidad. Las recuperaciones obtenidas cuando se añade 0.2 µg de OTA/Kg de harina para los distintos métodos ensayados: IAC, intercambio iónico/RP, SPE silica y extracción líquido-líquido fueron de 74.4%, 27.8%, 44.5% y 53.9%, respectivamente, mientras que las desviaciones estándar relativas respectivas para los mismos procedimientos fueron 7.7%, 18.6%, 21.2%, 15.3%.

Estos resultados pusieron en evidencia la dificultad de determinar correctamente la OTA en algunas matrices como es en este caso la harina de trigo. De todos los métodos aplicados, sólo el procedimiento en el que se realiza una extracción con acetonitrilo-agua y una posterior purificación con un cartucho de inmunoafinidad dió lugar a unos valores de recuperación que se pueden considerar aceptables (entre 74.4 y 81.3%). Estos valores fueron similares a los obtenidos por Pierard *et al.* (2004) y a los que se indican en las notas y sugerencias técnicas de Vicam (1999) y que son de un 77% y 80%, respectivamente. Por el contrario, los valores de recuperación conseguidos con los otros procedimientos ensayados fueron inferiores a los obtenidos por autores de referencia, aunque estos autores no emplearon estos métodos en harina de trigo, sino a distintas matrices, así por ejemplo la extracción líquido-líquido aplicada a muestras de cerveza (Medina *et al.* (2006), cartuchos de intercambio iónico/RP aplicado a muestras de café (Ventura 2003) o cartuchos de silica aplicado a muestras de orina (Domijan *et al.* 2003).

Tabla 31. Influencia del procedimiento de extracción y purificación en la recuperación y en los límites de detección de OTA añadida a muestras de harina de trigo.

Método	Nivel de contaminación ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Recuperación (%)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Inmunofinidad	0.2	74.4	7.7	0.015
	0.6	81.3	6.2	
	1.0	79.6	6.4	
Intercambio iónico/RP	0.2	27.8	18.6	0.018
	0.6	31.4	12.4	
	1.0	36.2	9.7	
Silica	0.2	44.5	21.2	0.023
	0.6	54.3	15.6	
	1.0	45.2	13.3	
Extracción líquido-líquido	0.2	53.9	15.3	0.016
	0.6	48.9	14.2	
	1.0	59.2	16.6	

n=3

Cuando se determinaron los límites de detección de los distintos métodos aplicados, el método en el que se emplean columnas de inmunofinidad fue el que proporcionó el límite de detección más bajo, con un valor de 0.015 ng/g, seguido de los métodos en los que se emplea extracción líquido-líquido, intercambio iónico/RP y silica con unos valores de 0.016, 0.018, 0.023 ng/g, respectivamente. Aunque los límites de detección fueron muy similares, el extracto que más se concentró durante la realización de las diferentes etapas de cada método fue el resultante de la extracción y purificación con acetato de etilo, seguido de los métodos en los que se emplea SPE silica, intercambio iónico/RP y por último IAC. Por tanto, aunque la muestra se concentre más para conseguir disminuir el límite de detección, también se obtuvo, en contraposición, un mayor ruido de fondo que impidió dicha mejora. Además, es lógico pensar, que se obtendrá mayor ruido de fondo en muestras que no utilizan cartuchos de inmunofinidad como etapa de purificación, debido a que este procedimiento es muy selectivo y por tanto la aparición de impurezas y efectos de la matriz en el cromatograma son mucho menores, a diferencia de los procesos de SPE que pueden incrementar el ruido de fondo, o incluso, aparecer interferentes junto al analito que dificultan la cuantificación. En las Figuras 41-44 están representados los cromatogramas de los cuatro métodos comparados a distintas

concentraciones. Se puede observar que el método por IAC y el procedimiento con cartuchos de intercambio iónico/RP fueron los que mostraron una menor cantidad de picos próximos al compuesto de interés. La curva de calibrado tuvo una respuesta lineal para los patrones en el intervalo comprendido entre 0.1 a 100 ng/ml con un r^2 de 0.9997.

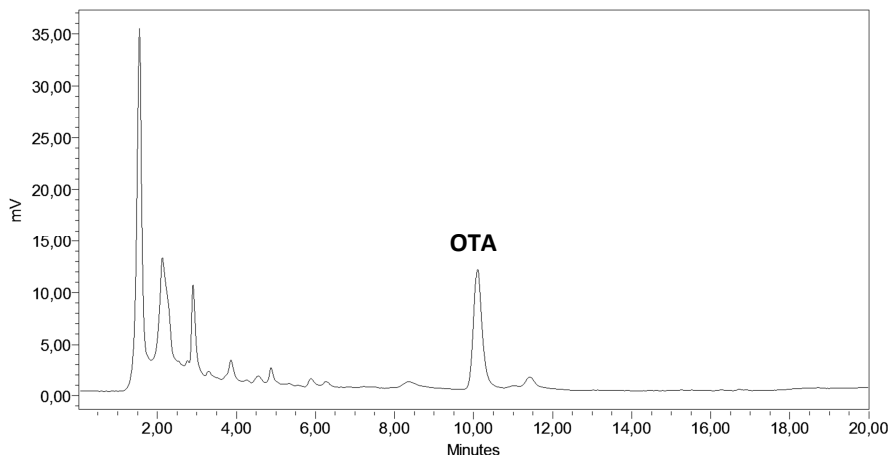


Figura 41. Cromatograma obtenido por LC-FLD de muestra de harina de trigo contaminada con 0.2 μg de OTA/Kg de harina utilizando columnas de inmunoafinidad en la fase de purificación.

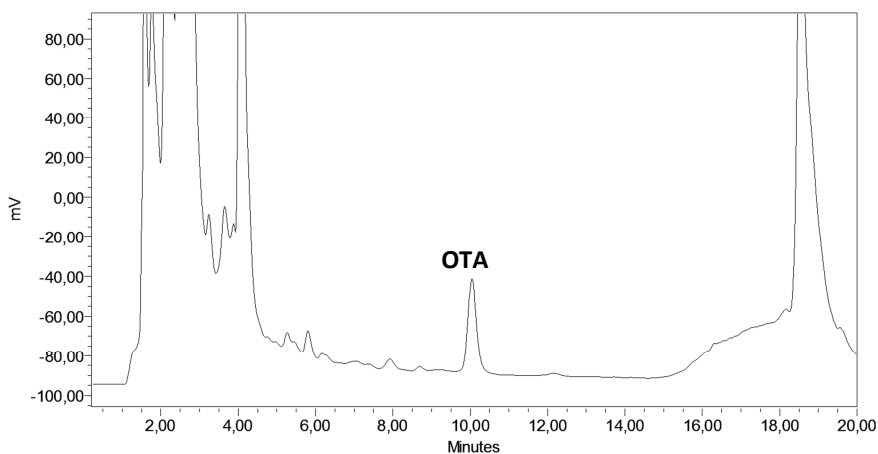


Figura 42. Cromatograma obtenido por LC-FLD de una muestra de harina de trigo contaminado con 1 μg de OTA/Kg de harina. Extracción con una disolución acuosa y acetato de cinc y posterior extracción líquido-líquido con acetato de etilo.

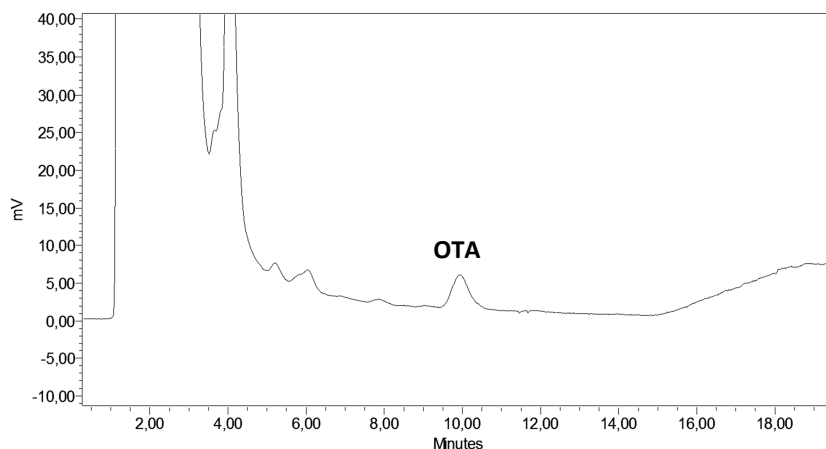


Figura 43. Cromatograma obtenido por LC-FLD de muestra de harina de trigo contaminada con 0.2 μg de OTA/Kg de harina. Extracción con una disolución acuosa y acetato de cinc y posterior SPE con cartucho de intercambio iónico-fase reversa.

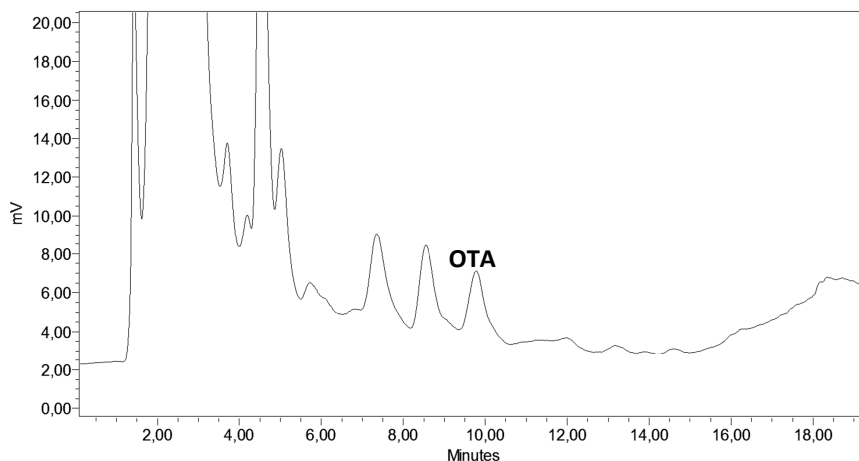


Figura 44. Cromatograma obtenido por LC-FLD de una muestra de harina de trigo contaminada con 0.2 μg de OTA/Kg de harina. Extracción con acetato de etilo en medio ácido y posterior purificación con cartucho de sílica.

Del estudio comparativo de los diferentes métodos ensayados, para encontrar las condiciones analíticas óptimas de recuperación, límite de detección, así como rapidez y bajo costo, se pudo deducir que el método IAC resultó ser el más aconsejable.

6.3 Incidencia de los tricotecenos tipo B y ocratoxina A en trigo y harina de trigo

Una vez optimizados los métodos para la determinación de tricotecenos tipo B y ocratoxina A en grano y harina de trigo, se realizó un estudio sobre la incidencia de estas micotoxinas en trigo y harina de trigo en muestras procedentes del mercado español.

6.3.1 Incidencia de tricotecenos tipo B

Se observó la presencia de tricotecenos tipo B en algunas de las muestras de grano y harina de trigo (Tabla 32). Se detectó NIV en un 3% y 9% de las muestras de trigo y harina de trigo respectivamente, los respectivos valores medios encontrados fueron de 60 y 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Para el caso del DON, se observó su presencia en el 21% y 8% de las muestras estudiadas y los valores medios encontrados fueron de 691 y 75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de muestra de trigo y harina de trigo, respectivamente. Por otra parte, se analizaron por cromatografía de gases con detector de captura de electrones varias muestras que podían contener 15-ADON según el aspecto que mostraba el cromatograma, sin embargo, por GC-MS se determinó que en todos los casos, se trataba de falsos positivos, además, tampoco se encontró 3-ADON en ninguna de las muestras. En la Figura 45 se observa el cromatograma de una muestra de trigo contaminado naturalmente con DON.

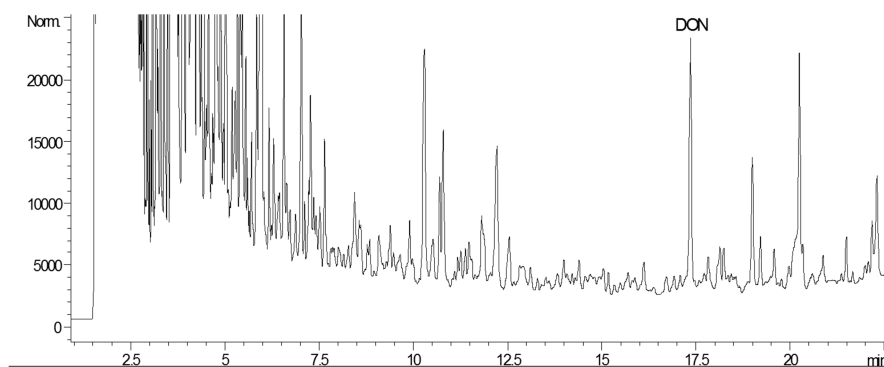


Figura 45. Cromatograma obtenido mediante GC-ECD de una muestra de trigo que contiene 1.347 mg de DON/Kg de trigo.

Según la legislación vigente en la Unión Europea el contenido máximo permitido para el DON en el trigo duro no elaborado es de 1750 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ mientras que para las harinas de cereales es de 750 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Commission Regulation, 2006). Según los resultados obtenidos a partir de las muestras estudiadas, ninguna muestra sobrepasa estos valores máximos permitidos, aunque en los granos de trigo aparecen dos muestras con un contenido próximo al máximo permitido. Otra consideración que se refleja en la propia legislación, es que el procesado del trigo, como la molienda para la obtención de harina, implica una disminución en el contenido de la micotoxina, y por tanto, en la legislación se contemplan límites máximos

permitidos más bajos. Diversos autores han constatado que existe una disminución del contenido en micotoxina en el proceso de molienda (Tanaka *et al.* 1986). Cuando se relacionan los valores medios obtenidos en el grano y la harina de trigo (Tabla 32) para el DON y NIV, se puede observar un valor medio inferior en las harinas que en el grano, aunque esto es poco significativo debido a que no se ha investigado una relación directa del procedimiento entre el grano recogido y la harina obtenida.

Tabla 32 Incidencia y concentración de los tricotecenos tipo B y OTA en muestras de trigo y harina de trigo para el consumo humano comercializadas en España.

Tipo muestra	Micotoxina	Producción de Micotoxina			
		Número de muestras	Muestras positivas	Media* (µg/Kg)	Intervalo* (µg/Kg)
Trigo	NIV	33	3	60	54 – 73
	DON	33	7	691	50 – 1438
	OTA	33	32	0.796	0.037 – 3.371
Harina de trigo	NIV	36	1	50	50 – 50
	DON	36	3	75	36 – 94
	OTA	37	35	0.565	0.039 – 2.189

*En los valores mostrados se consideran sólo las muestras que han resultado positivas
n=3

La incidencia encontrada en muestras procedentes de diversos países varía según el año y el lugar de origen. Por ejemplo, Tutelyan (2004) analizó 2166 muestras de grano de trigo almacenado entre los años de 1992 a 2002 en Rusia, de las cuales 1498 muestras contenían DON con un intervalo entre 0.05 y 8.60 mg/Kg, también analizó 1908 muestras de grano de trigo para consumo humano, y detectó la presencia de DON en 220 muestras con un intervalo de 0.05–6.65 mg/Kg. Otros autores como Keblys *et al.* (2000) analizaron 84 muestras de trigo en Lituania en 1998, y en ninguna detectaron NIV, sin embargo detectaron DON en 63 muestras con un valor medio en las muestras positivas de 64 µg/Kg y un valor máximo de 202 µg/Kg. En Noruega, Langseth y Elen (1997) analizaron 1227 muestras de trigo entre los años 1988 a 1996, y detectaron DON en el 61.5% de las muestras, con un valor medio en las muestras positivas de 187 µg/Kg, y un valor máximo de 9030 µg/Kg. Sin embargo, Grabarkiewicz-Szczesna *et al.* (2001) determinaron el contenido de tricotecenos en 25 muestras de grano de trigo de Polonia en 1993, y encontraron que el 96% contenían DON, con un valor máximo de 371 µg/Kg y un valor medio de 104 µg/Kg; también detectaron NIV en un 76% de las muestras con un valor medio de 97 µg/Kg y un valor máximo de

453 µg/Kg, y un 48% de las muestras fueron también positivas para los 3 y 15 acetil derivados con un valor medio de 16 µg/Kg y un máximo de 38 µg/Kg. En 1998, Eskola *et al.* (2000) en Finlandia estudiaron 27 muestras de trigo y determinaron que el 85% de ellas estaban contaminadas con *Fusarium spp.*, 24 muestras dieron positivo en el análisis de DON, una muestra fue positiva en para los derivados acetilados y no se observó ninguna muestra positiva para el NIV. En Rumania, Curtui *et al.* (1998) analizaron 25 muestras de trigo en 1997, dando todas las muestras, positivas en la determinación de DON, con una media de las muestras contaminadas de 1500 µg/Kg y un máximo de 5600 µg/Kg, para el 3-ADON dieron positivo 12 muestras con una media de 93 µg/Kg y un máximo de 250 µg/Kg, pero en el caso de 15-ADON sólo 8 muestras fueron positivas con un valor medio de 150 µg/Kg. En Alemania, Birzele *et al.* (2000) realizaron un estudio durante los años 1997 y 1998 con un total de 105 muestras de trigo, todas las muestras fueron positivas en cuanto a presencia de DON con un valor medio en 1997 de 111 µg/Kg y en 1998 de 280 µg/Kg. Pascale *et al.* (2000, 2001) determinaron, entre los años 1998 y 2000 en Italia, el contenido de DON para trigo blando y encontraron 5 muestras positivas de 36 muestras estudiadas con una media de 0.146 mg/Kg y un intervalo de 0.0550–0.33 mg/Kg, y para trigo duro, en 1998, detectaron DON en 24 muestras de 26 analizadas con una media de 0.202 mg/Kg y un intervalo de entre 0.06 a 1.00 mg/Kg.

En otros países, también se han determinado los tricotecenos en alimentos derivados del trigo destinados al consumo humano. Cirillo *et al.* (2003) analizaron 80 muestras de diferentes productos que contenían trigo como galletas, pan y pasta en Italia, encontrando como resultado que más del 69% de las muestras contenían DON. Schothorst *et al.* (2005) recogieron 74 muestras de alimentos derivados de cereales destinadas a consumo infantil en Holanda y analizaron las que contenían cantidades más altas de cereales como pan o cereales de desayuno. En todas las muestras se detectó DON con una media de 5.75 µg/Kg, una muestra contenía 15-ADON con un valor de 0.80 µg/Kg y NIV se detectó en el 42% de las muestras con un valor medio de 0.33 µg/Kg, sin embargo no se detectó en ninguna muestra el 3-ADON. Otros autores como Martins y Martins (2001) en Portugal analizaron 20 muestras de cereales de desayuno que contenían trigo, obteniendo un resultado de 20 muestras positivas siendo el valor máximo de 6040 µg/Kg. Por tanto, de la presencia de tricotecenos en alimentos, se puede indicar, que aunque se pueden destruir parcialmente estas micotoxinas inicialmente presentes en los cereales durante el proceso de elaboración de los alimentos derivados (Tanaka *et al.* 1986) sigue existiendo un riesgo real para la salud derivado del consumo de alimentos elaborados que será necesario controlar.

6.3.2 Incidencia de ocratoxina A en trigo y harina de trigo

Según los resultados obtenidos en el análisis de las muestras en grano y harina de trigo (Tabla 32) se deduce que el 97.7% y 94.6%, de las muestras respectivamente contenían OTA. Los valores medios encontrados en las muestras positivas fueron 0.796 y 0.565 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para el grano y la harina de trigo respectivamente y el intervalo de los valores obtenidos fue de 0.037–3.371 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para el grano y para la harina de 0.039–2.189 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, siendo el límite de detección calculado para el método utilizado de 0.012 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En las Figuras 46 y 47 se observan los cromatogramas de muestras de grano y de harina de trigo contaminadas naturalmente con OTA.

Los resultados obtenidos están dentro de los valores permitidos según la legislación Europea que establece como contenido máximo en OTA de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para cereales en grano sin transformar y de 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para productos derivados de los cereales, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo (Commission Regulation No.1881/2006, 2006). Aunque no se superan los valores legislados, se pudo observar la presencia de muestras con un alto contenido en OTA superior a 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, en concreto tres muestras de harina y cinco de grano. Aunque todas las muestras están por debajo del máximo permitido, según la legislación europea, el consumo del producto derivado del trigo puede suponer un riesgo para la salud si supera la ingesta semanal máxima tolerable de 120 ng de toxina/ Kg peso corporal (TWI) según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA 2006), por lo que será necesario hacer un control del producto final para asegurarse de que los productos alimenticios no llegan al consumidor final con niveles elevados de OTA.

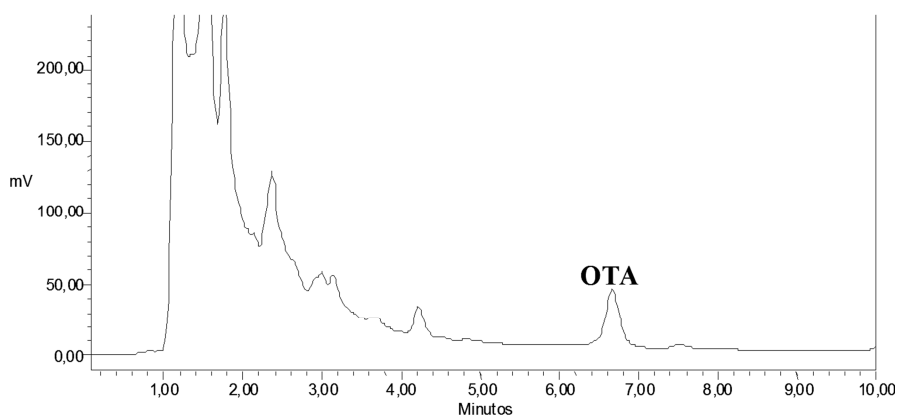


Figura 46. Cromatograma obtenido mediante LC-FLD de una muestra de trigo naturalmente contaminado que contiene 3.371 μg de OTA/ Kg de trigo.

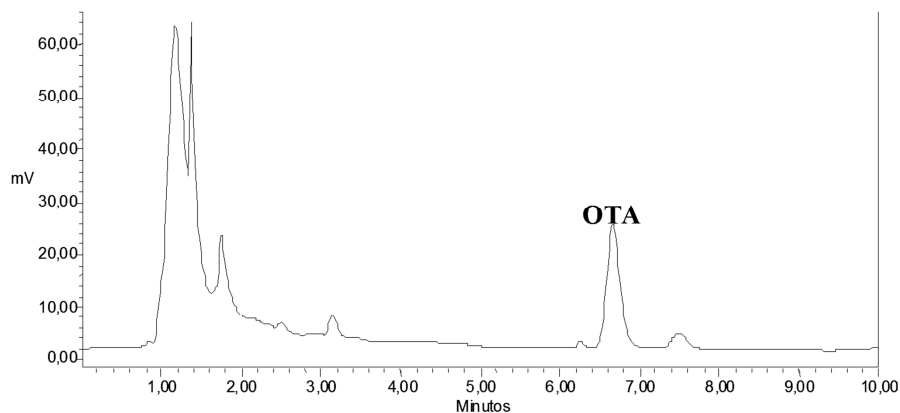


Figura 47. Cromatograma obtenido por LC-FLD de una muestra de harina de trigo naturalmente contaminada que contiene 2.189 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de OTA/Kg.

La presencia de OTA en trigo también ha sido descrita en otros países, como en Rumania, donde analizaron 25 muestras de trigo mediante ELISA, y encontraron OTA, solamente en una muestra con un nivel de 37 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Curtui *et al.* 1998). Scudamore *et al.* (1999b) examinaron 306 muestras de trigo, cebada y avena almacenadas en granjas del Reino Unido, detectando OTA en el 21% de las muestras de cereal examinadas con un límite de detección de 0.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, siendo las concentraciones medias encontradas de 0.29 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en trigo, y como dato significativo, el 2.7% de todas las muestras de cereales analizadas excedían de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. También, Wolff *et al.* (2000) determinaron OTA en 2374 muestras de cereales y en una gran variedad de productos derivados de cereales como harina, pan, pasta, etc., y en diversos tipos de legumbres en Alemania, y encontraron OTA en un 68.6 % de todas las muestras y además un 1.4 % de las muestras contenían OTA a niveles superiores a 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, siendo el límite de detección del método empleado de 0.01 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Sin embargo, Birzele *et al.* (2000) analizaron 43 muestras de trigo en Alemania y detectaron OTA sólo en nueve muestras, siendo el valor mínimo encontrado de 0.6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y el máximo de 0.8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ con un límite de detección de 0.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Por otro lado, Eskola *et al.* (2001) analizaron un total de 68 muestras de cereal, incluyendo cuatro muestras de trigo en Finlandia, obteniendo como resultado que ninguna muestra contenía OTA. Czerwiecki *et al.* (2002b) investigaron la presencia de OTA en unas 200 muestras de grano de cereal obtenidos de agricultura ecológica y convencional en Polonia en la cosecha de 1998, como resultado se obtuvo que el grano de trigo de cultivo convencional presentó una variación de concentración de OTA desde 0.6 a 1024 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y una frecuencia media de muestras contaminadas de un 48%, por el contrario, en las muestras de trigo de cultivos ecológicos, la presencia de OTA tuvo un intervalo entre 0.8 a 1.6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (media 1.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y el porcentaje de muestras contaminadas fue de un 23%. También, Palermo *et al.* (2002) determinaron la presencia de OTA en 70 muestras de

trigo duro almacenados en granjas en la región de Puglia (Italia), encontrando OTA en 6 de las muestras. Fazekas *et al.* (2002) obtuvieron 3 muestras positivas de 36 en trigo y 2 positivas de 16 en harina de trigo en Hungría con un valor medio de 0.29, 0.13 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente y con un intervalo de valores respectivos entre 0.12–0.5 y 0.11–0.15 ng/g y un límite de detección de 0.1 ng/g . Sin embargo, Castoria *et al.* (2005) analizaron 8 muestras de farro (*Triticum dicoccum*) en Italia, y observaron en todas ellas la presencia de OTA con un contenido máximo en una muestra de 4.07 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Los valores obtenidos según cada autor son muy diferentes dependiendo del lugar de procedencia y año de recolección. El método de análisis utilizado también puede influir en el resultado debido a que en algunos trabajos los límites de detección son muy superiores al utilizado en el presente estudio. Ésta puede ser la razón por la que el porcentaje de muestras positivas encontrado por algunos autores sea inferior a los valores obtenidos en nuestro estudio. Además, se ha constatado que en prácticamente todos los países europeos se detecta la presencia de OTA en cereales y en algunos casos concretos por encima de lo establecido por la legislación europea vigente.

6.4 Determinación e incidencia de tricotecenos tipo B y ocratoxina A en pan

6.4.1 Límites de detección y valores de recuperación

Los métodos utilizados para la determinación de estas micotoxinas están basados en los métodos optimizados para el análisis de harina de trigo de las respectivas micotoxinas estudiadas. Los resultados de recuperación y límites de detección fueron los siguientes:

En primer lugar, se obtuvieron los límites de detección para el DON, NIV, 3– y 15–ADON, los valores fueron de 8 ng/g , 15 ng/g , 11 ng/g , y 11 ng/g , respectivamente; mientras que para la OTA el límite de detección fue 0.015 ng/g de muestra de pan.

Con respecto a la recuperación, los resultados obtenidos para DON; NIV y 3–ADON a una concentración de 500 μg micotoxina/ Kg de pan fueron respectivamente de 76.4 ± 8.3 , 85.8 ± 9.2 , $77.1 \pm 7.6\%$ ($n=3$), y la recuperación de OTA de muestras de pan contaminadas con 5 ng de OTA/ g fue de $78.3 \pm 5.2\%$ (número de repeticiones: 3).

6.4.2 Incidencia de micotoxinas en pan

El análisis de las distintas muestras de pan procedentes de diferentes panificadoras de la provincia de Valencia ha proporcionado los resultados que se muestran en la Tabla 33. Todas las muestras de pan fueron positivas en contenido de OTA, mientras que para la determinación de los tricotecenos el porcentaje de muestras positivas para DON, NIV y 3– ó 15–ADON fue de 52%, 15% y 17% respectivamente. La media de OTA obtenida en los panes analizados fue de 0.342 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras que para los tricotecenos se obtuvo una media de 164 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, 74 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y 116 $\mu\text{g}/\text{Kg}$

para DON, NIV y 3- ó 15-ADON, respectivamente. El contenido máximo obtenido para la OTA fue de 3.968 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Figura 48) y para el DON fue de 201 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tabla 33), siendo el valor de OTA superior al límite máximo permitido por la Unión Europea que se establece en 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en OTA para cereales elaborados (Commission Regulation 2006). Por otro lado, el valor máximo obtenido de 3- ó 15-ADON fue de 1557 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Figura 49) y de 54 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para el NIV, aunque actualmente estas micotoxinas no se encuentran todavía reguladas por la legislación de la Unión Europea constituyen un riesgo para la salud por lo que deben ser controladas.

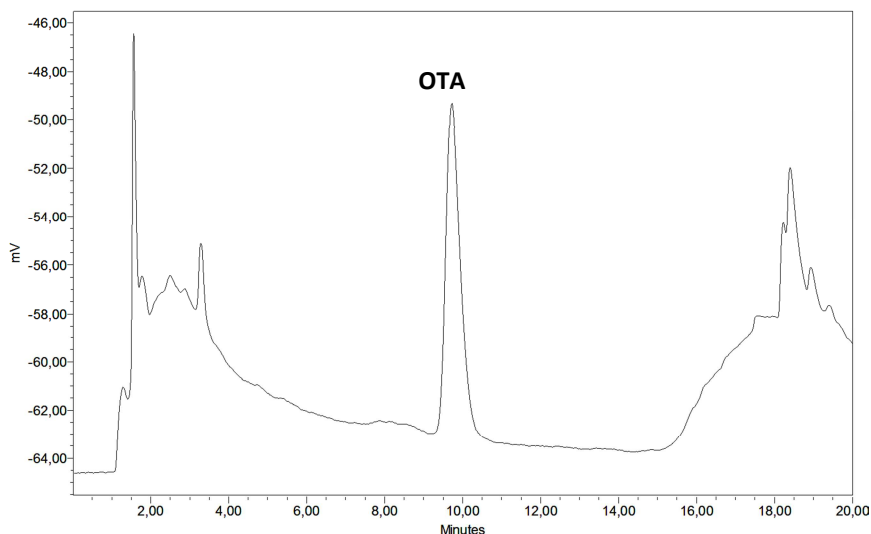


Figura 48. Cromatograma obtenido mediante LC-FLD de una muestra de pan sin sal añadida que contiene 3.968 ng de OTA/g de pan.

Tabla 33. Incidencia de OTA y tricotecenos B en pan consumido en España.

Micotoxina	Muestras positivas/analizadas	Porcentaje de muestras positivas (%)	Media ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Intervalo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
OTA	48/48	100	0.342	0.045–3.968
DON	25/48	52	164	21–201
NIV	7/48	15	54	34–62
3 ó 15-ADON	17/48	35	116	30–1557

n=3

Otros autores también han realizado estudios sobre la incidencia de OTA en pan. Legarda y Burdaspal (2001) investigaron la presencia de OTA en 255 muestras de pan de trigo de distinto tipo y origen, de todas ellas, 93 se elaboraron en España, y el resto eran provenientes de diferentes países del mundo: Francia (n=14), Holanda (n=29), Bélgica (n=7), Italia (n=12), Alemania (n=11), Irlanda (n=9), Austria (n=9), Suiza (n=20), Hungría

(n=3), EEUU (n=24), Túnez (n=9) y Brasil (n=15). La presencia de OTA se detectó, al igual que en nuestro trabajo, en todas las muestras analizadas, siendo el contenido medio (mediana) de OTA en las muestras españolas de 0.276 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ sobre materia seca y el nivel máximo detectado de 7.371 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para una muestra de pan común. Los valores medios encontrados en los otros países fueron: Francia 0.222 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Holanda 0.355 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Bélgica 0.142 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Italia 0.271 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Alemania 0.225 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Irlanda 0.446 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Austria 0.081 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Suiza 0.047 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Hungría 0.022 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; EEUU 0.347 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; Túnez 0.259 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y Brasil 0.040 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en materia seca, con un límite de detección de 0.005 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Por otro lado, Juan *et al.* (2007) analizaron 15 muestras de pan de maíz en España, y detectaron OTA en el 60% (9 muestras positivas), siendo el nivel máximo encontrado de 2.65 ng/g y el nivel medio de 0.43 ng/g y la mediana de 0.08 ng/g. Por otro lado, González-Osnaya *et al.* (2007a) analizaron 74 muestras de pan convencional y 26 muestras de pan ecológico para determinar la presencia de OTA en España, obteniendo un porcentaje de muestras positivas del 20.3% y 23.0% respectivamente, un resultado bastante inferior al encontrado en la presente investigación. Los mayores valores de OTA se obtuvieron en muestras no ecológicas y 5 de las muestras totales excedían del límite máximo permitido por la Unión Europea (3 ng de OTA/g). En otros países, también se ha determinado la presencia de OTA en pan; así Zinedine *et al.* (2007) encontraron OTA en 100 muestras de pan de Marruecos, los resultados muestran que 48 muestras fueron positivas, siendo el valor máximo encontrado de 149 ng/g y la contaminación media de las muestras de pan fue de 13 ng de OTA/g, superando 26 muestras el valor legislado de 3 ng/g, y el límite de cuantificación obtenido fue de 0.051 ng/g.

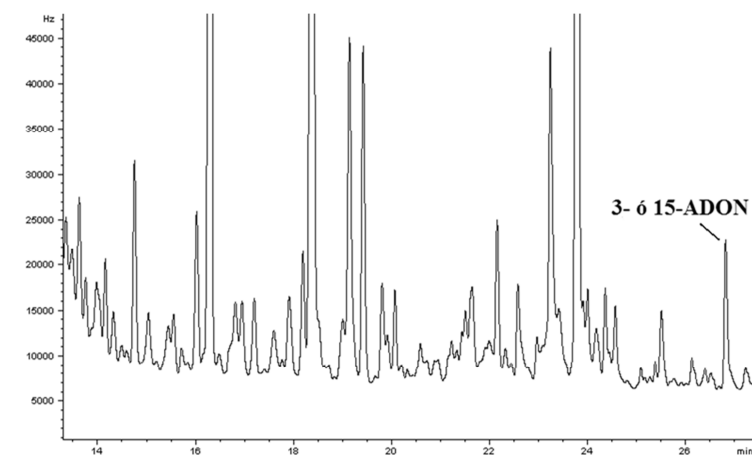


Figura 49. Cromatograma obtenido mediante GC-ECD de una muestra de pan de centeno que contiene 1.557 mg de 3- ó 15-ADON /Kg de pan.

Acerca de la presencia de tricotecenos en pan en España no se ha encontrado información bibliográfica, sin embargo existen algunos

trabajos en otros países. En Alemania, Schollenberger *et al.* (2005) recogieron un total de 101 muestras de pan durante 1999 para determinar la presencia de diferentes tricotecenos, y encontraron DON, NIV y 3-ADON en el 92%, 5%, y 8%, de las muestras respectivamente. El contenido medio de las micotoxinas en las muestras positivas fue de 134, 25 y 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente, no encontraron 15-ADON en ninguna de las muestras analizadas y los límites de detección del método variaron entre 2 y 12 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en función de la micotoxina analizada. En el presente trabajo se encontró que el porcentaje de muestras positivas para DON es inferior a los descritos anteriormente; no obstante, el nivel medio encontrado fue ligeramente superior para las otras toxinas (3- ó 15-ADON y NIV) tanto en lo que se refiere a porcentaje de muestras positivas como en lo que afecta a concentración media. Por otro lado, Hartung *et al.* (2004) analizaron 25 muestras de pan de Turingia (Estado libre de Alemania) para determinar la incidencia de DON mediante ELISA y HPLC-MS/MS, encontrando 11 muestras positivas con un contenido medio de 113 μg de DON/Kg. Sin embargo, Pacin *et al.* (1997) determinaron la incidencia de DON en 42 muestras procedentes de diferentes productos de horneado, incluido el pan en Argentina, y encontraron que el 92.8% de las muestras eran positivas, con un intervalo desde 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a 2800 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, con un valor medio de 464 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Todos estos resultados indican que existe un alto riesgo para los consumidores de productos procedentes de los cereales y en especial del trigo en lo que se refiere a ingesta de tricotecenos, por tanto, se hace necesario el control de los productos finales antes de su consumo.

6.5 Comparación y optimización de métodos para de determinación de patulina en zumo y puré de manzana

6.5.1 Comparación de procedimientos de análisis de zumo de manzana

La elección de los métodos aplicados se estableció, principalmente, a partir de los procedimientos más utilizados actualmente, así por ejemplo, se han comparado dos métodos oficiales (método de Arranz y método de MacDonald), y otros procedimientos más recientes y sencillos como son el método con extracción líquido-líquido y NaHCO_3 (LLE- NaHCO_3) y el método con SPE mediante cartuchos C18 (SPE-C18) (Arranz *et al.* 2005, Iha *et al.* 2006, Li *et al.* 2007, MacDonald *et al.* 2000). Además, en este estudio, se proponen algunas modificaciones, sobre los anteriores procedimientos, en busca de un método más sensible, preciso y sencillo (ver Sección Experimental 6.8.1). Para la comparación de los métodos, el estudio se ha centrado principalmente en las siguientes cualidades: recuperación, límite de detección y posibles interferentes que puedan afectar al analito objeto de la muestra analizada. La ejecución de los diferentes procedimientos ensayados para la determinación de PAT en zumo de manzana, proporcionó unas recuperaciones (Tabla 34) que variaron entre el 55.1% en el procedimiento con extracción líquido-líquido y NaH_2PO_4 y SPE de C18 (LLE- NaH_2PO_4 +C18) al 82.9% en el método con extracción líquido-líquido y NaH_2PO_4 (LLE- NaH_2PO_4) en una

muestra de zumo que contenía 0.1 mg de PAT/Kg. A pesar de que la recuperación de PAT en el procedimiento LLE–NaH₂PO₄+C18 estuvo por debajo de los valores mínimos requeridos (<60%), el límite de detección fue el menor de todos (1.3 µg/Kg), esto puede ser debido a que en este método la pre–concentración de la muestra de zumo para su análisis fue, generalmente, superior a la realizada por los otros métodos a estudio (relación 6:1).

Tabla 34. Recuperación, desviaciones estándar relativas y límites de detección de la PAT en zumo de manzana en los diversos procedimientos estudiados.

Procedimiento	Nivel de contaminación (mg/Kg)	Recuperación (%)	RSD (%)	LOD (µg/Kg)
LLE–NaHCO ₃	0.02	69.3	7.3	2.1
	0.05	72.3	4.2	
	0.1	74.3	1.7	
	1.0	72.1	3.1	
SPE–C18	0.02	72.4	12.5	6.6
	0.05	65.5	7.3	
	0.1	68.3	9.9	
	1.0	72.5	11.0	
Arranz	0.02	70.1	10.3	2.5
	0.05	68.3	7.1	
	0.1	64.2	4.5	
	1.0	68.9	5.3	
MacDonald	0.02	72.4	6.2	1.8
	0.05	78.4	9.4	
	0.1	73.2	8.5	
	1.0	81.0	12.3	
LLE–NaH ₂ PO ₄	0.02	71.6	6.8	2.0
	0.05	73.6	5.6	
	0.1	82.9	3.1	
	1.0	77.0	1.7	
LLE–NaH ₂ PO ₄ +silica	0.02	62.4	9.3	2.1
	0.05	63.9	5.8	
	0.1	67.8	4.0	
	1.0	69.2	4.9	
LLE–NaH ₂ PO ₄ +C18	0.02	65.4	8.2	1.3
	0.05	62.3	6.4	
	0.1	55.1	6.2	
	1.0	52.3	8.0	

n=3

Las mejores recuperaciones se obtuvieron con los métodos de MacDonald y LLE–NaH₂PO₄ (Tabla 34) con un 81.0% y 77.0%, respectivamente para zumo de manzana contaminado con 1.0 mg/Kg de PAT, y de 78.4% y

73.6% respectivamente, cuando se contaminó a una concentración de 0.05 mg de PAT/Kg. A pesar de que el método MacDonald proporcionó muy buenas recuperaciones, la desviación estándar relativa (RSD) obtenida fue bastante elevada, un 12.3% para una contaminación de 1.0 mg PAT/Kg de zumo, y un 9.4% para una contaminación de 0.05 mg PAT/Kg de zumo. Además el LOD del método de MacDonald no fue comparativamente menor a los obtenidos por los otros métodos a pesar de que la muestra se concentró para su análisis en una relación mayor (10:1). Por ejemplo, el método LLE-NaHCO₃ tuvo una relación de concentración de la muestra de sólo 3:1 y sin embargo los LOD obtenidos fueron muy similares, 1.8 µg/Kg para el método de MacDonald y 2.1 µg/Kg para el método LLE-NaHCO₃. Por tanto, aunque se llevó a cabo una mayor concentración de la muestra mediante el método de MacDonald, también, en el extracto final, se arrastraron, durante el proceso de extracción líquido-líquido, mayor cantidad de otros compuestos, provocando un aumento en el ruido de la línea base. Otro inconveniente de este método, fue el tiempo necesario, utilizado durante la fase de extracción debido a los múltiples pasos requeridos, así como también, al gran consumo de disolvente. De todos los protocolos ensayados, el método MacDonald fue el que más disolvente orgánico utilizó para la extracción (ver Experimental, Sección 6.8.1.4), esto conlleva tanto a un costo mayor, como a problemas medioambientales. Por el contrario, el método LLE-NaH₂PO₄ fue rápido, sencillo, con un LOD bastante bajo 2.0 µg/Kg y una buena RSD, estos resultados indican que fue un método bastante preciso y con buena repetitividad. De hecho, éste fue el método que proporcionó los mejores resultados de entre todos los métodos estudiados. Cuando se comparó con el método LLE-NaHCO₃, la única diferencia entre ambos fue la adición en la extracción de fosfato monosódico o de bicarbonato sódico. Como se ha indicado, la extracción en medio básico se utiliza para eliminar compuestos ácidos, sin embargo en los cromatogramas obtenidos con el método LLE-NaH₂PO₄ no se observó ningún interferente que originara un pico distinto próximo al analito, ni ningún aumento de la señal de ruido, en comparación con el método LLE-NaHCO₃, que pudiese demostrar evidencias de que estos compuestos repercuten en el resultado de la determinación de PAT. Además, se puede indicar que la PAT es más estable en medio ligeramente ácido que en medio básico por lo que durante la realización del procedimiento presentará una menor pérdida de PAT debido a que no se producirá la degradación de la misma como ocurre a pH alcalino.

Con el fin de intentar mejorar el método LLE-NaHCO₃, se ensayaron distintas diluciones de acetato de etilo-hexano durante la fase de extracción líquido-líquido (Tabla 35). Como se puede observar, las mejores recuperaciones de PAT se encontraron con la dilución original (96:4), con un valor del 75.2% y 73.4% para una contaminación de 0.02 y 0.1 mg PAT/Kg respectivamente.

Tabla 35. Recuperaciones y desviaciones estándar relativas en función de la composición de la mezcla extrayente en el procedimiento de LLE–NaHCO₃ para la extracción de la patulina en zumo de manzana. Concentraciones de 0.02 y 0.10 µg PAT/g.

Relación EtAc–Hexano	Nivel de contaminación			
	0.02 mg PAT/Kg		0.10 mg PAT/Kg	
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)
98:2	61.9	9.0	63.1	5.3
96:4	75.2	7.3	73.4	2.3
90:10	59.8	8.2	67.0	6.4
80:20	60.1	11.2	63.8	6.1
60:40	28.4	8.3	39.2	6.7

n=3.

Las recuperaciones que se obtuvieron con el método SPE–C18 fueron peores que con el método LLE–NaHCO₃, 68.3% frente a 74.3% respectivamente para una cantidad de PAT añadida de 0.1 mg /Kg. Además, en el método SPE–C18, la desviación estándar relativa fue de las más elevadas con un 9.9%, por lo que el procedimiento fue poco preciso y el LOD obtenido (6.6 µg/Kg) fue el más elevado de todos los métodos estudiados, debido posiblemente a que la cantidad de muestra utilizada en el análisis fue muy pequeña y no hubo preconcentración de la misma (relación de concentración 1:1). Además, el cromatograma obtenido fue también el más complejo de todos. Con el objetivo de mejorar el procedimiento SPE–C18, se propusieron unas modificaciones en la disolución de elución de PAT en el cartucho C₁₈ durante la fase de purificación (Tabla 36). Para ello, se utilizaron disoluciones más simples y un proceso de elución más sencillo y rápido, en este caso, se utilizó sólo una disolución con una mezcla de dos disolventes: acetato de etilo–hexano, en lugar de una serie de 3 diluciones continuas de una mezcla de tres disolventes (acetato de etilo–hexano–acetona) que utiliza Li *et al.* (2007). Los resultados indicaron que con una elución de 96:4 de acetato de etilo–hexano (disolvente utilizado en el método LLE–NaHCO₃) no se recuperó el analito, pero cuando se aumenta la proporción del hexano, a 80:20 de acetato de etilo–hexano se obtuvieron unas recuperaciones que no son significativamente distintas a las obtenidas por el método SPE–C18 inicial (Li *et al.* 2007) ($p > 0.05$). Con esta pequeña modificación se consiguió un ahorro en disolvente y tiempo de ejecución del proceso, aunque no se pudo mejorar las recuperaciones ni el LOD. A pesar de esto último, esta variación de la SPE fue la que posteriormente se utilizó para el método LLE–NaH₂PO₄+C18.

Tabla 36. Recuperaciones y desviaciones estándar relativas en función de la mezcla de disolventes de elución de la patulina en el cartucho de C₁₈ en el procedimiento SPE-C₁₈ para zumo de manzana. Concentraciones de 0.05 y 0.10 µg PAT/g.

Procedimiento de extracción	Nivel de contaminación			
	0.05 mg PAT/Kg		0.10 mg PAT/Kg	
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)
Metodo Li ^a	68.4	11.5	75.3	10.2
EtAc-Hexano (96:4)	–	–	–	–
EtAc-Hexano (80:20)	68.1	9.3	71.4	8.4
EtAc-Hexano (60:40)	53.5	12.4	46.7	7.2

a) hexano-EtAc-acetona en proporción variable, ver Sección Experimental 6.8.1.2
n=3

Por último, para el método modificado de Arranz y el método con extracción líquido-líquido y NaH₂PO₄ y SPE con cartucho de sílica (LLE-NaH₂PO₄+sílica) se obtuvieron unas recuperaciones de patulina del 64.2% y 67.8% respectivamente para zumo de manzana contaminado con 0.1 mg/Kg, y de 68.3% y 63.9%, respectivamente cuando el nivel de toxina fue de 0.05 mg/Kg. Estos valores no son significativamente distintos entre ellos (valor-*p* > 0.05), por lo que no se obtuvo ninguna mejora con la modificación efectuada en el procedimiento LLE-NaH₂PO₄+sílica.

En la Figura 50 se muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de zumo de manzana, contaminada con PAT (0.1 mg/Kg) por los métodos de LLE-NaH₂PO₄ (Figura 50a), Arranz (Figura 50b) y LLE-NaH₂PO₄+C₁₈ (Figura 50c). En ellos, aparece el pico de PAT a un tiempo aproximado de 13.3 min. Se debe indicar que en todos los métodos excepto en el de LLE-NaH₂PO₄+C₁₈, ocasionalmente, aparece otro pico a 12.8 min que puede interferir ligeramente con el analito, por lo que es de suponer que la SPE con C₁₈ elimina este pico próximo al analito a pesar de que las recuperaciones no fueron completamente satisfactorias (<70%).

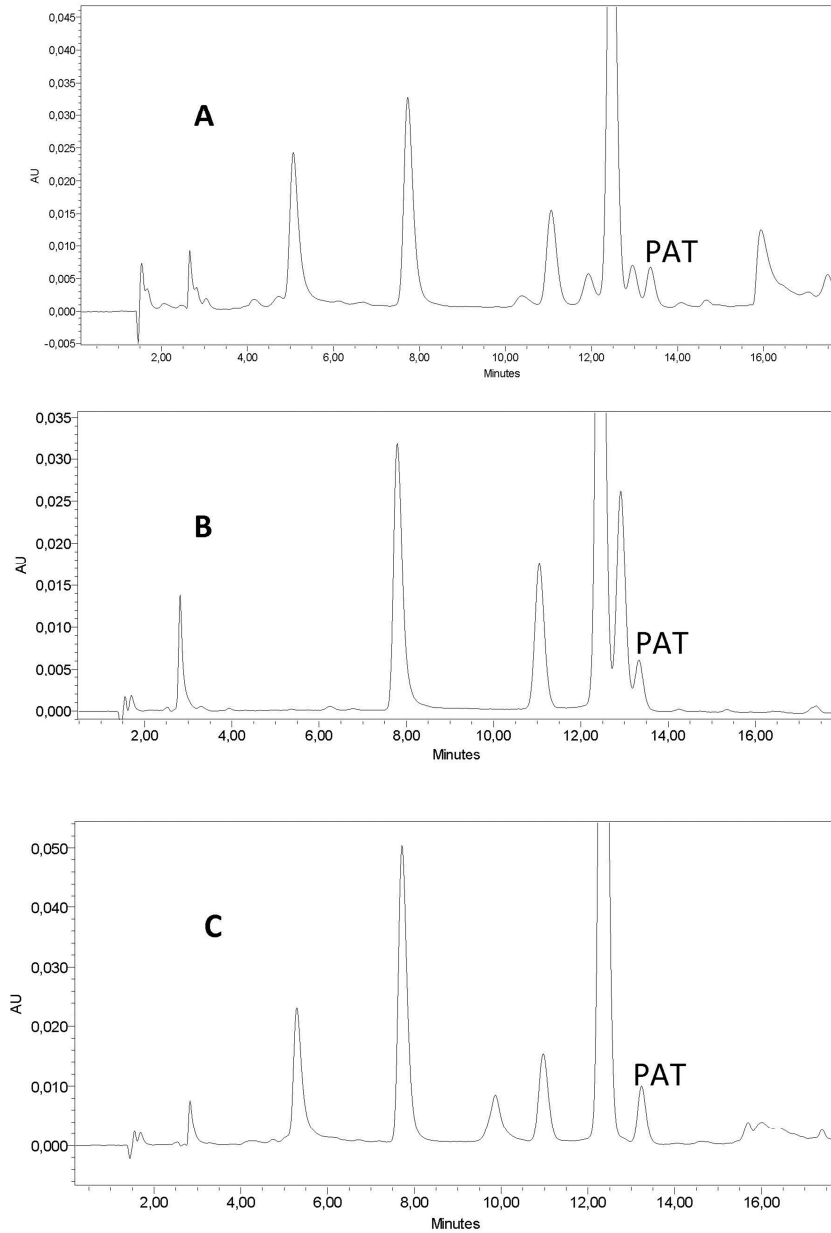


Figura 50. Cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de zumo de manzana contaminado con 0.10 μg PAT/ml utilizando: (a) el método LLE- NaH_2PO_4 ; (b) el método de Arranz; (c) el método LLE- NaH_2PO_4 +C18.

6.5.2 Comparación de procedimientos para el análisis de puré y compota de manzana

La comparación de los procedimientos para el análisis de puré y compota de manzana estuvo restringida a los métodos de Arranz y LLE-NaH₂PO₄+C18 (apartados 6.8.1.3 y 6.8.1.7 de la Sección Experimental) debido a que fueron los únicos que se pudieron aplicar en muestras semisólidas como corresponde a este tipo de alimento. Los otros procedimientos sólo se pudieron aplicar para muestras de zumo, debido a que cuando se utilizaron para puré y compota de manzana los cromatogramas presentaron bastantes interferentes. Los valores de recuperación y LOD obtenidos por estos dos métodos se muestran en la Tabla 37. Las recuperaciones encontradas fueron ligeramente superiores en el caso del método LLE-NaH₂PO₄+C18 que con el método de Arranz, 71.6% y 68.3%, respectivamente para puré de manzana contaminado con 0.1 mg/Kg de PAT, y 70.1% y 69.0%, respectivamente cuando el nivel de PAT fue de 0.02 mg/Kg. Sin embargo el LOD fue más bajo en el método LLE-NaH₂PO₄+C18 (1.4 mg/Kg) que en el de Arranz (2.4 mg/Kg), debido a la preconcentración efectuada en la muestra antes de su inyección en el cromatógrafo, al igual que ocurría al aplicar los procedimientos en el zumo de manzana. Por otro lado, cuando se usa el método de Arranz aparece un pico (t_r = 12.8 min) que puede interferir con la PAT (t_r = 13.3 min) y sin embargo utilizando el método LLE-NaH₂PO₄+C18 no aparece (Figura 51), por tanto, la determinación de PAT estuvo más exenta de errores con el método LLE-NaH₂PO₄+C18. En la Figura 51 se observa el cromatograma obtenido para una muestra de puré de manzana y plátano apto para el consumo infantil contaminado con 0.02 mg/Kg de PAT utilizando el procedimiento LLE-NaH₂PO₄+C18. Además, en este método, se añadió fosfato monosódico en la fase de purificación que permitió obtener un pH de la muestra ligeramente ácido por lo que la degradación de PAT puede ser inferior a la que ocurre en medio alcalino.

Tabla 37. Valores de recuperación, desviación estándar relativa y límite de detección obtenidos en la determinación de patulina por los diversos procedimientos en alimentos infantiles de fruta que contienen principalmente puré de manzana.

Procedimiento	Nivel de contaminación (mg/Kg)	Recuperación (%)	RSD (%)	LOD (µg/Kg)
Arranz	0.02	69.0	7.4	2.4
	0.05	72.8	8.1	
	0.1	68.3	7.3	
	1.0	65.3	6.5	
LLE-NaH ₂ PO ₄ +C18	0.02	70.1	8.7	1.4
	0.05	74.3	6.2	
	0.1	71.6	8.9	
	1.0	69.3	5.7	

n=3

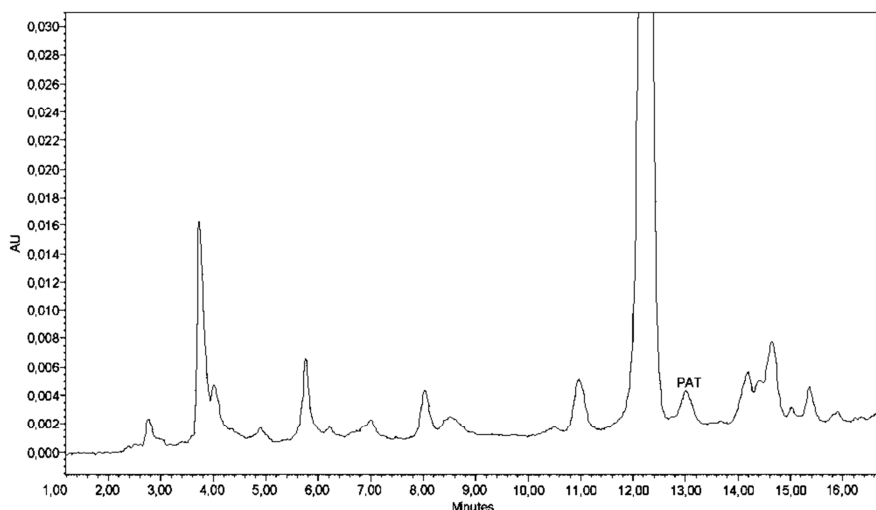


Figura 51. Cromatograma obtenido mediante LC-DAD de una muestra de puré de manzana y plátano (80:20, p/p) destinado al consumo infantil contaminado con 0.02 μg PAT/g muestra, utilizando el método de LLE- NaH_2PO_4 +C18. Longitud de onda de trabajo 276 nm.

6.5.3 Incidencia de patulina en muestras de manzana

La cantidad de PAT encontrada, en las 54 muestras de manzana aplicando el método LLE- NaH_2PO_4 para zumos y el método LLE- NaH_2PO_4 +C18 para purés y productos elaborados para niños de corta edad, fue en todos los casos inferior al límite de cuantificación, aunque hubo dos muestras de zumo de las 28 analizadas que contenían PAT por encima del límite de detección (superior a 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e inferior a 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) (Tabla 38). Por tanto, en las muestras analizadas, ningún producto apareció conteniendo valores superiores a los fijados por la Unión Europea. Sin embargo, aunque aparentemente el riesgo por ingestión de PAT es pequeño, dicho riesgo existe por lo que, las autoridades y las industrias dedicadas a productos derivados de la manzana deberían de implantar un sistema de control más exhaustivo para evitar la contaminación con esta micotoxina.

Otros autores también han determinado PAT en muestras procedentes de España (Tabla 38), como Legarda y Burdaspal (2005) que encontraron dos muestras de zumo de manzana que contenían PAT de las trece muestras analizadas, con un valor máximo de 7.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, estas cantidades fueron ligeramente superiores a los valores obtenidos en el presente trabajo que solamente se encontraron a nivel de trazas. Por otro lado, estos mismos autores, no observaron la presencia de PAT en las muestras de puré y compota de manzana, pero encontraron una muestra de las cincuenta y nueve analizadas destinadas a la alimentación infantil con un valor de 5 μg PAT/Kg. En todos los casos, los niveles obtenidos fueron inferiores a los valores máximos permitidos por la Unión Europea. Sin embargo Murillo Arbizu *et al.* (2009) que analizaron 100 muestras de zumo de manzana,

encontraron que el 66% de las muestras analizadas contenía PAT con un valor medio de 19.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, en 11 de ellas detectaron niveles de toxina que superaban el límite máximo permitido por la Unión Europea. Por otro lado, González–Osnaya *et al.* (2007) estudiaron 17 muestras de zumo de manzana y detectaron PAT en 5 con un nivel máximo de toxina de 50.9 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Estos autores también estudiaron el contenido de PAT en purés y compotas de manzana obteniendo un porcentaje de muestras positivas del 33% de un total de 18 muestras, el valor máximo de PAT fue de 28.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Prieta *et al.* (1994) llevaron a cabo un estudio de la incidencia de PAT en 100 muestras de zumo de manzana y en 12 muestras de productos infantiles que contenían principalmente manzana. Se detectó PAT en el 82% de los zumos con un valor máximo de 170 $\mu\text{g}/\text{l}$ y un valor medio de 13.8 $\mu\text{g}/\text{l}$, sobrepasando 7 muestras los límites establecidos por la legislación actual, sin embargo los productos infantiles estaban libres de PAT. Aunque los resultados difieren entre los distintos autores, parece ser, que el control de los productos infantiles está siendo mucho más estricto por lo que no suele aparecer PAT en dichas muestras. De todos modos, sería necesario un mayor esfuerzo para disminuir la incidencia de PAT en cualquier tipo de producto a base de manzana lo que conllevaría a un menor riesgo toxicológico.

Tabla 38. Incidencia de patulina en zumo, purés y compota de manzana y alimentos infantiles en España.

Alimento	Muestras Positivas/analizadas	Porcentaje positivas (%)	Media ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Máximo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Referencia
Zumo de manzana	2/28	7.1	Trazas	–	2.0	Presente Trabajo
	2/13	15.4	6.3	7.5	0.4	Legarda y Burdaspal (2005)
	5/17	29.4	NI	50.9	0.1	González–Osnaya <i>et al.</i> (2007b)
	66/100	66.0	19.4	118.7	0.7	Murillo <i>et al.</i> (2008)
	82/100	82.0	13.8	170	0.5	Prieta <i>et al.</i> (1994)
Puré	0/5	0	–	–	1.4	Presente Trabajo
	6/18	33.3	NI	28.4	0.1	González–Osnaya <i>et al.</i> (2007b)
	0/16	0	–	–	0.4	Legarda y Burdaspal (2005)
Alimento infantil	1/59	1.7	5.0	5.0	0.4	Legarda y Burdaspal (2005)
	0/12	0	–	–	1.0	Prieta <i>et al.</i> (1994)
	0/21	0	–	–	1.4	Presente Trabajo

También, la incidencia de PAT en zumo y puré de manzana es muy diversa, dependiendo del país de origen y del método de análisis utilizado. Entre ellos destaca, el análisis realizado en zumo de manzana procedente de Turquía (Gökmen *et al.* 2005) donde se ha encontrado PAT en todas las muestras analizadas con un valor medio de 21 µg/Kg. Por otro lado, algunos autores (Piemontese *et al.* 2005, Ritieni *et al.* 2003) han encontrado en Italia, tanto en zumos de manzana y pera como en purés y alimentos infantiles, valores superiores a los permitidos actualmente por la Unión Europea (50 ng PAT/g en zumos de fruta; 25 ng PAT/g en purés y compotas; 10 ng PAT/g en alimentos infantiles; Commission Regulation No. 1881/2006).

7. Estudio de la estabilidad de los tricotecenos tipo B y ocratoxina A en el proceso de elaboración del pan

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia de las diferentes condiciones de fabricación del pan sobre los niveles de DON, NIV, 3-ADON y OTA inicialmente presentes en la harina utilizada en dicho proceso. Con este propósito, se prepararon diferentes piezas de masa de pan según las recetas tradicionales de elaboración de pan en España. La masa se preparó con una mezcla de agua, cloruro sódico, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y harina de trigo previamente contaminada en el laboratorio con diferentes concentraciones de DON, 3-ADON, NIV y OTA como se explica en la Sección 7.4 de la parte Experimental. El cálculo de la reducción de micotoxina se efectuó según la Ecuación 17.

$$\% \text{ de reducción de micotoxina} = \frac{100 \times (C_0 - C_f)}{C_0} \quad [\text{Ec. 17}]$$

Donde C_0 es la cantidad de toxina inicial en la harina de trigo, C_f es el contenido en toxina al final del proceso (fermentación o fermentación + horneado). La diferencia entre la reducción del proceso completo y el proceso de fermentación es la reducción debida al proceso de horneado.

7.1 Efecto de la fermentación de la masa del pan

Antes de hornear la masa, ésta se dejó fermentar durante una hora a 29–30°C. Los porcentajes de reducción de las micotoxinas después de esta etapa aparecen en la Figura 52.

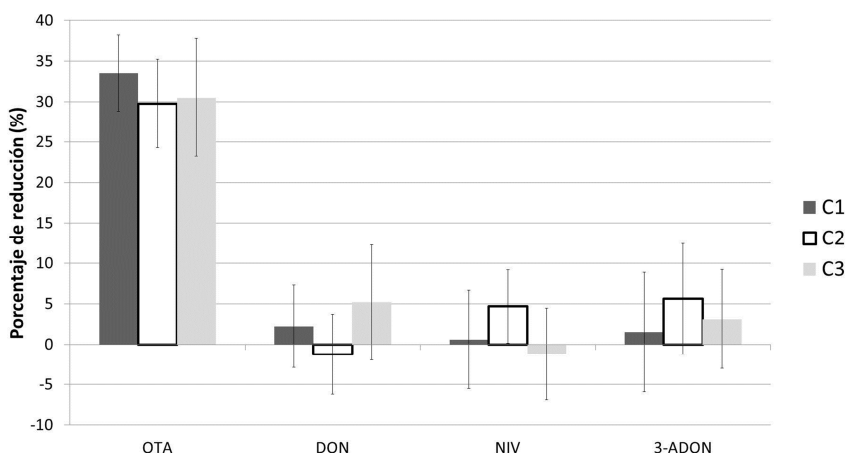


Figura 52. Reducción de las diferentes micotoxinas durante el proceso de fermentación de la masa (los segmentos representan la desviación estándar). Los niveles iniciales fueron: C1: 2 µg de OTA/Kg, 200 µg de DON, NIV y 3-ADON/Kg; C2: 5 µg de OTA/Kg, 750 µg de DON y 3-ADON/Kg y 500 µg de NIV/Kg; C3: 10 µg de OTA/Kg, 1500 µg de DON y 3-ADON/Kg y 1000 µg de NIV/Kg.

El estudio estadístico mediante el análisis de la varianza (ANOVA) mostró que no existe una disminución significativa (valor- $p < 0.05$) en las cantidades de ninguno de los tricotecenos durante la fermentación de la masa (Tabla 39). Por el contrario para la OTA, se observó una disminución de micotoxina de entre un 29.8–33.5% dependiendo de la concentración de OTA añadida, siendo en todos los casos, una diferencia significativa (valor- $p < 0.05$) respecto a la concentración inicial añadida a la harina.

Tabla 39. ANOVA de la reducción en la concentración inicial de tricotecenos B y OTA en la masa del pan antes y después de la fermentación.

Micotoxina		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
DON	Inter-grupos	18.952	1	18.952	.817	.379
	Intra-grupos	370.938	16	23.184		
	Total	389.890	17			
3-ADON	Inter-grupos	8.310	1	8.310	.357	.559
	Intra-grupos	372.624	16	23.289		
	Total	380.933	17			
NIV	Inter-grupos	52.395	1	52.395	1.920	.185
	Intra-grupos	436.539	16	27.284		
	Total	488.934	17			
OTA	Inter-grupos	4399.533	1	4399.533	168.771	.000
	Intra-grupos	417.089	16	26.068		
	Total	4816.621	17			

Aunque existen pocos trabajos dedicados a este tipo de estudio, algunos autores han analizado el efecto de la fermentación sobre el DON en pan egipcio (El Banna *et al.* 1983) o en pan francés o vienés (Samar *et al.* 2001). En ninguno de estos estudios se observó una reducción en los niveles de DON en la masa durante la fermentación a 30°C (una temperatura que se considera usual en la fabricación del pan). Sin embargo, cuando la fermentación se realizó a 50°C durante más de 60 min, se observó una reducción media del 56% en las concentraciones de DON en la masa del pan vienés (Samar *et al.* 2001). En el presente trabajo, además del DON, también se ha estudiado el efecto de la fermentación en la variación de los niveles de 3-ADON y NIV en la masa, y en ninguno de los casos, la fermentación de la masa afectó a los niveles de estas micotoxinas en las condiciones de ensayo. Los resultados se muestran en la Figura 52.

En relación al estudio de la OTA, los resultados presentados por otros autores (Scudamore *et al.* 2003) indican que no se ha observado una disminución de OTA durante la fermentación de pan. Sin embargo, se ha constatado que el proceso de fermentación de la masa contribuye a la reducción del nivel de otras micotoxinas (Westby *et al.* 1997). Además,

para otros sustratos como es el vino, se ha indicado una reducción significativa de OTA al final de la fermentación alcohólica, siendo esta reducción dependiente de la cepa de levadura involucrada en dicha fermentación y del tipo de vino (Cecchini *et al.* 2006). El porcentaje de OTA eliminado durante la fermentación alcohólica se sitúa entre 46.83% y 52.16% en vino blanco y entre 53.21% y 70.13% en vino tinto según condiciones de ensayo.

De los resultados obtenidos, se puede indicar que son necesarios estudios relacionados con el efecto de la fermentación y la estabilidad de las micotoxinas en diferentes matrices para determinar las condiciones bajo las cuales este proceso puede ser útil como herramienta para la eliminación de estas micotoxinas durante el proceso de fermentación de alimentos preparados para el consumo, como por ejemplo en la cerveza donde se ha detectado DON (Anselme *et al.* 2006).

7.2 Efecto del horneado de la masa del pan

Después de la fermentación de la masa, ésta se horneó bajo diferentes condiciones que son generalmente utilizadas en las panaderías españolas. Los porcentajes de reducción de tricotecenos B y OTA y sus respectivas desviaciones estándares se muestran en la Figura 53.

Por otro lado, también se analizó estadísticamente los valores de reducción obtenidos entre las diferentes micotoxinas (Tablas 40 y 41), en este caso, se observaron diferencias significativas (valor- $p < 0.05$) entre todas ellas. Con lo cual, la temperatura de horneado influye de manera distinta en la reducción de cada micotoxina. Como se puede observar la micotoxina que más redujo su proporción fue el NIV con un 76.9% de media, seguido de cerca por 3-ADON con un 65.6% de media, a continuación en menor medida, con una media de 47.8% el DON y por último la OTA con un valor medio de 32.9%.

Tabla 40. Parámetros estadísticos de la reducción de las micotoxinas obtenidos en el proceso de horneado del pan.

Micotoxina	N	Media	Desviación típica	Error típico
DON	36	47.85	9.62	1.60
3-ADON	36	65.59	8.92	1.49
NIV	36	76.89	8.73	1.45
OTA	36	32.93	11.30	1.88
Total	144	55.82	19.39	1.62

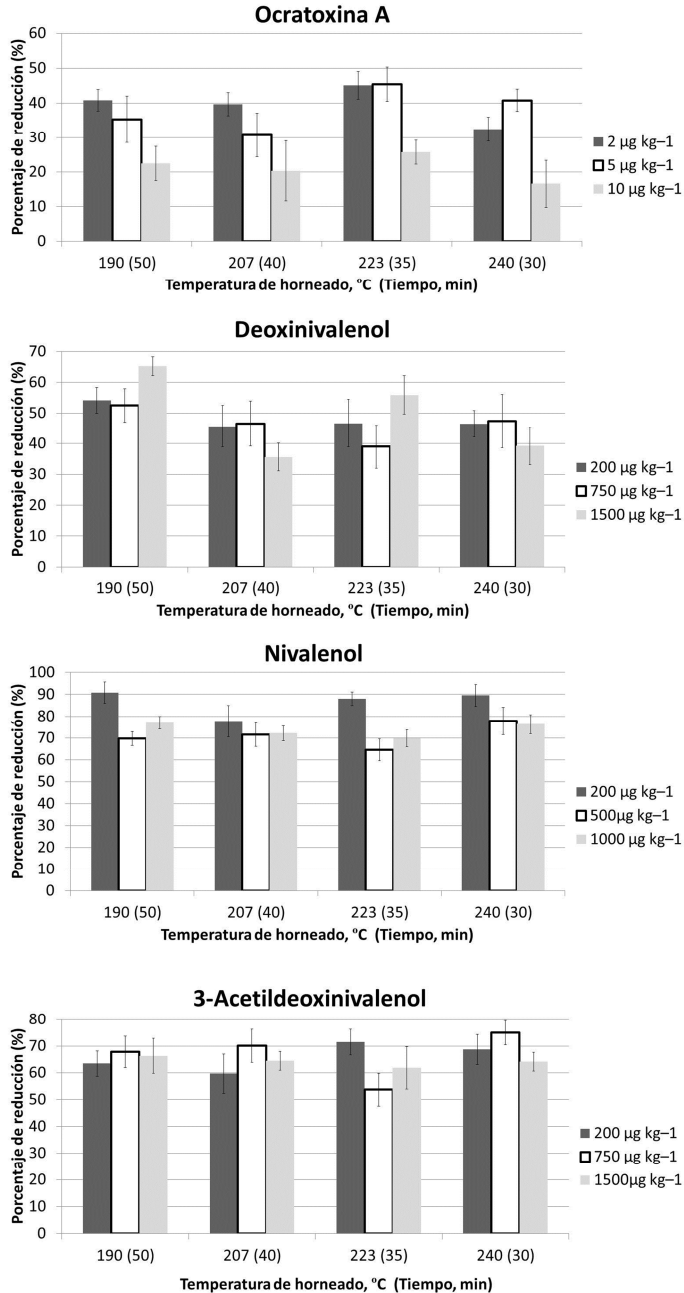


Figura 53. Reducción de OTA y tricotecenos B durante el horneado del pan en diferentes combinaciones de temperatura/tiempo y diferentes niveles de micotoxina añadida. Los segmentos verticales representan las desviaciones estándar.

Tabla 41. ANOVA de los valores medios de reducción entre las distintas micotoxinas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Inter-grupos	40568.889	3	13522.963	143.767	.000
Intra-grupos	13168.626	140	94.062		
Total	53737.515	143			

Otros autores han realizado ensayos de estabilidad de DON y OTA durante el proceso de panificación. En el caso de la OTA, Scudamore *et al.* (2003) indicaron que sólo existe una pequeña disminución de la concentración en el pan horneado respecto al contenido en harina blanca e integral inicial, sin indicar si fue, esa disminución, significativa. Resultados semejantes obtuvieron Osborne *et al.* (1996) que no encontraron pérdidas significativa de OTA en el pan a partir de la cantidad inicial añadida en la harina blanca o integral. Sin embargo, un estudio realizado por Boudra *et al.* (1995) en donde se analizó la termoestabilidad de la OTA en trigo molido, concluyó que la cantidad de OTA se reducía en un 80% a 200°C en un tiempo de 24 minutos, mientras que en 48 min se reducía hasta en un 94%, además indicaron que si se aumenta la temperatura a 250°C con tan sólo 16 min se eliminaba un 88% de la micotoxina.

Con respecto a la termoestabilidad de los tricotecenos, la FAO/WHO (2001b) señala que estas micotoxinas son estables a 120°C, moderadamente estables a 180°C, y se descomponen totalmente a 210°C en 30–40 min. Neira *et al.* (1997) compararon la reducción de DON a diferentes tiempos de cocción entre 10 y 40 min a una temperatura de 210°C; estos autores indicaron que durante el proceso de horneado del pan se produce una reducción media de la toxina del 21.6%, mientras que en el proceso conjunto de fermentación y cocción la máxima reducción de DON alcanzó un valor de 96.6%. Otros autores (Abbas *et al.* 1985) encontraron una reducción de DON en la elaboración de pan entre 19.1–69.4% según las condiciones de estudio. Sin embargo, Sugita–Konishi *et al.* (2006b) indicaron que la conservación de la toxina durante la elaboración del pan fue del 84–100%, y por tanto, la reducción del compuesto es baja. Además, otros autores han indicado que el DON no se destruye durante la fabricación de pan (Scott *et al.* 1983 y Tanaka *et al.* 1986). Tanaka *et al.* (1986) también analizaron NIV y determinaron que el proceso de horneado (170°C, 30 min) no afecta a las cantidades de toxina, ni en la harina contaminada naturalmente, ni en la harina contaminada con cantidades añadidas. En este último ensayo utilizaron una temperatura y tiempo de cocción menor al usado en el presente estudio, factores que pueden influir en la diferencia de resultados obtenidos para cada caso.

Es importante tener en consideración que la reducción de los niveles de toxina no implica una disminución equivalente de los efectos dañinos para la salud, debido a que procesos como el horneado y el hervido, a su vez, pueden producir nuevos componentes tóxicos (Bullerman y Ryu 2002,

Howard *et al.* 2002, Sugita–Konishi *et al.* 2006b, Yumbe–Guevara y Yoshizawa 2003). Estos nuevos compuestos son estructuralmente diferentes a los iniciales y su toxicidad es desconocida. Por tanto, sería necesario realizar ensayos por métodos bioquímicos para evaluar el potencial riesgo para la salud de los alimentos que contienen derivados de micotoxinas (Sugita–Konishi *et al.* 2006b).

A pesar de que la temperatura de horneado afecta en mayor o menor medida a la estabilidad de las micotoxinas, existen otros factores que también pueden influir en la estabilidad de las micotoxinas estudiadas como la presencia de levaduras usadas para la fermentación, el tiempo de la hornada, la forma y el peso de la pieza de pan, la adición de aditivos, etc. Así pues, existen estudios sobre los efectos de varios aditivos alimenticios, como agentes oxidantes (bromuro de potasio y ácido L–ascórbico) y agentes reductores (bisulfito de sodio y L–cisteína) en la estabilidad del DON presente en la harina. Asimismo, se ha descrito que en la masa fermentada, el bisulfito de sodio, la L–cisteína y el fosfato de amonio son moderadamente efectivos en la reducción del contenido de DON en pan. (Boyacioglu *et al.* 1993, Young 1986, Young *et al.* 1986).

La Unión Europea ha establecido unos límites máximos permitidos para la OTA y DON en cereales destinados al consumo humano de 3 µg/Kg y 750 µg/Kg, respectivamente (Commission Regulation No 1881/2006). También, en Europa, se ha indicado que es posible una ingesta diaria tolerable de 1 µg/Kg peso corporal para DON y una ingesta semanal tolerable de 120 ng de OTA/Kg peso corporal en el consumidor (FAO/WHO 2001a, Gareis *et al.* 2003, Samar *et al.* 2007), que para una persona de 70 Kg de peso supone un consumo de OTA de 8.4 µg/semana, mientras que para el DON llega ser de 70 µg/día. Si se considera que en la elaboración de pan se reduce la OTA y el DON en un porcentaje medio del 60.2% y 47.9%, respectivamente y se supone que la harina con la que se elabora el pan está contaminada con los límites máximos permitidos por Unión Europea (OTA 3 µg/Kg y DON 750 µg/Kg), los valores de concentración de OTA y DON se reducirían a 1.19 µg/Kg y 390.8 µg/Kg, respectivamente en la harina una vez elaborado el pan. Si se combinan estos valores con la ingesta tolerable para una persona de 70 Kg, esto equivaldría al consumo tolerable de 7.5 Kg a la semana de pan en el caso de OTA (1.07 Kg al día de media) y una ingesta de 190 g diarios de pan en el caso de DON. Pero si se considera que la Unión Europea ha establecido como límite máximo permitido de DON en pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno de 500 µg/Kg, el consumo diario tolerable se maximiza a tan sólo 140 g diarios de pan como valor límite. Por tanto, en el caso de DON es posible que se supere la ingesta diaria tolerable recomendable según la normativa europea vigente, debido a que no sólo se consume pan sino otros productos derivados de los cereales que también pueden contener dicho metabolito. Por tanto, sería necesaria una revisión de los valores máximos permitidos por la Unión Europea para minimizar el riesgo en el consumo humano.

7.3 Efecto del horneado sobre el contenido de micotoxinas en el interior y exterior del pan

En este estudio, se ha considerado de interés la localización de la toma de muestra en la pieza de pan. Cuando se determinó la cantidad de micotoxinas que se encuentra en la parte externa frente a la parte interna del pan se observó como norma general, una mayor disminución, aunque ligera, en el exterior del pan (Figura 54). Los porcentajes de reducción en el interior de la pieza de pan fueron para la OTA entre 7.3– 38.2%, para el NIV entre 46.4 y 83.4%, para 3–ADON entre 42.5 y 64.7% y para DON entre 18.1% y 62.6%. Mientras, en la corteza de la pieza de pan, los porcentajes de reducción fueron para la OTA entre 20.4 y 51.3%, para NIV entre 72.0 y 93.1%, para 3–ADON entre 58.3 y 83.4% y para DON entre 41.0 y 70.67%.

Cuando se compararon estadísticamente los valores de toxina obtenidos entre las dos zonas de pan analizadas (Tabla 42) se observaron, en la mayoría de los casos, diferencias significativas (valor- $p < 0.05$) entre las dos partes comparadas e independientemente de la temperatura (debido a que no se obtienen diferencias entre las distintas temperaturas de horneado como se ha indicado en el apartado anterior), siendo la parte interna donde se produce siempre una disminución media menor de la cantidad de micotoxina. Sin embargo, existen algunos casos donde no se observaron esas diferencias, como por ejemplo en la OTA a concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, a pesar de ello, el valor medio de reducción de OTA fue siempre superior en la parte externa. La diferencia de reducción, entre las dos zonas (interna y externa) a las temperaturas de ensayo, varió entre un valor mínimo de 4.9% para la OTA a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y una diferencia máxima de 18.5% para el NIV en una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, siendo la diferencia de reducción media para cada toxina entre la zona interna y externa en el conjunto de todas las concentraciones y temperaturas ensayadas de 10.8% para la OTA, 11.4% para el DON, 13.5% para el 3–ADON y un 16.2% para el NIV. Estas diferencias observadas entre la parte interna y externa del pan pueden ser debidas al tiempo adicional que necesita la parte interna, en contraposición a la parte superficial, para alcanzar la temperatura del horno, esto conlleva, que un tiempo inferior de horneado para la zona interna suponga una menor disminución de micotoxina.

El tamaño de la pieza de pan también puede tener un efecto importante en el nivel de reducción de las diferentes micotoxinas durante el horneado y puede ser uno de los factores por los que diferentes autores hayan obtenido resultados discordantes.

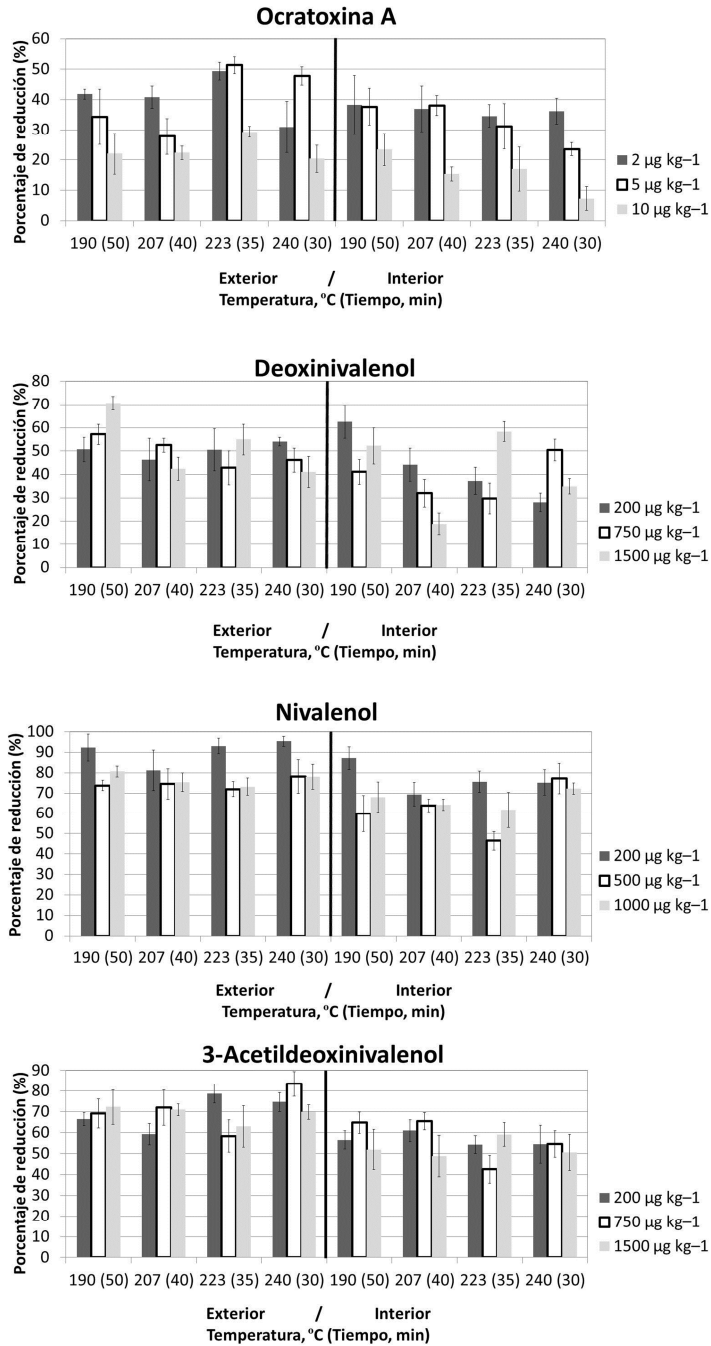


Figura 54. Reducción de OTA y tricotecenos B durante el horneado del pan en función de diferentes combinaciones de temperatura/tiempo, zona interna o externa del pan y niveles de micotoxina añadida. Los segmentos verticales representan las desviaciones estándar.

Tabla 42. ANOVA de la reducción de micotoxinas en la parte interna y externa del pan.

Micotoxina		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
DON	Inter-grupos	1782.543	1	1782.543	9.621	.003
	Intra-grupos	12969.827	70	185.283		
	Total	14752.370	71			
3-ADON	Inter-grupos	3801.629	1	3801.629	32.178	.000
	Intra-grupos	8270.095	70	118.144		
	Total	12071.725	71			
NIV	Inter-grupos	2563.280	1	2563.280	23.364	.000
	Intra-grupos	7679.770	70	109.711		
	Total	10243.050	71			
OTA	Inter-grupos	781.904	1	781.904	4.951	.029
	Intra-grupos	11053.911	70	157.913		
	Total	11835.815	71			

8. Multidetección de micotoxinas mediante LC–MS en harina de trigo

Como consecuencia de la posible coincidencia de diversas toxinas en la harina de trigo, se considera de gran importancia, la multidetección de las mismas. Por tal motivo, se estudia la determinación simultánea de un amplio número de micotoxinas mediante distintos sistemas de cromatografía líquida y espectrometría de masas.

8.1 Determinación de micotoxinas mediante LC y espectrometría de masas de trampa de iones

En primer lugar, se estudia el comportamiento de los analitos OTA, OTB, NIV, DON y 3–ADON en el detector por espectrometría de masas con las fuentes de ionización por electrospray (ESI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI). En función de dicho comportamiento, en cada fuente, se seleccionaron las masas de los aductos de cada micotoxina más adecuadas. Los parámetros de MS optimizados para la detección de cada micotoxina en función del tipo de ionización están resumidos en la Tabla 43. Para la determinación de las micotoxinas con la fuente de ionización APPI, no se observaron las micotoxinas OTA, DON y NIV por infusión directa con una concentración de los estándares de 50 mg de micotoxina/Kg por lo que se descartaron para el análisis en la muestra, mientras OTB y 3–ADON se pudieron determinar en modo positivo. Mientras que con la fuente ESI, las micotoxinas OTA y OTB se determinaron en modo negativo y los tricotecenos tipo B se determinaron en modo positivo.

Tabla 43. Ión seleccionado para la determinación de cada micotoxina estudiada por espectrometría de masas de trampa de iones con fuentes de ionización ESI y APPI.

Micotoxina	Ionización	Aducto analizado	Ión analizado (m/z)
OTA	ESI	[M–H] [–]	403
OTB	ESI	[M–H] [–]	368
3–ADON	ESI	[M+H] ⁺	339
15–ADON	ESI	[M+H] ⁺	339
DON	ESI	[M+H] ⁺	297
NIV	ESI	[M+H] ⁺	313
3–ADON	APPI	[M+H] ⁺	339
OTB	APPI	[M+H] ⁺	370

Los coeficientes de determinación obtenidos en los estándares de las distintas micotoxinas se muestran en la Tabla 44, siendo el intervalo de linealidad para cada toxina de: NIV entre 5–50 mg/Kg; DON y 3–ADON entre 0.1–50 mg/Kg y por último OTA y OTB en un intervalo de 0.01 a 50 mg/Kg, pudiéndose considerar los valores de r^2 como aceptables, en los casos que se usó ESI como fuente de ionización. Sin embargo, cuando se utilizó una fuente APPI, para los dos metabolitos secundarios que se observaban (3–ADON y OTB), las concentraciones a las que se detectaban fueron tan altas que directamente se descartó esta fuente de ionización para la determinación de las micotoxinas (Figura 55). Por tanto, los resultados obtenidos por una fuente ESI fueron significativamente mejores a los utilizados por una fuente APPI.

Tabla 44. Parámetros analíticos empleados para la determinación de las micotoxinas estudiadas en harina de trigo por LC–MS de trampa de iones. Contaminación añadida de 5 mg de micotoxina/Kg, extracción con AcN–H₂O (80:20).

Micotoxina	Fuente de ionización	r^2	LOD (mg/Kg)	Recuperación (%)	RSD (%)
NIV	ESI	0.9912	5.5	n.d.	n.d.
DON		0.9706	0.5	62.3	5.8
3–ADON		0.9723	0.6	76.6	3.9
OTB		0.9879	0.03	82.1	7.1
OTA		0.9867	0.09	63.6	5.2
3–ADON	APPI	n.d.	6.0	n.d.	n.d.
OTB		n.d.	3.4	n.d.	n.d.

n.d. no detectado

n=3

En la Tabla 44 también aparecen los límites de detección que se determinaron para las cinco micotoxinas estudiadas en la harina de trigo utilizando la fuente de ionización ESI. Los valores obtenidos para la OTA (0.09 mg/Kg) y el DON (0.5 mg/Kg) son demasiado elevados según la normativa europea que establece unos valores de 5.0 ng de OTA/g para cereales no elaborados y de 0.75 mg de DON/Kg en harina de cereales (Commission Regulation No 1881/2006). A pesar de ello las recuperaciones obtenidas mediante una simple extracción con AcN–H₂O (80:20 v/v) fueron superiores al 60% en todos los casos menos en el NIV que no se determinó debido a la gran cantidad de micotoxina necesaria para poder detectarla. La Figura 56 muestra los cromatogramas obtenidos de una mezcla de estándares de micotoxinas utilizados para optimizar los parámetros cromatográficos y la Figura 57 representa un cromatograma de una muestra de harina de trigo contaminada con 5 mg de cada micotoxina/Kg, observándose que el NIV no se identifica (t_r 4.0 min) debido a que su límite de detección es superior a la cantidad añadida en la harina.

Para mejorar la determinación de las micotoxinas mediante el detector de masas de trampa de iones, se realizó la fragmentación del ión precursor de cada micotoxina (MS2) (en Tabla 43 el ión analizado) utilizándose para la determinación de la micotoxina el ión hijo mayoritario. Sin embargo, la rotura del ión precursor produjo una multitud de iones fragmento, todos de muy baja sensibilidad que impidieron la selección del ión producto adecuado (MS2). A pesar de ser un método más selectivo no se pudo aplicar debido a la baja sensibilidad obtenida en los iones producto.

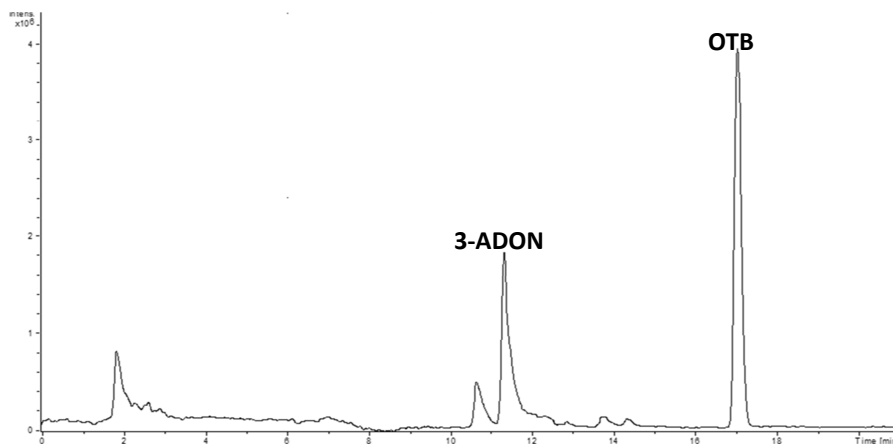


Figura 55. Cromatograma obtenido mediante LC-MS de trampa de iones con fuente de ionización APPI en modo SIM de una mezcla de los estándares estudiados a una concentración de 50 mg de cada micotoxina/l de AcN.

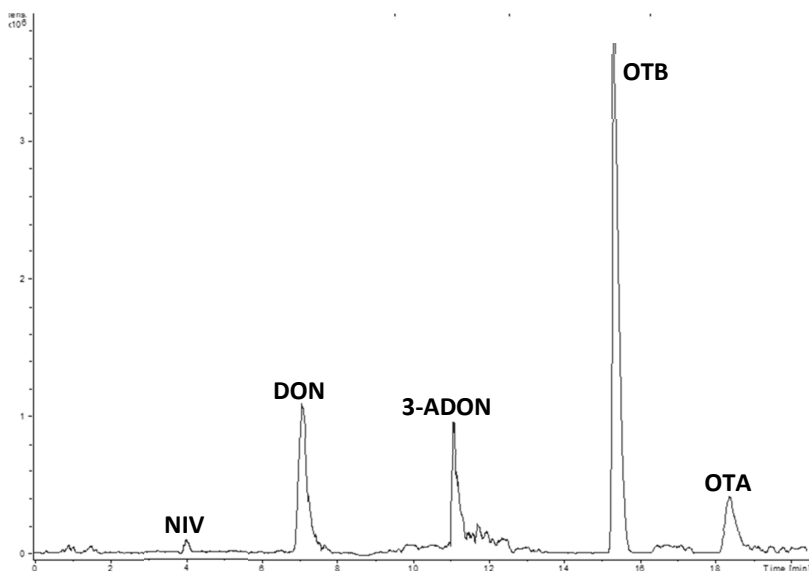


Figura 56. Cromatograma obtenido mediante LC-MS de trampa de iones con fuente de ionización ESI en modo SIM de una mezcla de estándares de NIV, DON, 3-ADON, OTB y OTA a una concentración de 50 mg de cada micotoxina/l de AcN.

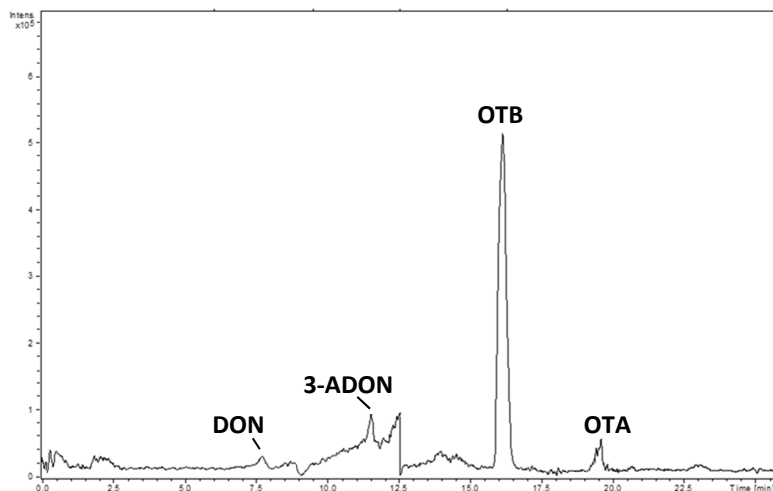


Figura 57. Cromatograma obtenido mediante LC-MS de trampa de iones con fuente de ionización ESI en modo SIM de una muestra de harina contaminada con 5 mg de NIV, DON, 3-ADON, OTB y OTA /Kg de harina de trigo. Extracción con una mezcla de AcN-H₂O (80:20).

8.2 Determinación de micotoxinas mediante LCy espectrometría de masas simple cuadrupolo

Debido al bajo límite de detección obtenido utilizando el espectrómetro de masas de trampa de iones se decidió estudiar el comportamiento de estos analitos junto con otras nuevas micotoxinas mediante un espectrómetro de simple cuadrupolo y fuente de ionización API-ES.

Dependiendo del comportamiento de los analitos en la fuente API-ESI se seleccionaron los fragmentos masa/carga más adecuados para cada caso. En la Tabla 45 están resumidos los parámetros de LC-MS optimizados para la detección de cada micotoxina estudiada en función del tipo de ionización. En ella, se observa que el ión mayoritario más adecuado para el análisis es siempre obtenido en modo positivo y forma el aducto con sodio $[M+Na]^+$, a pesar de que el agua empleada era Milli-Q.

Para la determinación de las micotoxinas, se hallaron los límites de detección y los coeficientes de determinación en muestras de harina de trigo. Los resultados se muestran en la Tabla 46. Los coeficientes de determinación presentaron una buena linealidad de los componentes de interés en el intervalo de estudio que en este caso fue: NIV y OTA entre 0.5 a 5 mg/Kg, DON, 3-ADON, OTB, HT2 y ZEA entre 0.1 a 5 mg/Kg y por último, para DAS y T2 de entre 0.05 a 5 mg/Kg. Los límites de detección encontrados para NIV, DON, 3-ADON y OTB (0.13, 0.058, 0.035, 0.026 mg/Kg, respectivamente) fueron mejores que los obtenidos por espectrometría de masas de trampa de iones (Tabla 44), incluso en algún caso, como en el NIV, fue más de 10 veces inferior. Este método se puede

aplicar para la determinación de DON en muestras de harina de trigo debido a que según la normativa europea vigente establece como contenido máximo permitido de DON de 0.75 mg/Kg en harina de cereales y el LOD encontrado para el DON fue muy inferior, mientras en el caso de la ZEA (LOD: 0.04 mg/Kg) estaría en el límite, ya que el contenido máximo que debe presentar la harina de cereal es de 0.075 mg de ZEA/Kg (Commission Regulation No 1881/2006). Para las micotoxinas T2 y HT2, los LOD fueron respectivamente 0.0074 mg/Kg y 0.034 mg/Kg.

Tabla 45. Adupto analizado para la determinación de las micotoxinas estudiadas por espectrometría de masas de simple cuadrupolo con fuente de ionización API-ES.

Micotoxina	Adupto analizado	Ión analizado (m/z)
3-ADON	[M+Na] ⁺	361
DON	[M+Na] ⁺	319
NIV	[M+Na] ⁺	335
OTA	[M+Na] ⁺	426
OTB	[M+Na] ⁺	392
ZEA	[M+Na] ⁺	341
DAS	[M+Na] ⁺	389
HT2	[M+Na] ⁺	447
T2	[M+Na] ⁺	489

Tabla 46. Límites de detección y coeficientes de determinación de las distintas micotoxinas estudiadas en harina de trigo por LC-MS de simple cuadrupolo en modo SIM.

Micotoxina	r ²	LOD (mg/Kg)
NIV	0.9879	0.13
DON	0.9785	0.058
3-ADON	0.9936	0.035
OTB	0.9978	0.026
OTA	0.9992	0.21
DAS	0.9731	0.0081
HT2	0.9904	0.034
T2	0.9868	0.0074
ZEA	0.9934	0.040

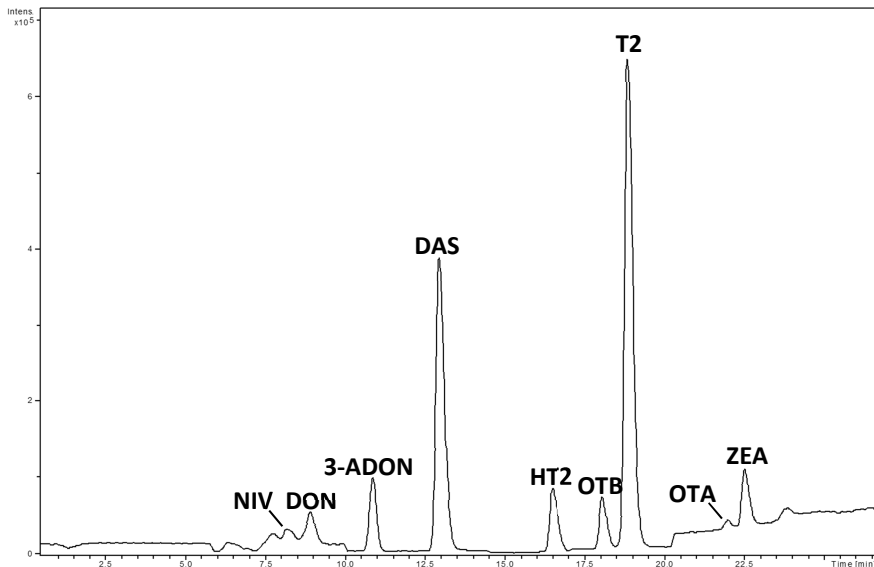
Se realizó un estudio de recuperación de las micotoxinas de interés en función de la mezcla de disolventes de extracción utilizada (Tabla 47). Para ello se compararon varias disoluciones de extracción constituidas por una mezcla de AcN-H₂O con distintas relaciones: (60:40 v/v), (80:20 v/v) y (84:16 v/v) y por último una cuarta mezcla de AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/v) en muestras contaminadas entre 0.1 y 5 mg toxina/Kg. Las recuperaciones variaron según la micotoxina y la mezcla de disolventes extrayentes. En el caso de 3-ADON los mejores resultados se obtuvieron para la extracción con AcN-H₂O (84:16 v/v) con unos valores de 91.9% y 98.3% cuando se añadió 1.0 y 0.1 respectivamente, aunque cuando se contaminó la muestra con 5 mg/Kg el valor de recuperación fue relativamente bajo (46.6%). En el caso del DON, las recuperaciones variaron considerablemente entre las distintas disoluciones de extracción utilizadas siendo la mejor, al igual que en el caso anterior, la mezcla AcN-H₂O (84:16 v/v) con un 69.6% para un nivel de contaminación de 0.1 mg/Kg. Para el NIV se obtuvieron en casi todos los casos, valores muy bajos, por debajo del 60%, por lo que sería un método de extracción poco apropiado. Cuando se realizó el estudio de recuperación en el caso de OTA, se comprobó que los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla AcN-H₂O (60:40 v/v) con 82.9% para un 1.0 mg de micotoxina añadida/Kg de muestra y en menor medida por AcN-H₂O (84:16 v/v) y AcN-H₂O (80:20 v/v). Sin embargo, en el caso de la OTB, el mejor extrayente fue la mezcla que contenía ácido acético con unos valores que variaron entre el 72 y el 92%, según nivel de contaminación. En el estudio de la recuperación para DAS, los mejores resultados se obtuvieron con mezclas de disolvente de AcN-H₂O (84:16 v/v) y (80:20 v/v). En el caso de HT2 y T2 fue la mezcla que contenía AcN-H₂O (80:20 v/v) en la que se obtienen las mayores recuperaciones, 80.9% y 73.3% respectivamente, para una contaminación de 0.1 mg/Kg en muestra. Para finalizar, en la ZEA no se obtuvieron diferencias en entre las distintas mezclas, variando los valores entre el 71.8% al 95.5%. En general, si se tuviera que seleccionar una mezcla de disolventes para la realización de la extracción de todas las micotoxinas, ésta sería AcN-H₂O (84:16 v/v) por obtenerse una mayor recuperación en el conjunto de toxinas.

La Figura 58 representa el cromatograma de una muestra de harina de trigo contaminada con 1.0 mg de cada toxina/Kg determinadas por LC-MS de simple cuadrupolo en modo SIM, en ella se puede observar, que todas las micotoxinas están separadas entre sí y además no se observa una gran cantidad de interferentes a pesar de sólo haberse realizado, como paso previo, una simple extracción.

Tabla 47. Recuperación y RSD de micotoxina/Kg de harina empleando diversas mezclas de disolvente de extracción y LC-MS de simple cuadrupolo.

Micotoxina	Contaminación (mg/Kg)	Recuperación AcN-H ₂ O (60:40) (%)	RSD (%)	Recuperación AcN-H ₂ O (80:20) (%)	RSD (%)	Recuperación AcN-H ₂ O-HAc (80:19:1) (%)	RSD (%)	Recuperación AcN-H ₂ O (84:16) (%)	RSD (%)
3-ADON	5.0	31.3	3.2	18.1	2.5	37.3	3.5	46.6	3.3
	1.0	60.4	4.2	99.9	5.1	85.0	3.0	91.9	3.8
	0.1	34.5	4.5	65.1	5.4	69.4	6.2	98.3	6.4
DON	5.0	83.2	4.4	102.3	4.3	96.6	2.4	99.1	4.8
	1.0	64.6	3.5	71.2	4.3	39.3	4.4	66.3	5.3
	0.1	70.35	5.9	27.4	5.7	43.2	6.1	69.6	4.8
NIV	5.0	34.4	2.4	66.7	3.1	45.9	4.0	56.6	5.2
	1.0	49.3	4.4	29.7	4.2	13.9	1.4	23.5	5.1
	0.1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
OTA	5.0	71.5	3.1	81.8	4.6	46.7	3.7	95.8	3.3
	1.0	82.9	4.3	71.9	7.4	80.2	5.8	64.4	4.3
	0.1	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
OTB	5.0	51.4	4.7	84.2	3.7	83.2	4.3	81.5	3.7
	1.0	66.4	3.5	66.1	3.5	71.7	6.2	61.4	4.8
	0.1	82.6	5.8	84.7	5.1	91.7	5.4	88.5	5.2
DAS	1.0	73.5	2.7	110.2	4.0	100.4	5.0	96.3	4.2
	0.1	58.3	4.9	79.2	4.7	68.1	5.8	73.3	6.3
HT2	1.0	81.7	5.8	102.6	3.1	94.9	5.3	94.8	6.3
	0.1	60.8	4.9	80.9	5.5	72.4	5.2	75.9	5.0
T2	1.0	81.5	4.2	85.8	3.8	83.6	4.3	78.9	2.9
	0.1	75.4	5.5	73.3	4.3	60.9	5.2	65.4	5.4
ZEA	1.0	75.9	3.0	73.5	4.6	74.0	3.2	71.8	4.3
	0.1	87.6	5.1	92.8	5.8	85.5	4.5	95.5	5.6

n.d. no detectado; n=3

**Figura 58. Cromatograma de las micotoxinas estudiadas obtenido por LC-MS de simple cuadrupolo en modo SIM de una muestra de harina contaminada con 1 mg de cada toxina/Kg y extraída con AcN-H₂O (80:20 v/v).**

8.3 Determinación de micotoxinas mediante LC y espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Debido a que en alguna micotoxina el límite de detección obtenido con el espectrómetro de masas de simple cuadrupolo no era lo suficientemente bajo como para poderse aplicar en la detección de micotoxinas en alimentos según la normativa europea vigente (Commission Regulation, 2006), se optó por estudiar el comportamiento de estas nueve micotoxinas junto con otras micotoxinas que también pueden estar presentes en la harina de trigo, mediante un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo y fuente de ionización ESI en el que se puede conseguir una selectividad mayor debido a que el análisis comporta la rotura del ión precursor para analizar los iones producto mayoritarios. Por tanto, al ser un método más selectivo es posible que el ruido de fondo sea menor y como consecuencia los límites de detección puedan disminuir.

Según el comportamiento de los iones de cada micotoxina en la fuente ESI, se seleccionó el ión de masa/carga más adecuado como ión padre, después se realizó una fragmentación del ión precursor mediante una energía de colisión optimizada, seleccionándose, en cada caso, el ión hijo mayoritario para el análisis. Los parámetros de LC-MS optimizados para la detección de cada micotoxina están resumidos en la Tabla 48. La mayoría de los iones precursores de las distintas micotoxinas fueron ionizados en modo positivo excepto el de NIV, DON y ZEA que fueron ionizados en modo negativo. En modo positivo el ión precursor fue principalmente el aducto formado con un protón, $[M+H]^+$, aunque DAS, OTB, HT2 y T2 formaron como ión padre mayoritario el aducto con ión Na, $[M+Na]^+$. En modo negativo el aducto mayoritario fue siempre el formado por desprotonación $[M-H]^-$.

Tabla 48. Condiciones optimizadas para la determinación de las micotoxinas estudiadas por ESI-MS y ESI-MS/MS de triple cuadrupolo.

Micotoxina	Íon precursor (m/z)	Íon hijo (m/z)	Energía de colisión (eV)	Potencial de cono (V)
AFB1	313.0 $[M+H]^+$	241.2	40	35
AFB2	315.0 $[M+H]^+$	243.3	45	40
AFG1	328.9 $[M+H]^+$	243.3	35	30
AFG2	330.9 $[M+H]^+$	245.2	40	35
3-ADON	338.8 $[M+H]^+$	137.3	20	10
DAS	389.1 $[M+Na]^+$	247.4	60	45
OTB	391.9 $[M+Na]^+$	227.3	35	20
OTA	403.8 $[M+H]^+$	358.2	25	15
HT2	447.1 $[M+Na]^+$	285.3	35	25
T2	489.0 $[M+Na]^+$	245.3	35	30
DON	295.0 $[M-H]^-$	138.4	20	20
NIV	311.0 $[M-H]^-$	183.2	60	30
ZEA	317.1 $[M-H]^-$	131.3	45	25

El detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo proporcionó resultados distintos a los obtenidos con los anteriores espectrómetros utilizados. Los LODs en algunas ocasiones fueron mejores como la OTA frente al simple cuadrupolo (15 mg/Kg frente a 21mg/Kg), pero por el contrario en otros casos las micotoxinas no se pudieron determinar como NIV y DON, siendo en todo caso superiores a 5 mg/Kg (Tabla 49). Los límites de detección variaron desde 2.7 µg/Kg para OTB a 123 µg/Kg para 3-ADON.

En general, los coeficientes de determinación indicaron una buena linealidad de los analitos en el intervalo de estudio, que en este caso fue: DAS y 3-ADON entre 0.5 a 5 mg/Kg, OTA, HT2 y ZEA entre 0.1 a 5 mg/Kg, AFB1, AFG1 y AFG2 entre 0.05 a 5 mg/Kg y por último para OTB, AFB1 y T2 de entre 0.025 a 5 mg/Kg (Tabla 49).

Tabla 49. Límites de detección y coeficientes de determinación de las distintas micotoxinas en harina de trigo por LC-MS de triple cuadrupolo en modo MRM.

Micotoxina	r ²	LOD (µg/Kg)
NIV	n.d.	n.d.
DON	n.d.	n.d.
3-ADON	0.9975	123
OTB	0.9992	2.7
OTA	0.9994	15.0
DAS	0.9999	321
HT2	0.9970	13.9
T2	0.9921	3.6
ZEA	0.9988	31.2
AFB1	0.9180	7.2
AFB2	0.9936	17.5
AFG1	0.9935	24.1
AFG2	0.9999	20.2

n.d. no determinado

Los valores de recuperación y RSD obtenidos para las distintas mezclas de extracción se muestran en la Tabla 50. Se puede observar que los mejores valores de recuperación para el 3-ADON fueron los obtenidos con AcN-H₂O-HAc (80:19:1v/v/v) y AcN-H₂O (84:16 v/v) con unos valores de 75.6 y 76.7% respectivamente, mientras para la OTA las recuperaciones más elevadas se observaron con AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/v) y AcN-H₂O (84:16 v/v) con porcentajes de 68.1 y 73.5%, respectivamente. Para la micotoxina DAS, al igual que en el caso anterior, los mejores resultados se obtuvieron con AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/v) y AcN-H₂O (84:16 v/v)

con 100.4 y 96.3%, respectivamente. Por el contrario los tricotecenos tipo A, HT2 y T2, tienen las mejores recuperaciones con la mezcla de AcN-H₂O (80:20 v/v) con 76.5 y 75.7%, respectivamente. En la ZEA, el valor más elevado de recuperación, 81.5%, se obtuvo con una mezcla de AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/), y para la AFG1 con la mezcla AcN-H₂O (84:16 v/v) con una recuperación de 69.4%. Para las restantes micotoxinas se han encontrado recuperaciones inferiores al 60% por lo que no se deberían de tomar en consideración para realizar la cuantificación. De las 4 mezclas de extracción estudiadas, AcN-H₂O (84:16 v/v) fue la que proporcionó los mejores resultados, debido a que se pudo aplicar a un mayor número de micotoxinas con satisfactorias recuperaciones.

Tabla 50. Recuperación y RSD de cada micotoxina en harina contaminada con 0.5 mg/Kg en diferentes condiciones de extracción y determinadas por LC-MS de triple cuadrupolo.

Micotoxina	Recuperación		Recuperación		Recuperación		Recuperación	
	AcN-H ₂ O (60:40) (%)	RSD (%)	AcN-H ₂ O (80:20) (%)	RSD (%)	AcN-H ₂ O- HAc (80:19:1) (%)	RSD (%)	AcN-H ₂ O (84:16) (%)	RSD (%)
3-ADON	55.8	3.1	126.8	3.1	73.6	4.5	76.7	3.8
DON	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NIV	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OTA	41.9	4.1	55.9	4.6	68.1	3.2	73.5	2.3.
OTB	33.0	4.6	42.4	3.8	47.0	4.5	45.1	4.1
DAS	73.5	3.6	110.2	4.4	100.4	5.3	96.3	4.0
HT2	19.4	4.9	76.5	3.5	64.2	5.6	65.8	5.2
T2	12.9	4.1	75.7	3.9	51.6	4.3	53.3	3.8
ZEA	65.2	3.7	71.6	4.3	81.5	3.2	67.5	4.1
AFB1	23.4	2.3	29.8	4.8	29.5	4.7	31.6	3.6
AFB2	23.5	3.7	n.d	-	n.d.	-	n.d.	-
AFG1	60.8	3.0	65.4	4.2	65.8	3.4	69.4	4.1
AFG2	54.2	2.8	51.2	5.1	54.7	3.2	59.8	4.5

n.d. no detectado

n=3

Por tanto, de este estudio, se puede inferir que la espectrometría de masas de triple cuadrupolo estaría básicamente encaminada a la identificación de las micotoxinas presentes en la harina de trigo dada su alta selectividad. La Figura 59 muestra los cromatogramas obtenidos por espectrometría de masas de triple cuadrupolo con ionización ESI en modo MRM de las distintas micotoxinas determinadas para una muestra de harina de trigo contaminada con 0.5 mg/Kg, cada una de ellas extraída previamente con AcN-H₂O (80:20 v/v).

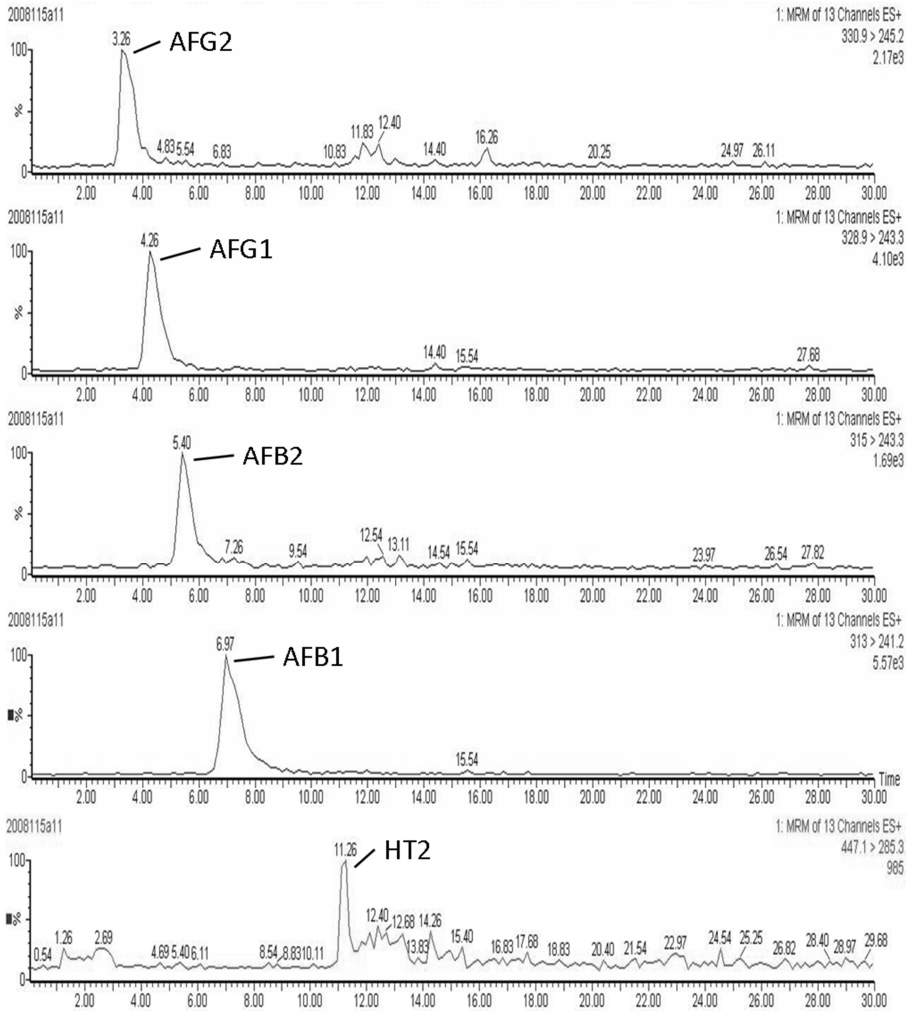
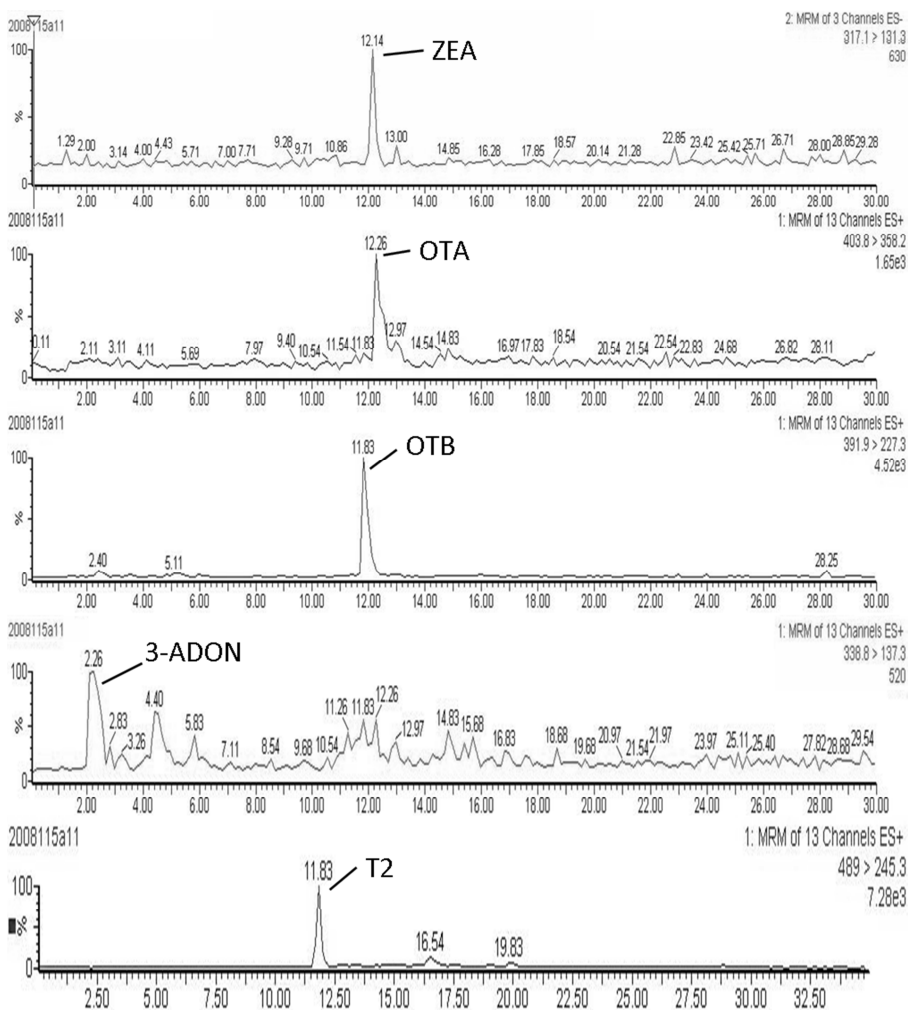


Figura 59. Cromatogramas obtenidos mediante LC-ESI-MS/MS en modo MRM de las distintas micotoxinas de una muestra de harina de trigo contaminada con 0.5 mg/Kg. Extracción con AcN-H₂O (80:20).



Continuación Figura 59. Cromatogramas obtenidos mediante LC-ESI-MS/MS en modo MRM de las distintas micotoxinas de una muestra de harina de trigo contaminada con 0.5 mg/Kg. Extracción con AcN-H₂O (80:20).

8.4 Determinación de micotoxinas mediante LC y espectrometría de masas de triple cuadrupolo de última generación

Para el estudio analítico de micotoxinas utilizando UPLC® acoplado al espectrómetro de triple cuadrupolo de última generación (ver Sección Experimental 8.4.2.2), se han seleccionado dos micotoxinas de gran interés toxicológico, DON y OTA, que se han utilizado para comprobar la eficiencia de los equipos que disponen de las nuevas técnicas en espectrometría de masas de triple cuadrupolo frente a los equipos precedentes indicados en el apartado anterior.

En función de los iones mayoritarios de cada micotoxina se seleccionó aquél de masa/carga más adecuada como ión precursor en la fuente ESI.

Posteriormente se optimizaron los parámetros de fragmentación del ion precursor, seleccionándose los dos iones hijos mayoritarios para la determinación de las micotoxinas. Los parámetros de LC-MS obtenidos para la detección de DON y OTA están expuestos en la Tabla 51. Los iones precursores de las dos micotoxinas estudiadas fueron ionizados en modo positivo, siendo en ambos casos, el ión precursor el aducto formado entre el analito y un protón, $[M+H]^+$.

Tabla 51. Condiciones seleccionadas para la determinación de las micotoxinas por ESI-MS y ESI-MS/MS de triple cuadrupolo.

Micotoxina	Ión precursor (m/z)	Ión hijo (m/z)	Energía de colisión (eV)	Potencial de cono (V)
OTA	404 $[M+H]^+$	358.1	15	30
OTA	404 $[M+H]^+$	239.0	20	30
DON	297 $[M+H]^+$	249.0	15	30
DON	297 $[M+H]^+$	203.1	20	30

La relación de áreas de cada par de iones hijo seleccionados para cada micotoxina fue aproximadamente de 2.5 para el DON y de 1.1 para la OTA.

En la Tabla 52 se pueden observar los valores del límite de detección obtenidos para las micotoxinas estudiada mediante el espectrómetro de masas utilizado. Estos LODs fueron los más bajos conseguidos en el presente trabajo, con un valor de 43 ng/ml para el DON y de 8 ng/ml para la OTA. Esto implica que con esta técnica analítica se pueden mejorar sustancialmente los LOD de las micotoxinas de interés, debido, principalmente, a la mejora en la ionización de las micotoxinas en el espectrómetro de masas. Por otra parte, el sistema de cromatografía líquida utilizado aporta una disminución en el tiempo de análisis y un ahorro considerable en disolventes debido al menor flujo (0.3 ml/min) y un tiempo de análisis más corto (unos 6 min).

Tabla 52. Coeficientes de determinación para el intervalo de concentraciones de 10–200 ng de micotoxina/ml y límites de detección de las distintas micotoxinas estudiadas en harina de trigo empleando LC-MS de triple cuadrupolo en modo MRM.

Micotoxina	Relación área/concentración	r^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
DON	Lineal	0.8945	43
	Cuadrática	0.9892	
OTA	Lineal	0.9024	8.3
	Cuadrática	0.9953	

La linealidad obtenida de la relación entre área *vs* concentración de los analitos estudiados fue bastante pobre incluso a intervalos de concentración de un orden de magnitud entre 10 ng/ml y 200 ng/ml de estándar, esto fue debido a que la tendencia de la curva de calibrado no fue lineal sino cuadrática, como se comprobó al calcular los coeficientes de determinación (Tabla 52). Por el contrario, se obtuvo una curva de calibrado lineal a partir de un intervalo de concentraciones menor de 10 a 100 ng/ml, en donde los coeficientes de determinación calculados fueron de 0.9927 para la OTA y de 0.9939 para el DON.

Como se ha indicado en la Sección anterior 8.3, la mejor mezcla para la extracción de OTA y DON fue AcN-H₂O (84:16 v/v), y por tanto, sólo ésta fue estudiada para la determinación de las recuperaciones de las distintas micotoxinas. Los valores de recuperación y RSD obtenidos se muestran en la Tabla 53 aplicando la curva de calibrado más adecuada.

Tabla 53. Recuperación y RSD de harina contaminada con 0.15 y 0.30 mg de cada micotoxina/Kg extraída con AcN-H₂O (84:16 v/v) y determinadas por LC-MS de triple cuadrupolo.

Micotoxina	Contaminación (mg/Kg)	Recuperación (%)	RSD (%)
DON	0.15.	114.7	15
	0.30	86.3	8.6
OTA	0.15.	104.2	7.5
	0.30	98.4	4.2

n=3

Los resultados fueron bastante satisfactorios con una recuperación próxima al 100% para la OTA a los dos niveles de OTA añadida en la harina (0.15 mg OTA/kg y 0.30 mg OTA/kg) y un poco más imprecisa para el DON, que fueron de 115% y 86% en la harina contaminada con 0.15 mg DON/kg y 0.30 mg DON/kg respectivamente, debido a que los valores de contaminación añadida en el DON están próximos al límite de cuantificación y por tanto, el error que se comete es más importante. Por todo ello, el estudio utilizando la cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a la espectrometría de masas de triple cuadrupolo no sólo estaría encaminada a la identificación de las micotoxinas presentes en la harina de trigo dada su alta selectividad, sino también a la cuantificación de las mismas. La Figura 60 muestra los cromatogramas obtenidos por espectrometría de masas de triple cuadrupolo con ionización ESI en modo MRM de DON y OTA para una muestra de harina de trigo contaminada con 0.15 mg de cada una de las micotoxinas/Kg, utilizando como disolución de extracción AcN-H₂O (84:16 v/v).

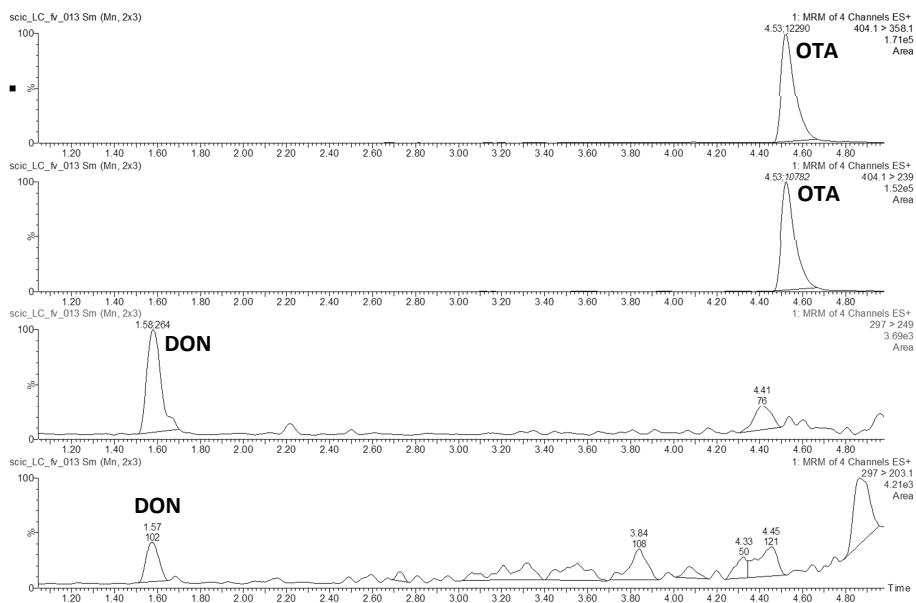


Figura 60. Cromatogramas obtenidos mediante LC-ESI-MS/MS en modo MRM de una muestra de harina de trigo contaminada con DON y OTA (0.15 mg/Kg). Extracción con AcN-H₂O (84:16).

V SUMMARY

1. Introduction

From the beginning of time people have been exposed to all sorts of risk. The diet also involves risks and a series of measures must be taken to reduce these risks. One of the hazards are the mycotoxins. Mycotoxins are secondary metabolites of fungi that have acute and chronic effects on animals and humans. These effects on health are known as mycotoxicoses, whose gravity depends on the toxicity of the mycotoxin, the degree of exposure (mainly by being administered orally, but also cutaneously or through the respiratory tract), the age and nutritional state of the individual and possible synergy effects of other chemical agents. Mycotoxicoses can appear as acute or chronic disease, causing rapid death to the formation of a tumor; but in addition more diseases can be produced, when mycotoxins interfere in the processes of the immunological system, returning to the most susceptible patients to the infectious diseases.

Prevention is a way to avoid mycotoxicoses, and requires a control of people's daily food intake. In order to detect the mycotoxins, appropriate analytical methods must be used to determine the content of these secondary metabolites in samples, even at low levels, to be able to establish regulations with maximum safe values for the consumer.

1.1 Fungi

Complex communities of fungal pathogens are involved in foot rot and head blight diseases of small grain cereals and grasses as well as ear and stalk rot of corn. In temperate regions *Fusarium* species are the most abundant and aggressive plant pathogens (Edel *et al.* 1995, Nelson *et al.* 1981), while species from the genus *Penicillium* are probably the most commonly occurring fungi on agricultural products under storage conditions. In warm humid climates, numerous agricultural products are prone to invasion by *Aspergillus* and, to a lesser extent, by *Penicillium* species (Chandelier *et al.* 2004). These fungi occur on a variety of host plants, such as pine, cereal, fruits or and sugarcane (Jiménez *et al.* 1993, Mateo *et al.* 2004, Mirete *et al.* 2003). Devastating epidemics that occurred in Europe, USA, China, and South America resulted in yield and economic losses due to reduced yields and the negative impact on the quality of grain crops were caused by fungal species (Charmley *et al.* 1994, McMullen *et al.* 1997, Storer *et al.* 1998).

Spain is a Mediterranean country with a warm climate suitable for fungal infection of cereal seed and fruit both before and after harvest. The species of fungi occurring in cereal and fruit, and their enumeration are affected by conditions such as climate, location, time of harvest, and characteristics of the variety (Haikara *et al.* 1977).

Certain fungal species in plants can produce mycotoxins under suitable conditions. These mycotoxins may pose a health hazard as they can contaminate manufactured products such as beer, bread or fruit juice, thereby entering the human food chain. This is due to their occurrence in a wide range of agricultural commodities and the high stability of these mycotoxins during storage and processing (IPCS 1990, Widenstrand and Pettersson 2001). The most important toxigenic fungi in stored or processed plant products are species of *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus* (Mateo *et al.* 2004).

Toxigenic *Alternaria* strains can produce alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME). These mycotoxins have been found in barley (Gruber-Schley and Thalmann 1988). Aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁) and aflatoxin G₂ (AFG₂) are produced by toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. They have been found in a wide variety of plant products (nuts and grains) (Nakajima *et al.* 1999, Scott 1996a, Scott and Lawrence 1997). However, some mycotoxins produced by *Fusarium* spp. such as zearalenone (ZEA), fumonisin B₁ (FB₁) and fumonisin B₂ (FB₂), and type-B trichothecenes: deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol (3- and 15-ADON) have been detected in some products (Molto *et al.* 2000, Scott *et al.* 1993a, Shim *et al.* 1997, Taschan *et al.* 2000, Torres *et al.* 1998). Ochratoxin A (OTA) can be produced by toxigenic strains of *Aspergillus* spp. (Abarca *et al.* 2001, Bayman *et al.* 2002, Hesseltine *et al.* 1972, Varga *et al.* 1996), *Penicillium verrucosum* (Pitt 1987) and *P. nordicum* (Larsen *et al.* 2001). Patulin is a mycotoxin produced by certain *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Byssochlamys* spp., principally by *Penicillium expansum* on fruit (Gökmen and Acar 1998, Leggott and Shephard 2001, Wu 1992).

It is important to understand the factors that lead to the common occurrence of these mycotoxins. This understanding can allow to determine management strategies aimed at minimizing mycotoxin impact and occurrence in food products. Some reports have investigated the effects of temperature and water activity (a_w) on mycotoxin formation. Few of them have assayed other factors such as fungal strain (Greenhalgh *et al.* 1983, Homdork *et al.* 2000). Several authors have indicated a relationship between the natural distribution of toxigenic isolates and their geographical origins or their hosts (Bakan *et al.* 2001, Sydenham *et al.* 1991). The usefulness of statistically designed experiments in the study of fungal growth and mycotoxin production has been well demonstrated and they have been used as tools to enable workers to make intelligible interpretations of laboratory observations (Gqaleni *et al.* 1997). Also, predictive microbiology appears as an emerging field with broad applications to the food industry and health. Concerning microbiology, predictive models have been mainly applied to microorganism growth models (García-Gimeno *et al.* 2002a, 2002b, 2005, Lou and Nakai 2001a) but also to predict thermal inactivation of bacteria (Davey *et al.* 1978, Lou and Nakai 2001b). The most widely used model is response surface methodology (RSM). Much effort has been directed towards developing models to describe the combined effects of environmental factors on the

growth of pathogenic microorganisms in foods. There are, however, only a few reports on developing models to describe the role of these factors on the production of fungal metabolites such as mycotoxins (Hope *et al.* 2005).

Dietary exposure to mycotoxins varies considerably depending on different factors including food processing systems. These systems frequently are traditional and characteristic in different geographic regions and until now have been very little studied. An effective treatment for eliminating these mycotoxins from products is essential to minimize exposing humans to the toxins. The results from the literature suggest that during food processing (cleaning, milling, baking) fractionation or reduction occurs (Abbas *et al.* 1985, Charmley and Prelusky 1994, Schollenberger *et al.* 2005). Some physical and chemical methods have been used to reduce mycotoxin contamination of foodstuffs and feedstuffs, such as segregation of contaminated from non-contaminated kernels in water and saturated sodium chloride, milling, cleaning or washing, sieving and dehulling (Scott 1991, Trenholm *et al.* 1991).

1.2 Type-B trichothecenes

Fungal growth and ability to produce mycotoxins is greatly influenced by the complex interaction of several environmental factors, mainly temperature and moisture (Homdork *et al.* 2000, Tanaka *et al.* 1988). *Fusarium* toxin production occurs in the field and can continue in storage. Improper storage accompanied by too high temperature and elevated moisture content in the grain favours further mycotoxin production and leads to reduction in grain quality (Birzele *et al.* 2000, Schwabe and Krämer 1995). *Fusarium* is the genus that mainly produces trichothecenes.

More than 180 trichothecenes had been isolated and characterized (Grove 1988, 2000). Trichothecenes are sesquiterpene epoxides. All share a tricyclic nucleus named trichothecene and contain an epoxide function at C-12 and C-13, which is essential for their toxicity (Gledhill *et al.* 1991). Their chemical structures vary in both the position and number of hydroxyl groups, as well as in the number, position, and complexity of esterifications (Desjardins *et al.* 1993). They are divided into four categories or types (A, B, C and D). The predominant types A and B trichothecenes are widely distributed in cereals and feed as natural pollutants, whereas types C and D trichothecenes occur rarely in food and feed (Krska *et al.* 2001).

Type-B trichothecenes are the most important trichothecenes. They have a carbonyl group at C-8. Nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON) and their esters 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) are representative of this group (Ueno 1987b).

Fusarium graminearum, *Fusarium equiseti* and *Fusarium culmorum* are the most important type-B trichothecenes producing moulds (Olsson *et al.* 2002, Sweeney *et al.* 1998(1,2), Birzele *et al.* 2000, Homdork *et al.* 2000). Two chemotypes of *F. graminearum* are known. They are type I or DON

chemotype able to form DON with its acetylated derivatives and type II or NIV chemotype with NIV as the most important product (Perkowski *et al.* 1997, Sydenham *et al.* 1991).

Type-B tricothecenes present various toxicological characteristics, such as skin irritability, hemorrhagic syndrome, bone marrow, depression, diarrhoea, nausea, feed refusal and vomiting (Sydenham *et al.* 1991). They can inhibit protein synthesis, alter brain neurochemicals and may be immunosuppressive (Cahill *et al.* 1999). Also animals exposed to tricothecenes exhibit leukocytosis and vomiting several hours after administration, with marked congestion and hemorrhage in the intestine a day thereafter and leukopenia after repeated exposure (Ryu *et al.* 1987, Sato *et al.* 1978). Consequently, they have been associated with chronic or acute mycotoxicoses in livestock and, to a lesser extent, in humans (IARC 1993).

Tricothecenes including DON and NIV can be found naturally on cereals worldwide (Dalcero *et al.* 1997, Erikson and Alexander 1998, Müller *et al.* 1997, Ryu *et al.* 1996, Tanaka *et al.* 1988, Trenholm *et al.* 1981, Trigo-Stockli *et al.* 1998, Yoshizawa and Jin 1995). The occurrence of NIV in cereals is generally lower than for DON and may vary from year to year. Increased levels of DON in cereal grains are often observed in harvest years with frequent rainfall and high humidity during the flowering period. Timing, rather than the amount of rain, is the most critical factor (Miller 1994).

The foodstuff from cereals in Spain and the other European Union countries are constituted fundamentally by wheat flour. These by-products comprise of the daily fooding with important levels of consumption and that they can surpass in average to any other food (WHO 1998). Also there are to consider the food processing systems to decrease the toxin in the by-products, for example. Tanaka *et al.* (1986) reported that 60% of DON in naturally contaminated wheat remained after the wheat flour milling process and no appreciable loss of toxins occurred as a result of baking process.

Analysis for tricothecenes is a complicated work if specific detection of low levels of the toxins is needed. Sensitivity and accuracy of these methods depend on the ability to isolate toxins selectively from interfering matrix compounds present in natural samples prior to detection. Clean-up procedures are usually used for toxin isolation. They include solid-phase extraction (SPE) with various mixtures of solid phases like charcoal-alumina-Celite 545 (Cunniff 1998, Langseth, and Clasen 1992, Mossora *et al.* 1996), cation exchange resin (Lauren and Greenhalgh 1987), alumina-charcoal (Croteau *et al.* 1994, Hsueh *et al.* 1999), C18 (Prom *et al.* 1999), MycoSep 225 column (Keblys *et al.* 2000, Langseth *et al.* 1999, Schothorse and Jekel 2001) and Florisil (Black *et al.* 1987, Mateo *et al.* 2001, Möller and Gustavsson 1992, Onji *et al.* 1998). Supercritical fluid extraction, gel permeation chromatography and immunoaffinity columns have also been used (Cahill *et al.* 1999, Kotal and Radová 2002, Krska 1998, Radová *et al.* 1998).

Current reported separation or detection methods for analysis of type-B trichothecenes include enzyme-linked immunosorbent assay (Sinha *et al.* 1995), radioimmunoassay (Park *et al.* 1996), fluorescent minicolumn (Gordon and Gordon 1990), thin-layer chromatography (Schaafsma *et al.* 1998), liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC).

Several authors described various LC analytical methods including direct analysis using ultraviolet detection (Maragos and Plattner 2002, Walter and Meier 1998), fluorescence detection after derivatization with coumarin-3-carbonyl chloride (Jiménez *et al.* 2000) and post-column derivatization with sodium hydroxide, ammonium acetate and methyl acetoacetate (Sano *et al.* 1987). GC has been the most widely used technique for trichothecene analysis, but it requires derivatization of free hydroxyl groups (Langseth and Rundberget 1998), although methods avoiding derivatization have been published (D'Agostino *et al.* 1986). Two groups of derivatives have been applied, the trimethylsilyl ethers and the perfluoroacyl esters. Fluorinated derivatives can be formed by reaction with pentafluoropropionyl imidazole and heptafluorobutyl imidazole, trifluoroacetic anhydride, pentafluoropropionic anhydride (PFPA) or heptafluorobutyric anhydride (HFBA) (Langseth and Rundberget 1998, Nielsen and Thrane 2001). Fluorinated derivatives can be detected selectively at very low levels using negative ion chemical ionization-mass spectrometry or electron-capture detection (ECD) but also positive electron impact ionization or positive chemical ionization have been used (Gravesen *et al.* 1999, Hewetson and Mirocha 1987, Tanaka *et al.* 2000).

1.3 Ochratoxins

Ochratoxin A (OTA) is the most prevalent among ochratoxins (van Der Merwe *et al.* 1965). It is a widely distributed mycotoxin that is produced by some species of the genus *Aspergillus*, such as *A. ochraceus*, *A. niger*, and *A. carbonarius*, *Penicillium verrucosum* or the genera *Petromyces* and *Neopetromyces* (Abarca *et al.* 1994, Frisvad and Samson 2000, Scott 1997). Its occurrence has been reported in cereals (Damoglou *et al.* 1984, Rizzo *et al.* 2002, Wood *et al.* 1996), coffee (Studer-Rohr *et al.* 1995), grape must and wine (Burdaspal and Legarda 1999, Zimmerli and Dick 1996), beer (Nakajima *et al.* 1999, Visconti *et al.* 2000) and human blood serum after intake of contaminated food (Creppy *et al.* 1995, Radic *et al.* 1997). Ochratoxin B (OTB), another secondary metabolite of the ochratoxin group, is also an undesirable compound produced by these fungi (Moss 1996b).

This mycotoxin has been shown to be nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and immunotoxic to animals, and its carcinogenicity in rats and mice is well established (Castegnaro *et al.* 1998, Pfohl-Leszkowicz *et al.* 1998). OTA has been related to Balkan Endemic Nephropathy (BEN, an endemic fatal disease in south-eastern Europe) and the development of urinary tract tumours in humans (Radic *et al.* 1997). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified this toxin as a possible carcinogen to humans (group 2B) (IARC 1993). OTA is a human

nephrotoxic and causes carcinogenic effects in kidney (Kuiper–Goodman and Scott 1989). The half–life of OTA in human blood serum may reach about 35 days (Studer–Rohr *et al.* 1995).

Although the possible foods that can contain OTA are very diverse, the highest levels of incidence have been generally found in cereals and by–products from cereals (Garaleviciene *et al.* 2002, Jorgensen *et al.* 2002, MacDonald *et al.* 2004, Palermo *et al.* 2002, Scudamore *et al.* 1999a, Trucksess *et al.* 1999, Wolff *et al.* 2000). Estimations at European level have allowed to determine that ingestion of OTA through cereal consumption can amount to up to 54% of the total intake of the toxin in the diet (JECFA 1995).

There is a risk of OTA formation in cereals because grain is often harvested at high moisture contents, sometimes above 20%. Although drying is often necessary to prevent the development of storage moulds such as *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus* section *Nigri* (Frisvad and Lund 1993, Valero *et al.* 2006), it is sometimes not carried out quickly enough or the cereals are not dried sufficiently for safe, long–term storage.

Few studies have been carried out on OTA reduction during bakery processing (El–Banna and Scott 1984, Osborne *et al.* 1996, Scudamore *et al.* 2003). It is reported that temperatures above 250°C are required for several minutes to reduce OTA concentration (Boudra *et al.* 1995), but under certain conditions of high temperatures and acid or alkaline conditions or in the presence of enzymes breakdown can occur (Baxter 1996, Scott 1996b, Scudamore 1996, Subirade 1996).

Therefore, it is necessary to have analytical methods for analysing OTA at very low levels in these matrices. Due to the low concentration levels of OTA usually found and the complexity of the sample, sensitive and selective techniques should be applied.

Immunoaffinity column (IAC) is perhaps the most common clean–up procedure used for OTA analysis due to its specificity. It can be considered the state–of–the art clean–up procedure. In the case of beverages, the sample can be loaded on this type of column directly (Jorgensen 1998), or after previous processes such as addition of NaHCO₃ and NaCl to degassed samples (Burdaspal and Legarda 1998c) or dilution with polyethylene glycol 8000–NaHCO₃ solution to eliminate interference materials. With regard to OTA analysis, other clean–up procedures such as liquid–liquid extraction and classic solid–phase extraction (SPE) cartridges can be used and have been compared recently (Sáez *et al.* 2004).

The most widely used technique for OTA analysis is liquid chromatography with fluorescence detection (LC–FLD) (Visconti *et al.* 2001). Alternative detectors, such as photodiode array (LC–DAD) (FAO 1996, Soleas *et al.* 2001), or mass spectrometer (LC–MS/MS) (Lindenmeier *et al.* 2004, Shephard *et al.* 2003) have also been used. Other techniques for this analysis are TLC, GC–MS of the trimethylsilyl derivative (FAO 1996),

capillary electrophoresis with laser induced fluorescence (Tangny *et al.* 2002) and enzyme immunoassay (EIA) (Barna–Vetró *et al.* 1996).

With regard to LC separation, most authors use reversed–phase columns. Reported mobile phases used for separation are acetonitrile–water–acetic acid (99:99:2, v/v/v) (Visconti *et al.* 2001), acetonitrile–water–acetic acid (50:49:1, v/v/v) (Jorgensen 1998), acetonitrile–0.2M phosphate buffer, pH 8.5–water containing 3mM acetyltrimethylammonium bromide (60:3:37, v/v/v) (Nakajima *et al.* 1999), 48% acetonitrile–52% 4mM sodium acetate–acetic acid (19:1, v/v) (Filali *et al.* 2001), or methanol–9% aqueous acetic acid mixed in gradient mode (Burdaspal and Legarda 1998c). Post–column addition of ammonia to acidic mobile phase has been shown to increase fluorescence yield, thus contributing to increase sensitivity (Burdaspal and Legarda 1998c, Jorgensen 1998, Zimmerli and Dick 1995). The most critical step for accurate and reproducible results is obtaining clean extracts free from matrix interferences.

1.4 Patulin

Patulin is a polyketide lactone produced by certain *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Byssoschlamys* species, principally by *Penicillium expansum* on fruit such as apples and apple products (Gökmen and Acar 1998, Leggott and Shephard 2001, Wu 1992). It has also been determined in oranges, peaches, apricots and tomatoes and their products (Gökmen *et al.* 2005, Majerus and Kapp 2002). It is considered immunotoxic, genotoxic, embryotoxic, and neurotoxic (Moake *et al.* 2005), but no adequate evidence exists for carcinogenicity in experimental animals. Recent studies have demonstrated that micromolar concentrations of PAT were found to induce a rapid and dramatic decrease of transepithelial resistance of human epithelial intestinal cell lines without major signs of toxicity as assessed by the LDH release assay (Mahfoud *et al.* 2002).

The carry-over of PAT during factory processing into industrial apple juice concentrates and subsequently into commercial apple juices as well as in a variety of apple products is a cause of food safety concern (Shephard and Leggott 2000).

Many methods have been developed for measuring patulin in apple juice concentrate, (Gökmen and Acar 1996, 1999; Sewram *et al.* 2000, Shephard and Leggott 2000, Song *et al.* 1999, Wang and Yang 2003, Zhou 2001). These include methods based on thin–layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC) and high–performance liquid chromatography (HPLC) (Boonzaaijer *et al.* 2005, Trucksess and Tang 1999). Among them, HPLC coupled with UV detector, is particularly well suited to the determination of patulin. Also, GC-MS and HPLC-MS are used (Ito *et al.* 2004, Marks 2007, Rupp and Turnipseed 2000, Sulyok *et al.* 2006).

In the procedure, there are no commercial enzyme–linked immunosorbent assay kits available for testing PAT. Conventional methods like multistep liquid–liquid extraction with ethyl acetate, the most usual extraction solvent, and purification by sodium carbonate solution have been widely

used in sample pretreatment (Boonzaaijer *et al.* 2005, Brause *et al.* 1996, Shephard and Leggott 2000). New methods of extraction and cleanup using solid phase extraction cartridges have been validated and published (Brause *et al.* 1996, Boonzaaijer *et al.* 2005, Eisele and Gibson 2003, Li *et al.* 2007, Trucksess and Tang 1999, 2001).

However, more suitable analytical methods with high accuracy, low detection limits and simple procedures are needed for application in quality control of goods throughout the production chain.

1.5 Legislation

In the last few years different international committees have considered the issue of risk assessment and tolerable daily intake of OTA and trichothecenes (Eriksen and Alexander 1998, Scientific Committee on Food 1999, 2000, FAO/WHO 2001a). In Europe, the Scientific Committee on Food (1999, 2002) and confirmed by the recent SCOOP task (Gareis *et al.* 2003) have concluded that an exposure of consumers close to the Tolerable Daily Intake (TDI) of 1 and 0.7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ body weight/day for DON and NIV respectively, are possible. However, in the case of OTA, the FAO/WHO (2001a) retained the previously established Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) of 100 ng/Kg body weight per week to the delay of new studies that the European Commission updated. It established, considering that new scientific information, a tolerable weekly intake (TWI) of 120 ng/Kg b.w. for OTA. In the case of patulin, a provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) of 400 ng/Kg body weight was established by the JECFA and recently endorsed by the Scientific Committee for Food (SCF) (SCF 2000, Wouters and Speijers 1996).

Also, The European Commission (EC) has recently introduced maximum permissible limits for OTA and DON in some grain products to reduce the risk to the consumer. These limits are 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ and 750 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ in cereals intended for direct human consumption, respectively (Commission Regulation No 1881/2006).

PAT is considered a marker of the quality of apples entering the processing factory, and levels in the final product are subject to legislative regulatory control. The maximum permitted levels of PAT in fruity foodstuffs in Europe is 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for apple fruit juice and apple juice ingredients in other beverages; 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for solid apple products such as apple puree (Commission Regulation No 1881/2006).

The new Regulation introduced a separate limit for baby food for OTA, DON, PAT and other mycotoxins in order to protect infants and young children who have higher fruity and cereal foodstuffs consumption compared to adults (Commission Regulation No 1881/2006, Piamontese *et al.* 2005).

2. Aims

The following proposed general aims for the present Doctoral Thesis are established:

1. Mycobiota study in wheat and apple.
 - 1.1 Mycobiota study of wheat coming from the Spanish market with special attention to the potentially producing species of ochratoxin A (OTA), nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), and acetylated derivatives, 3-acetyldeoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol (3-ADON and 15-ADON).
 - 1.2 Mycobiota study of apple especially by *Penicillium expansum*, the main PAT producing species.
2. Critical study and optimization of chromatographic methods for ochratoxin, type-B trichothecene and patulin determination *in vitro* culture media of the main producing fungal species.
3. Chemotyping of isolates belonging to species that are potential producers of ochratoxins, type-B trichothecenes and patulin in wheat and apple.
4. Study of the influence of physicochemical factors on mycelial growth of the fungi and mycotoxin production.
5. Design and application of response surface models to predict deoxynivalenol accumulation by *Fusarium graminearum* and ochratoxin A accumulation by *Aspergillus ochraceus* in wheat in different conditions.
6. Optimization of the methodology for determining of ochratoxin A and type-B trichothecenes in wheat and wheat products, and of patulin in apple and apple products. Analysis of foodstuffs in Spain.
7. Stability study of OTA and type-B trichothecenes for baking process.
8. Critical study of mycotoxin multi-detection methods by LC-MS in wheat flour.
 - 8.1 Preparation and optimization of an analytical method to determine the maximum number of mycotoxins present in wheat flour. Extraction and clean-up processes should be minimized, and then mycotoxins are determined by LC-MS.

3. Results and discussion

3.1 *Mycobiota study in wheat and apple*

3.1.1 *Related mycobiota in wheat grains*

Mycobiota analysis of wheat samples indicates a relatively high incidence of the *Fusarium* genus. Due to its importance in the potential production of type-B trichothecenes, it is necessary to indicate that *F. graminearum* was found in 39% of the analyzed samples and *F. culmorum* was found in 18% of the samples.

The origin of OTA is mainly due to the presence of species of the genus *Aspergillus* (Belli *et al.* 2004b). The presence of *A. sect. Circumdati* species in 27% of contaminated samples and the presence of different species from the *Nigri* section in 15% of contaminated samples such as *A. carbonarius* are important due to their potential capacity to produce these ochratoxins.

In this study, differences in mycobiota were found according to the geographic origin of samples. The distribution of different *Aspergillus* species varied with origin, with the Basque Country and Castilla La Mancha showing the highest levels of infected grains with 33.8 and 20.5% respectively. *Fusarium* spp. showed an irregular distribution depending on sample origin. The humidity in each region may have had a significant effect on grain colonization by *Fusarium* spp. Thus, species of this genus were detected in about of 74% of samples from the Basque Country. However, global occurrence of *Fusarium* spp. was lower (13.9%).

3.1.2 *Related mycobiota in apple*

Alternaria was the genus with the highest incidence in 61.5% of contaminated samples, followed by *Penicillium* genus in 54% of contaminated samples. In this last genus, *P. expansum* was significant because of its potential capacity to produce PAT and was isolated in 42.5% of contaminated samples. Finally, a low occurrence of *Aspergillus* and *Mucor/Rhizopus* with 7 and 5% respectively, were found in apple.

3.2 *Critical study and optimization of chromatographic methods for ochratoxin, type-B trichothecene and patulin determination in vitro culture media of the main producing fungal species*

In the case of wheat grain culture medium, the LOD for OTA was 0.011 ng/g, while LODs for NIV, DON, 3-ADON and 15-ADON were 0.018, 0.007, 0.012 and 0.011 mg/Kg, respectively. Recovery in OTA-contaminated wheat grain (1 µg/Kg) was 72.4% and recoveries for mycotoxins of NIV, DON, 3-ADON and 15-ADON were 88.2%, 76.6%, 78.2%, 69.8%, respectively in wheat grain contaminated with 1.0 mg/Kg for each mycotoxin.

LODs for DON, NIV, 3-ADON in maize culture medium were 8 ng/g, 15 ng/g and 11 ng/g, respectively. Recoveries of DON, NIV and 3-DON were 84.9%, 63.9%, 71.6% respectively in maize contaminated with 2.5 µg/g for each mycotoxin.

Recovery value in ZUA culture medium was 89% for the determination of OTA at a concentration of 1.0 µg/g, and with a LOD less than 0.01 µg OTA/g of medium.

Nevertheless, LODs of OTA and OTB were 0.012 ng/ml and 0.026 ng/ml respectively, for YES culture medium with 5% of bee pollen and recoveries were 89.4 and 82.6%, respectively, with 0.1 ng of each mycotoxin/ml in the contaminated medium.

LOD was 2.5 ng/ml in YES culture medium for PAT, and the recovery for contaminated YES culture with 55 µg mycotoxin/l was 60.1%. On the other hand, recovery values in PDA and ADA media were 69% y 65%, respectively in the culture media contaminated with 5 mg PAT/Kg and LODs were 2.5 ng de PAT/g for both cases.

3.3 Evaluation of the potentially producing species of ochratoxins, type-B trichothecenes and patulin

3.3.1 Ochratoxins in YES medium supplemented with bee pollen

Thirty two out of 45 isolates in the *Aspergillus* section *Nigri* were OTA producers. Twenty seven producing isolates were classified as *A. carbonarius* and five belonged to the *Aspergillus niger* aggregate. The respective OTA production ranges were 0.061–0.606 ng/ml (average 0.214 ng/ml) and 0.037–0.193 ng/ml (average 0.095 ng/ml). The average level found in cultures of the 32 OTA-producing isolates was 0.176 ng/ml. OTB was found in the culture of only one isolate of *A. carbonarius* where its level was even higher (0.845 ng/ml) than the OTA level (0.326 ng/ml) in the same culture. Four out of 20 isolates of *A. sect. Circumdati* were OTA producers and the average level for this toxin in the cultures was 132 ng/ml (range of positive samples: 2.75–454 ng/ml). Two isolates were able to produce OTB and the levels for this toxin were 0.52 and 44.6 ng/ml).

If one considers the wide occurrence of these fungi in grain their contribution to the presence of these mycotoxins in cereal products could be significant. However, OTB was detected only in one isolate that combined with its low toxicity is unlikely to be a significant toxin (Moss 1996b).

3.3.2 Type-B trichothecenes in grains of maize

Fourty isolates of *F. graminearum* were assayed for production of type-B trichothecenes. NIV was detected in 12.5% of *F. graminearum* cultures at an average level of 55 ng/g, whereas DON was found in 82.5% of cultures

at an average level of 436 ng/g. The average level found for the sum of 3- and 15-ADON was 381 ng/g.

3.3.3 Patulin in YES medium

The presence of PAT was observed in 93% of inoculated *P. expansum* strains in YES medium. Average value was 12854 ng/ml and the range of 104 to 89396 ng/ml. These values are quite high, but similar to those reported by other authors (Andersen *et al.* 2004).

3.4 Study of the influence of the physicochemical factors on the mycelial growth and mycotoxin production

3.4.1 Growth of *Aspergillus carbonarius* and OTA production

3.4.1.1 Lag phase

The lag-times observed differed according to conditions. The effect of a_w , temperature and concentration of carbendazim can be seen on the time elapsed between inoculation and the time when fungal growth became evident. ANOVA revealed that the three factors assayed and a_w -carbendazim concentration and a_w -temperature interactions had significant effects on lag phase duration (p -values < 0.05). Using Tukey-HSD multiple range test at 95% confidence level used to a_w level provided two different clusters (0.98 and 0.94-0.96). Mould lag phase was only one day at the highest a_w -value. According to the Tukey-HSD treatment, the lag phases obtained at 20°C were included in one group whereas those obtained at 25-28°C were included in another homogeneous group. Thus, the lowest temperature assayed produced a significant increase in lag phase with respect to 25-28°C. The concentration of carbendazim split the cases into two homogeneous but overlapping groups, one formed by 0 (control), 50, 150, 250, and 350 ng/ml and the other by 250, 350 and 450 ng/ml. The highest level (450 ng/ml) produced a significant increase in fungal lag phase compared with blanks or 50 ng/ml. The carbendazim level influenced the duration of this phase, which was 1-3 days for blanks and 1-7 days for 450 ng/ml cultures.

Therefore, the three studied factors influenced lag phase duration, which was reduced by high water availability and relatively high temperatures (near 28°C) while carbendazim levels in the interval 50-250 ng/ml did not show significant effects. The highest lag-times were observed at 0.94 a_w , 20°C, and with 450 ng carbendazim/ml. The fungicide effect, however, is not strong at the assayed level.

3.4.1.2 Growth rate

Multifactor ANOVA shows that the three factors had significant effects on fungal growth rate and that there was a significant interaction between a_w and temperature (p -values < 0.05).

The Tukey–HSD multiple range test ($P=95\%$) led to three homogeneous non–overlapping groups with respect to temperature. Thus, the higher the temperature tested (within 20–28°C), the higher the observed growth rate. The Tukey–HSD test displayed two homogeneous groups with regard to a_w ; one of them was formed by the two highest values and the other by 0.94 a_w . The latter value produced a significant decrease in the growth rate of *A. carbonarius*. The same test applied to the carbendazim level in the medium gave rise to two homogeneous groups although there was a considerable degree of overlapping between them (0, 50, 250 and 350 ng/ml) and (0, 250, 350 and 450 ng/ml). Except between 50 and 450 ng/ml, there were no significant differences among the carbendazim levels on growth rate.

It can be seen that the growth rate of *A. carbonarius* in these cultures is favored by high water availability and relatively high temperatures. However, addition of carbendazim at the levels assayed had no significant influence on fungal growth rate.

3.4.1.3 OTA accumulation

Accumulation of OTA was studied as a function of four factors (a_w , carbendazim concentration, temperature and time). ANOVA showed that all factors had significant effects on OTA accumulation (p -values < 0.05). There were also two significant interactions (a_w –temperature and temperature–days).

The Tukey–HSD test produced several groupings. The a_w level led to three homogeneous non–overlapping groups. The highest levels of OTA were found at 0.98 a_w and decreased when a_w decreased. Thus, the amount of available water positively influences the accumulation (and production) of OTA. With regard to time, three homogeneous non–overlapping groups (days 3, 7 and 15) were noticeable. OTA accumulates in the medium with time continuously until day 15. With respect to temperature two homogeneous groups appeared; one of them formed by 25 and 28°C, and another by 20°C, which was more favorable for OTA production. A double grouping was also detected by the Tukey–HSD test with regard to carbendazim level. The two groups overlapped as in the case of fungal growth rate. One group corresponded to cultures that contained 0–350 ng carbendazim/ml and the other to cultures where carbendazim concentrations were 250–450 ng/ml. The concentration of this fungicide positively influenced OTA accumulation so that the higher the carbendazim level, the higher the OTA accumulation in the medium.

Thus, carbendazim effects at the assayed levels (50–450 ng/ml) can be summarized as follows: it does not increase the lag phase of our strain of *A. carbonarius* except at relatively low a_w and temperatures, although the longest delay was only 4 days with respect to control. Carbendazim does not substantially decrease fungal growth rate once growth is apparent but it appears to increase OTA accumulation in the medium. Therefore, carbendazim cannot be considered a good fungicide because it causes the

predominance of *A. carbonarius* on other less ochratoxigenic species and can increase OTA production. On the other hand, growth is favored by high a_w (0.98) and temperatures, while OTA production is increased at mild temperatures (approximately 20°C) and 0.96–0.98 a_w .

3.4.2 Growth of *Penicillium expansum* and PAT production

3.4.2.1 Lag phase

It was observed that when the concentration of fungicide increases, growth of *P. expansum* diminishes, until the fungus stopped growing. When the temperature was lower, the strain started to grow later. It was also observed that in PDA medium the strain stopped growing with 40 µg/Kg of imazalil sulphate, whereas in ADA medium, it could grow to 500 µg/Kg of fungicide.

In PDA medium, ANOVA indicated that fungicide concentration and temperature were significant factors, while a_w was not significant (p -value > 0.05). The Tukey–HSD test to a_w showed an upward trend of lag time when a_w was lower. In the case of imazalil concentration, Tukey–HSD test showed two different groups, the first was formed by control and 10 µg/g, and another by the other assayed concentrations where growth was not observed. Finally, the test indicated that the temperature factor could have two groupings; one formed by 4°C where the lag time was higher and another group of 14 and 24°C.

The results for ADA medium by ANOVA indicated that all the factors were significant. Tukey–HSD was used to analyze the different factors. At 4°C, the lag time was higher than at 14°C and 24°C, while these both last temperatures were grouped together. Tukey–HSD test indicated at control and low concentrations of imazalil sulphate with lag time lower than 255 µg/g and 500 µg/g.

In general, the behavior of isolated lag time in both studied media was different according to assayed conditions of a_w and fungicide concentration, while for temperature it was similar.

3.4.2.2 Growth rate

Comparison of the two media showed no fungal growth when fungicide concentration was 40 µg/Kg or above in PDA medium while in ADA medium fungal growth was observed at 500 µg/Kg.

ANOVA showed the covariable lag time to be statistically significant and the factor of medium did not influence growth rate. When, the covariable lag time was higher the growth rate decreased.

The statistical results for the PDA medium indicated that the covariable lag time and temperature were significant factors in the growth rate. An increase in lag time provoked a diminution in growth rate.

For Imazalil sulphate concentration, it was observed that the control and 10 µg/g had a faster growth rate than the other assayed concentrations using Tukey–HSD test, although they were statistically significant according to ANOVA. For temperature, the growth rate was faster when the temperature was higher. Finally, there were no differences between temperatures according to Tukey–HSD test.

The growth rate depended on the lag time, temperature, imazalil sulphate concentration and a_w in ADA medium. Furthermore, a longer lag time provoked a lower growth rate.

When Tukey–HSD test was used for temperature, it was separated into three independent groups. Temperature provoked a greater growth rate if the temperature was higher. Two groups for a_w were observed using Tukey–HSD test, the first was formed by 0.93 and 0.96, and the other groups by 0.99. In this case, a higher a_w increased the growth rate. Finally, two groups were differentiated for imazalil sulphate concentration, the first formed by the low concentration and control where the growth rate was fast, and the other group was formed by 500 µg/g where the growth rate was lower.

The growth rate of *P. expansum* in these culture media was favored when a_w and temperature were increasing. Also, imazalil sulphate concentration had a significant influence; it provoked a lower growth rate as concentration increased.

3.4.2.3 PAT accumulation

PAT accumulation study was carried out in relation to four independent factors (a_w , fungicide concentration, temperature and time). ANOVA showed that all factors except temperature showed significant effects on PAT accumulation/surface. A decrease in PAT accumulation was observed when the plate was completely occupied by isolated fungus.

In Tukey–HSD test on the PDA medium for a_w , three groups were obtained. The upper PAT levels were obtained to 0.99. An increase of PAT accumulation/surface with time was observed. Two groups could be distinguished according to temperature. The first formed by the temperature at 24°C and the other at 4°C and 14°C. This last group was more favorable to PAT accumulation/colony surface.

Also, two groups of fungicide concentration were observed with the Tukey–HSD test. The first group was formed by the control and 10 µg/g and the other by 40 and 70 µg/g where PAT accumulation was lower as fungicide concentration increased.

When the Tukey–HSD test was applied to the a_w factor in ADA medium two groups were obtained, the first by 0.93 and 0.96 and the other by 0.99 that showed higher PAT accumulation/surface values. Two overlapping groups were observed in fungicide concentration. PAT accumulation/colony surface was observed to decrease as concentration

increased. No different groups were observed for temperature. Finally, an increase in PAT accumulation/colony surface was observed over time.

In this study, maximum PAT accumulation is not limited directly by temperature but indirectly due to growth difficulties at low temperatures.

3.5 Design and application of response surface models to predict deoxynivalenol accumulation by Fusarium graminearum and ochratoxin A accumulation by Aspergillus ochraceus in wheat

3.5.1 Deoxynivalenol accumulation in wheat by Fusarium graminearum inoculation. Predictive models

3.5.1.1 RS–Baranyi Model

The equations provided by the DMFit macro program split the behaviour of the fungus with regard to toxin production in three stages. The initial stage is parallel to the vegetative development of the fungus on the substrate. DON accumulation during this stage is undetectable which means that its level may vary but it is below the LOQ (0.020 µg/g). So the equations for this stage are concentration of DON = 0 for time = 0 to t_I , where time is the second stage. Equation 1 gives the duration of this stage as a linear combination of the three factors studied. The value of t_I is calculated as the commencement time

Commencement time of accumulation is usually between 10 and 32 days at the assayed conditions.

After obtaining the Baranyi equations and the values of t_I , multiple regression was used to fit those values to the equation [Eq. 1].

$$t_I = 10^{[-55.1876 + 60.2822 \times (a_w)^2 - 5.92802 \times a_w \times D - 84.5932 \times a_w \times T + 38.3773 \times (a_w)^2 \times T + 0.261046 \times a_w \times (T)^2 + 5.30403 \times D + 0.0216927 \times D \times T + 45.9347 \times T - 0.253691 \times (T)^2]} \quad \text{[Eq. 1]}$$

Where T is the temperature of experimentation in °C and D the diameter of inoculum disk in cm, t_I is expressed in days.

As result, independently of inoculum diameter and temperature there is a minimum start time for a value of a_w around 0.96, which is delayed (greater t_I) as a_w increases or diminishes and is greater as a_w decreases.

The second stage is associated with a rapid increase in toxin accumulation in the culture.

DON accumulation rate is normally between 0.01 and 0.56 µg/g·day under the assayed conditions. The maximum slope was obtained for (1.1 cm–0.98–20°C), while the minimum was obtained for the combination (1.5 cm–0.96–20°C).

The valid equation for the entire interval of assayed conditions was:

$$\text{Accumulation rate} = [675.171 - 1244.32 \times a_w + 563.84 \times (a_w)^2 + 15.581 \times a_w \times T + 14.096 \times a_w \times D - 0.379281 \times a_w \times (T)^2 - 14.9318 \times T + 0.3625 \times (T)^2 - 14.262 \times D + 0.034 \times D \times T] \quad \text{[Eq. 2]}$$

Accumulation rate is expressed in $\mu\text{g/g}\cdot\text{day}$, while temperature (T) is expressed in $^{\circ}\text{C}$ and inoculum disk diameter (D) in cm.

The accumulation rate tends to the maximum at high a_w (0.98) and moderate temperatures (20–25 $^{\circ}\text{C}$).

The values of t_1 and t_2 can be determined by the accumulation values. t_2 is the limit of the second stage where maximum accumulation is obtained.

For the tested strain, maximum DON accumulation is usually between 0.04 and 9.01 $\mu\text{g/g}$. The maximum accumulation was obtained for tested combination (1.1 cm–0.98–20 $^{\circ}\text{C}$), while the minimum accumulation in phase 3 was obtained for the combination (1.1 cm–0.94–20 $^{\circ}\text{C}$).

In addition, the maximum accumulation equation is independent of inoculum diameter

$$\text{Maximum accumulation} = 10 \wedge [279.349 - 292.221 \times a_w + 60.8216 \times (a_w)^2 \times T - 81.5567 \times a_w \times T - 0.884179 \times a_w \times (T)^2 + 22.2841 \times T + 0.847814 \times (T)^2] \quad \text{[Eq. 3]}$$

Maximum accumulation is expressed in $\mu\text{g/g}$, and temperature (T) is expressed in $^{\circ}\text{C}$.

It is observed that for a_w and low temperatures the maximum accumulation value is very low, but if a_w is increased an increase of value is observed, obtaining a maximum value of 0.98 for a_w and T about 21 $^{\circ}\text{C}$.

Having established the different phases from the equation, the following consideration for calculating DON accumulation is taken into account:

Stage 1 from 0 to t_1 :

$$\text{Mycotoxin accumulation} = 0$$

Stage 2 from t_1 to t_2 (from t_1 to t_1 + maximum accumulation / accumulation rate):

$$\text{Mycotoxin accumulation} = (\text{days} - t_1) \times \text{accumulation rate}$$

Stage 3 from t_2 or above (greater t_1 + maximum accumulation / accumulation rate):

$$\text{Mycotoxin accumulation} = \text{maximum accumulation}$$

Response surfaces for DON accumulation in wheat show low times and no a_w , mycotoxin accumulation. An increase in accumulation value is observed with time, being scarcely observable for low a_w values, whereas for high a_w a substantial increase in DON accumulation is observed. Finally, a constant value of the accumulation value is observed at the end of experience that agrees with phase 3, which assumes that toxin accumulation is constant. In all the cases, the maximum value appears for

a temperature of 20°C and a value of 0.98 for a_w is observed, while the minimum value of maximum accumulation is obtained at a temperature of 15°C.

3.5.1.2 RS-MLR model

Equation 4 is obtained through multiple linear regression of mycotoxin accumulation:

$$\begin{aligned} \text{Mycotoxin accumulation} = & 10^{[-4216.31 + 74.5167 \times t + 1573.22 \times \\ & \times D + 8709.28 \times a_w - 4502.0 \times (a_w)^2 - 0.0008017 \times (t)^2 - 0.006746 \times \\ & \times (T)^2 - 3247.53 \times a_w \times D + 0.280386 \times a_w \times T - 155.415 \times a_w \times t + \\ & + 1675.92 \times (a_w)^2 \times D + 81.0976 \times (a_w)^2 \times t]} \end{aligned} \quad \text{[Eq. 4]}$$

Toxin accumulation is expressed in $\mu\text{g/g}$, while temperature (T) is expressed in °C and inoculum disk diameter (D) in cm.

In the representation of the response surfaces similar reliefs were obtained with the Baranyi method. But in this case, the difference with the previous model was that the accumulation values continue growing over time, while in the Baranyi model a constant value was reached. For this model, the highest values were obtained at 20°C and a_w 0.98 as with the Baranyi method. But in Equation 4, accumulation also depends on inoculum. An increase in inoculum provided an increase in DON accumulation. The smallest DON accumulation was obtained at a temperature of 15°C and inoculum diameter of 0.7 cm for a_w 0.98 and 55 days.

3.5.1.3 Validation of predictive models for the deoxynivalenol accumulation

In this case, same data set calculations and cross validation were developed as validation strategies.

SEP is smaller using the predictive Baranyi model versus the multiple regression model, in the case of same data set validation, SEP was 42.5% and 156.0%, respectively. Therefore, the model that better reflects observed data versus predicted values was the predictive Baranyi model.

In the predictive Baranyi model, SEP values are a little high, 75.6% and 42.5% for cross validation and same data set validation, respectively. Nevertheless, although error is high, they sufficiently reflect behavior of the fungus in mycotoxin accumulation.

3.5.2 Ochratoxin A accumulation in wheat by *Aspergillus ochraceus* inoculation. Predictive models

3.5.2.1 RS-Baranyi model

The DMFit program was applied to find a curve that adjusts to the pair of values time-OTA concentration, for each tested combination of spore suspension concentration, a_w and incubation temperature. During stage 1,

OTA level is below the LOD or is slightly above this value. Therefore it can be assumed that mycotoxin production is not significant (LOQ 0.03 ng/g). During phase 2, the fungus produces OTA quickly. During phase 3, OTA values were assumed stable.

Accumulation start time was between 3 and 24 days for (10000 spores/ml–0.99–25°C) and (1000 spores/ml–0.96–25°C), respectively.

Equation 5 represents stage 1 time:

$$t(i) = 10 \wedge [-86.7673 + 7.0967 \times T + 120.791 \times a_w - 0.0314869 \times C(i) - 23.6636 \times (a_w)^2 - 2.55271 \times 10^{-8} \times (C)^2 - 0.174478 \times (T)^2 + 0.0669964 \times a_w \times C - 8.10067 \times a_w \times T - 0.000004408 \times C \times T - 0.0352204 \times (a_w)^2 \times C + 0.199663 \times a_w \times (T)^2] \quad \text{[Eq. 5]}$$

Where T is the experimentation temperature in °C and C is spore suspension concentration in spores/g. t_i is expressed in days.

It can be indicated that independently of inoculum concentration and a_w , there is a minimum start time for T at 20°C and with delay as T increases or diminishes.

In the second stage, the OTA accumulation rate is usually between 156 and 2860 ng/g under the test conditions. The maximum slope was obtained for (100 spores/ml–0.99–25°C).

Equation 6 represents the accumulation rate values valid for the entire interval of assayed conditions during the second phase.

$$\text{Accumulation rate} = 10 \wedge [135.668 - 0.436298 \times T - 269.148 \times a_w - 0.037467 \times C + 140.037 \times (a_w)^2 + 0.079278 \times a_w \times C - 0.0000076 \times C \times T - 0.04174 \times (a_w)^2 \times C + 0.012644 \times a_w \times (T)^2] \quad \text{[Eq. 6]}$$

The accumulation rate is expressed in ng/g·day, while temperature (T) is expressed in °C and spore suspension concentration (C) in spores/g of wheat.

The accumulation rate tends to the maximum at high a_w and temperatures (0.99 and 25°C) for a concentration of 100 and 1000 spores/g. Nevertheless, the maximum is usually at low temperatures and middle a_w for a 10000 spores/g concentration.

In the third stage, maximum OTA accumulation is usually, for the producing strain of tested OTA, between 2160 and 9800 ng/g during the used conditions. The maximum accumulation was obtained for the combination (10000 spores/ml–0.96–20°C), while the minimum accumulation was obtained for the combination (1000 spores/ml–0.93–20°C).

Equation 7 provides the maximum accumulation:

$$\text{Maximum accumulation} = 10 \wedge [47.7325 - 5.30688 \times T - 45.3582 \times a_w - 0.019056 \times C + 0.137927 \times (T)^2 + 0.0403173 \times a_w \times C + 5.4479 \times a_w \times T - 0.00000286218 \times C \times T - 0.0212243 \times (a_w)^2 \times C - 0.140889 \times a_w \times (T)^2] \quad \text{[Eq. 7]}$$

The maximum accumulation is expressed in ng/g, while temperature (T) is expressed in °C and spore suspension concentration (C) in spores/g of wheat.

Two different behaviors were observed. The first group showed concentrations of 100 and 1000 spores/g showing a maximum OTA accumulation at maximum temperature and a_w , and a minimum accumulation at minimum temperature and a_w . The second group, with a concentration of 10000 spores/g to middle a_w (0.96–0.97) presents a maximum which is practically independent of T, and accumulation value is higher than those obtained in the first group.

Having established the different phases using the equation the following sequence for calculating OTA accumulation is considered:

Stage 1 from 0 to t_1 :

Mycotoxin accumulation = 0

Stage 2 from t_1 to t_2 (from t_1 to t_1 + maximum accumulation / accumulation rate):

Mycotoxin accumulation = (days – t_1) × accumulation rate

Stage 3 from t_2 or above (greater t_1 + maximum accumulation / accumulation rate):

Mycotoxin accumulation = maximum accumulation

The response surfaces present a similar behavior for concentrations of 100 and 1000 spores/g. At the start time, mycotoxin accumulation is minimum and soon after it begins to produce until it becomes stable and maximum at a toxin value. In addition, if a_w is higher, the maximum accumulation also increases. Also, it was observed that as temperature increases so does OTA in the matrix.

Furthermore, at a concentration of 10000 spores/g, the behavior of the response surfaces with time is the same as in the previous cases, however two other behaviors were also observed. First when the temperature is 15°C, it was observed that toxin accumulation increases very little to middle a_w (0.94–0.96), but OTA accumulation increased considerably with high or low a_w . In the second situation, if T is between 20 or 25°C the opposite effect is observed and OTA accumulation increases more to middle a_w .

3.5.2.2 RS-MLR Model

The equation obtained by MLR for the behavior of the fungi in relation to toxin production is indicated in equation 8.

$$\begin{aligned} \text{Mycotoxin accumulation} = & 10 \wedge (1319.68 - 47.553 \times T - 14.5327 \times \\ & \times t + 0.000353061 \times C - 2798.09 \times a_w + 1471.09 \times (a_w)^2 - \\ & - 0.0126189 \times (t)^2 - 0.0220487 \times (T)^2 + 101.777 \times a_w \times T + \\ & + 31.1876 \times a_w \times t + 0.000138449 \times (t)^3 - 0.000364556 \times (a_w)^2 \times \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \times C - 53.3563 \times (a_w)^2 \times T - 15.963 \times (a_w)^2 \times t + 0.000802241 \times \\ & \times (T)^2 \times t - 0.0335093 \times a_w \times T \times t \end{aligned} \quad \text{[Eq. 8]}$$

Toxin accumulation is expressed in ng/g, while temperature (T) is expressed in °C and spore suspension concentration (C) in spores/g wheat.

The response surfaces can be classified into three groups. In the first group, where T is 15°C, maximum OTA accumulation appears at high a_w and times, independent of inoculum. A second group appears when the condition temperature is 20°C, in this case, maximum toxin accumulation is also at high a_w , but time is about 30 days, and later there is a slight reduction. Finally, maximum OTA accumulation is at middle a_w and at the final time of experience and at a temperature of 25°C. The maximum of accumulation is obtained at a_w 0.95, time 40 days, T 25°C and C 10000 spores/g.

It is observed that the graphs have totally different forms according to the result of the comparative of the two models.

3.5.2.3 Validation of predictive models for the ochratoxin A accumulation

Same data set calculations and cross validation were used as validation strategies.

The SEP is smaller using the predictive Baranyi model versus the multiple regression model, for both types of validation. Therefore, the predictive Baranyi model reflects better the observed data versus predicted data. Nevertheless, SEP values are high, 84.3% and 66.3% for the cross validation and same data set validation, respectively; this may indicate that the model does not satisfactorily reflect the process of OTA accumulation. This is because in the process of accumulation produced by a fungus in a substrate, the accumulation does not get to be constant (as assumed in phase 3 of the Baranyi model), but undergoes variations produced by the shortage of other nutrients in the medium, with the consumption of secondary metabolites and varying accumulation.

3.6 Optimization of the methodology for determining ochratoxin A and type-B trichothecenes in wheat and wheat products, and patulin in apple and apple products. Analysis of foodstuffs in Spain

3.6.1 Analysis of type-B trichothecenes in wheat

3.6.1.1 SPE clean-up procedures

The clean-up methods for type-B trichothecenes in wheat that were tested in this work, provided very different recoveries depending on the procedure and the type of SPE cartridge. The best recoveries were obtained with MycoSep 225®, alumina-charcoal-C18 silica (option c) and alumina-charcoal-silica cartridges. Following these protocols, the extract can be transferred directly to the vial for concentration and further derivatization, without any other previous step. Among these three procedures, the

MycoSep 225® column provided good results in terms of recovery for DON, 3- and 15-ADON. In the case of NIV, the best results were obtained with the alumina-charcoal-C18 silica cartridge following option c. MycoSep 225® columns provide about 90% recoveries for DON, and about 75% for NIV, 3-ADON and 15-ADON. The main disadvantage of this column with respect to 'made-in-laboratory' cartridges containing alumina-charcoal-C18 silica or alumina-charcoal-silica is its high cost. When 'made-in-laboratory' cartridges were used, recoveries varied between roughly 73-87% for DON, 102-110% for NIV and 58-70% for 3- and 15-ADON depending on the applied clean-up procedure, and reproducibility was similar to that obtained with MycoSep 225 column.

The SPE procedure that can be chosen for reliability, low cost and shortest analysis time is the cartridge with alumina-charcoal- C₁₈ silica (option c).

3.6.1.2 Derivatization and GC conditions

Optimal derivatization and conditions for compound separations by GC are a fundamental step in the determination of type-B trichothecenes in wheat. The derivatization of NIV, 3-ADON and 15-ADON with HFBA or PFFA provide similar limits of detection, but in the case of DON, the signal obtained with HFBA was found to be superior to the signal obtained with PFFA. HFBA is a more expensive reagent, has less stability against moisture and trichothecene recoveries were not significantly better. Therefore, PFFA was selected as derivatization reagent for further analysis of type-B trichothecenes. Detection of 3- and 15-ADON cannot be done satisfactorily using an HP-5 column, because after derivatization, these compounds have the same retention time. In order to solve this problem, HP-1701 was used for the analysis, which provided different retention times for these compounds. All the analyzed trichothecenes were separated in this column, but the limits of detection for all toxins were greater than those obtained with HP-5 column.

3.6.2 Analysis of ochratoxin A in wheat flour

The application of the studied methods was based on the fast and simplicity of the methods.

For the determination of OTA in wheat flour, the best results were obtained using the immunoaffinity method. The recoveries obtained at a level of contamination spiked with 0.2 µg/Kg for IAC, ionic interchange/RP, SPE silica and liquid-liquid extraction were 74.4%, 27.8% 44.5% and 53.9%, respectively, while RSDs for these procedures were 7.7%, 18.6%, 21.2%, 15.3%, respectively.

These results show the difficulty of determining OTA in some substrates such as wheat flour. Of all the applied methods, recovery values that can be considered acceptable although they continue to be low (ranging from 74.4% to 81.3%) were only obtained in the procedure with ethyl acetate-water extraction and a subsequent application of clean-up by immunoaffinity cartridge.

The lowest limit of detection was obtained with the immunoaffinity method providing a value of 0.015 ng/g, followed by the liquid–liquid extraction method, ionic interchange/RP method and silica method with values of 0.016, 0.018, 0.023 ng/g, respectively.

3.6.3 Occurrence of type-B trichothecenes and ochratoxin A in wheat grain and wheat flour

The presence of NIV in wheat grain and wheat flour samples was 3% and 9% and average values were 0.060 and 0.050 mg/Kg, respectively. 21% and 8% DON was observed and the averages were 0.691 and 0.075 mg/Kg of analyzed samples of grain and flour, respectively. 3- and 15- ADON were not detected.

Analysis of OTA in grain and flour samples showed that 97.7% and 94.6% of the respective samples contained OTA. Average values in the positive samples were 0.796 and 0.565 µg/Kg for grain and flour, respectively and the range of positive values were for grain 0.037–3.371 µg/Kg and for flour 0.039–2.189 µg/Kg

The results are lower than permitted values in European law (Commission Regulation No.1881/2006, 2006). However, there are samples with amounts of OTA or DON close to maximum levels for these mycotoxins.

3.6.4 Analysis and occurrence of type-B trichothecenes and ochratoxin A in bread

The different bread analyses obtained in the province of Valencia shows that all OTA samples were positive, while the percentage of positive samples of DON, NIV and 3- or 15-ADON was 52%, 15% and 17% respectively. In addition, the OTA average obtained in analyzed breads was 0.342 µg/Kg, whereas DON, NIV and 3- or 15-ADON showed an average of 164 µg/Kg, 74 µg/Kg, and 116 µg/Kg, respectively. The maximum content for OTA was 3.968 µg/Kg over the maximum level allowed by the European Union for all products derived from unprocessed cereals (3 µg OTA /Kg, Commission Regulation 2006).

3.6.5 Comparison and optimization of methods for patulin determination in apple juices and apple purees

3.6.5.1 Comparison of procedures for apple juice

The methods chosen were mainly the most used at the present time, in addition to other more recent and simple procedures. This study also used other methods which applied variations to the previous procedures in the search for a more sensitive, accurate and simple to apply method. In the execution of the different assayed procedures, recoveries were found to vary between 55.1% of the liquid–liquid extraction+NaH₂PO₄+C18 SPE procedure to 82.9% of the liquid–liquid extraction+NaH₂PO₄ method, for apple juices with 0.1 mg of PAT/Kg added. Although, the liquid–liquid

extraction+NaH₂PO₄+C18 SPE procedure is below the required minimum values for PAT recovery (<60%), nevertheless the detection limit is the lowest of all the procedures with 1.3 µg/Kg.

The best recoveries were obtained with MacDonald's method and liquid-liquid extraction+NaH₂PO₄, giving 73.2% and 82.9%, respectively for apple juices contaminated with 0.1 mg/Kg of PAT. Although MacDonald's method provides very good recoveries, relative standard deviation (RSD) is quite high at 8.5%. Another disadvantage of MacDonald's method is the time used in the extraction due to the multiple steps required. Also dissolvent cost is another problem. In contrast, the liquid-liquid extraction+NaH₂PO₄ method is fast, simple, with a low LOD 2.0 µg/Kg, a small RSD, and it provides good repeatability and is quite accurate. This method provides the best results of all the studied methods. The difference between liquid-liquid extraction+NaHCO₃ method and liquid-liquid extraction+NaH₂PO₄ method is only the addition to extract sodium hydrogen carbonate or monosodium phosphate, respectively. As indicated, extraction in the basic medium is used to eliminate compound acids, nevertheless in the method with phosphate no interference is observed to originate a different peak next to the analyte, or any increase in background noise that could influence the result of the PAT analysis. In addition, PAT is more stable in a slightly acid medium than in the basic medium which is why the procedure will show lower PAT loss due to PAT degradation to alkaline pH.

3.6.5.2 Comparison of procedures for solid products of apple

Comparison of procedures was limited to the modified Arranz and liquid-liquid extraction+NaH₂PO₄+C18 SPE methods that can be applied in semisolid samples such as purees. Recoveries are slightly higher in the case of liquid-liquid extraction+NaH₂PO₄+C18 SPE than with the modified Arranz method, 71.6% and 68.3% respectively, for apple puree at a spiked level of 0.1 mg of PAT /Kg. Nevertheless the LOD is lower for the liquid-liquid extraction+NaH₂PO₄+C18 SPE method (1.4 mg/Kg) as opposed to the modified Arranz (2.4 mg/Kg). In addition, monosodium phosphate was added in liquid-liquid extraction+NaH₂PO₄+C18 SPE method that causes sample pH to remain slightly acid, therefore PAT degradation will be less than in an alkaline medium.

3.6.5.3 Occurrence of patulin in apple samples

The results for the apple samples were in all cases below the limit of quantification, although two juice samples contained PAT over the detection limit. Therefore of the analyzed samples, no product appeared containing values above the limit established by the European Union.

3.7 Stability study of OTA and type-B trichothecenes for baking process

3.7.1 Effect of the dough fermentation process

Before baking the dough, this was fermented for 1 hour at 29–30°C. The results showed no significant diminutions in any trichothecenes amounts during the dough fermentation. On the other hand, a mycotoxin diminution between 29.8–33.5% was observed depending on the added concentration of OTA.

3.7.2 Effect of the baking process

After fermentation, the dough was baked under several conditions generally used in Spanish bakeries.

If the average reduction based on baking temperature is compared for each mycotoxin, the results indicate, generally, that significant values between the different temperatures are not observed. This is due to of the use of different baking times for each case, and therefore an increase in temperature will not reduce mycotoxins because a shorter baking time is needed

Analysis of the different values for mycotoxin reduction shows significant differences between all of them. The greatest mycotoxin reduction was found in NIV with an average of 76.9%, followed by 3-ADON with an average of 65.6%, followed by an average of 47.8% for DON and finally OTA with an average value of 32.9%

3.7.3 Effect of the baking process inside and outer of the bread

Sample location in the bread piece has been considered of interest. When the amount of mycotoxin was analyzed in the external part versus the internal part of the bread, a slight tendency towards a greater diminution of the secondary metabolite was observed on the external part of the bread.

The average difference in mycotoxin diminution for all concentrations and temperatures studied between the external and internal zone was 10.8% for OTA, 11.4% for DON, 13.5% for 3-ADON and 16.2% for NIV. These results confirm that the size of the bread piece can have an important effect in the reduction level of the different mycotoxins during the baking process.

3.8 Mycotoxin multi-detection method in wheat flour by LC-MS

3.8.1 Determination by LC-ion trap MS

In the determination of mycotoxins with APPI ionization source, OTA, DON and NIV were not observed by direct infusion, and so they were discarded for the analysis. However, they can be detected with ESI. Therefore the results obtained by ESI were better than using APPI.

LODs obtained for OTA, OTB, NIV, DON, 3-ADON were 0.09, 0.03, 5.5, 0.5, 0.6 mg/Kg respectively, in wheat flour by MS-ESI. Recoveries were over 60% in all studied mycotoxins except for NIV that was not determined.

3.8.2 Determination by LC-Single quadrupole MS

The LODs for NIV, DON, 3-ADON and OTB were better than those obtained by ion trap MS, such as NIV that had a LOD of 0.15 mg/Kg. In accordance with current legislation, the method could be applied for DON and ZEA in wheat flour (Commission Regulation No 1881/2006).

A recovery study for the mycotoxins was carried out according to the solvent mixture used in the extraction step for contaminated samples between 0.1 and 5 mg toxin/Kg. Four mixtures were compared: i) AcN-H₂O (60:40 v/v), ii) AcN-H₂O (80:20 v/v), iii) AcN-H₂O (84:16 v/v) and iv) AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/v). Recoveries varied according to the mycotoxin and the extracted solvent. In the case of 3-ADON, the best results were obtained using AcN-H₂O (84:16 v/v) with a recovery of 98.3% at a spiking level of 0.1 mg/Kg. DON recoveries were different according to the extracted solvent. The best recovery was obtained with AcN-H₂O (84:16 v/v). For NIV, recoveries were low, below 60%. In the case of OTA, the best recovery was obtained with AcN-H₂O (60:40 v/v). But the best extracted was AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/v) for OTB with a range between 72 to 92% according to contamination level.

In the study of DAS recovery, the best results were obtained with AcN-H₂O (84:16 v/v) and (80:20 v/v) with values of 73.3% and 79.2%, respectively. In case of HT2 and T2, the best recovery was the mixture AcN-H₂O (80:20 v/v). Finally, no differences were found between diverse mixtures of solvents from 71.8% to 95.5%. In general, the best recovery for all mycotoxins was AcN-H₂O (84:16 v/v).

3.8.3 Determination by LC-triple quadrupole MS

In some cases, the LODs, were better than the previous mass spectrometer such as OTA (15 mg/Kg versus 21 mg/Kg single quadrupole). But in other cases, NIV and DON were not possible to determine, because they were above 5 mg/Kg. LODs varied from 2.7 µg/Kg for OTB to 123 µg/Kg for 3-ADON.

The best recovery values for 3-ADON were with AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/v) and AcN-H₂O (84:16 v/v) with values of 75.6 and 76.7% respectively in wheat flour contaminated with 0.5 mg each mycotoxin/Kg. The best recovery for DAS was the same as for 3-ADON with 100.4 and 96.3% respectively. On the other hand, HT2 and T2 had the best recoveries with solvents AcN-H₂O (80:20 v/v) with 76.5 and 75.7% respectively. In ZEA, the highest value was 81.5% with AcN-H₂O-HAc (80:19:1 v/v/v), and for AFG2, it was 69.4% with AcN-H₂O (84:16 v/v). In the other mycotoxins, recoveries were below 60%. Therefore, study of triple

quadrupole MS would be directed to the identification of mycotoxins in wheat flour owing to its high selectivity.

3.8.4 Determination by last generation of LC–triple quadrupole MS

LOD values were the lowest obtained by a mass spectrometer with a value of 43 ng/g for DON and 8 ng/g for OTA. Therefore, mycotoxin LOD could be improved with the new system LC–MS. On the other hand, the new LC system contributes towards a reduction in analysis time and solvent saving due to low flow (0.3 ml/min) and short analysis time (6 min).

VI CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

Research carried out in the development of the present Doctoral Thesis has permitted: i) the study of the occurring mycobiota in wheat and apple; ii) the confirmation of potential production of mycotoxins by the tested fungal species; iii) the study of different conditions that affect mycotoxin production by fungal species; iv) the application of predictive models to forecasting mycotoxin accumulation in wheat; v) the development and optimization of analytical methodologies for mycotoxin characterization in different food products, such as wheat, apple and their by-products; vi) the study of mycotoxin change during food preparation from wheat flour; and vii) the proposal of methods for simultaneous analysis of many mycotoxins, in agreement with the proposed aims. From the results obtained in the experimental part of this research and as consequence of the discussion of such results the following conclusions can be established:

1. The most significant potential mycotoxin-producing species that occur in wheat from the Spanish market are *F. graminearum*, species in *Aspergillus* section *Nigri* and *A.* section *Circumdati*. However, *P. expansum* is the most noteworthy mycotoxigenic species in apple.
2. Very sensitive analytical methods have been developed and implemented. They permit the suitable chemotyping *in vitro* of isolates capable of producing ochratoxins, type-B trichothecenes and PAT from identified fungal species in wheat and apple.
3. The chemotyping of isolates belonging to species that are potential producers of the studied mycotoxins indicate that 71.1%, 82.5% and 92.9% of isolates of species in the *Aspergillus* section *Nigri*, *F. graminearum* and *P. expansum* produce OTA, DON and PAT, respectively. Therefore, there is a high potential hazard that these mycotoxins occur in wheat and apple.
4. Carbendazim is not a very effective fungicide to control the growth of *A. carbonarius* and, at sub-inhibitory doses, it favors OTA accumulation in the culture medium under the assayed conditions.
5. The lag phase and growth rate of *P. expansum* isolated from apple increased and decreased, respectively, when the temperature decreases. However, PAT producing levels are not affected. The studied strain offered more resistance to imazalil sulphate in apple medium than in potato medium, which is indicative of an excellent adaptation of the mould to the substrate.
6. The response surface model obtained using the method of Baranyi predicted better the effects observed in mycotoxin accumulation

- than the predictive model obtained by multiple regression in the assayed conditions.
7. Baranyi's predictive model shows that water activity, time and temperature significantly affect toxin accumulation by the studied isolates in the culture media. However, inoculum size only is significant to OTA accumulation in cultures of *A. ochraceus* while it does not affect DON accumulation in cultures of *F. graminearum*.
 8. The MycoSep 225 column and "made-in-laboratory" cartridges packed with alumina-charcoal-C₁₈ offered the best results in the clean-up step for the determination of type-B trichothecenes in wheat. Clean-up was developed in a simple step and was more effective than other tested procedures. The commercial MycoSep 225 column is more expensive and shows lower recovery for NIV than "made-in-laboratory" cartridges.
 9. Concerning the determination of trichothecenes by GC as perfluoroacyl derivatives in scarcely contaminated samples the HP-5 capillary column shows better results than the HP-1701 column, owing to low bleeding and greater sensitivity. Nevertheless, use of HP-1701 column is necessary to separate 3- and 15-ADON derivatives. The HP-1701 column can also be effective for confirming the other type-B trichothecenes because retention times are different. Pentafluoropropionic anhydride was preferable as derivatisation reagent to heptafluorobutyric anhydride due to greater stability against moisture, lower costs and similar sensitivity for the trichothecene derivatives.
 10. The best results were obtained with the method that implies the use of immunoaffinity columns in the clean-up step for the determination of OTA in wheat. The remaining methods showed low recovery rates and high relative standard deviations.
 11. The proposed methods for PAT determination in apple juice and by-products (apple purees and compotes) significantly improve the proposed methods so far. These methods are easy, cheap, fast and let to work at acidic pH thus promoting toxin stability.
 12. Application of optimized methods to mycotoxin determination has allowed to know the incidence of type-B trichothecenes and OTA in wheat and wheat flour as well as the occurrence of PAT in apple and its by-products in Spain. It was found that 9.1%, 21.2% and 97.0% of analyzed wheat samples contained NIV, DON, and OTA, respectively; 27.8%, 83.3% and 94.6% of wheat flour samples contained NIV, DON, and OTA; 15%, 52%, 100% and 35% of the bread samples contained NIV, DON, OTA and acetyl derivatives of DON, respectively, whereas 3.7% of the apple-based samples contained PAT at trace levels.

13. During breadmaking, dough fermentation reduces by 31.3% the initial amount of OTA whereas this process does not significantly decrease the levels of trichothecenes. The baking process reduces the levels of OTA between 17% and 45%, the levels of DON between 36% and 65%, the levels of 3-ADON between 54% and 75% and the levels of NIV between 70% and 91%, depending on the combination temperature/time and the spiking level of each mycotoxin. There are significant differences between the reduction of the concentrations of DON, 3-ADON, and NIV between the internal (crumb) and external (crust) part of the bread. Concerning OTA, even though its levels decreased on average 10.8% more in the outer part than in the inner part of the bread, such differences were not significant.
14. Multi-mycotoxin determination requires the optimization of the extraction and analysis steps. However, it can eliminate the clean-up stage due to the high selectivity of the mass spectrometer. Taking into account the chemical diversity of the analyzed mycotoxins a non-specific sample preparation that prevented segregation of the mycotoxins under study was performed. Moreover, the method can be applied to determine and quantify mycotoxins in naturally contaminated wheat and other wheat products. New mass spectrometry systems improve significantly the ionization of the studied analytes and, therefore, improve the limits of detection.

La investigación llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral ha permitido: i) el estudio de la microbiota presente en trigo y manzana; ii) la confirmación de la producción potencial de micotoxinas de las especies fúngicas analizadas; iii) el estudio de diferentes condiciones que afectan a la producción de micotoxinas por las especies fúngicas; iv) la aplicación de modelos predictivos para la determinación de la acumulación de micotoxinas en trigo; v) el desarrollo y optimización de metodologías analíticas para la caracterización de las micotoxinas en diferentes alimentos, como son trigo, manzanas y productos derivados; vi) el estudio de la evolución de la micotoxina durante los procesos de elaboración de alimentos a partir de la harina de trigo; y vii) la proposición de métodos para el análisis simultáneo de múltiples micotoxinas, de acuerdo con los objetivos propuestos. A partir de los resultados obtenidos en la parte experimental de esta investigación y como consecuencia de la discusión de los resultados se establecen las siguientes conclusiones:

1. Las especies potencialmente productoras de micotoxinas más importantes en trigo comercializado en España son *F. graminearum*, especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* y *A. de la* sección *Circumdati*. En manzana sin embargo la especie micotoxigénica más relevante es *P. expansum*.
2. Se han desarrollado y aplicado métodos analíticos muy sensibles que permiten un certero quimiotipado *in vitro* de aislados productores de ocratoxinas, tricotecenos B y patulina de las especies fúngicas detectadas en trigo y manzana.
3. El quimiotipado de los aislados de las especies potencialmente productoras de las micotoxinas estudiadas indica que el 71.1%, 82.5% y 92.9% de los aislados de las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, *F. graminearum* y *P. expansum* son productores de OTA, DON y PAT, respectivamente. Lo que supone un importante peligro potencial de que las micotoxinas se encuentren en trigo y manzana.
4. El fungicida carbendazima es poco efectivo en el control del crecimiento de *A. carbonarius*, y a dosis sub-inhedoras del crecimiento se potencia la acumulación de OTA en el medio en las condiciones ensayadas.
5. El inicio del crecimiento aumenta y la velocidad de crecimiento de *P. expansum*, aislado de manzana, disminuye, cuando disminuye la temperatura. Sin embargo, ello no afecta a los niveles de producción de patulina. La cepa estudiada mostró además mayor resistencia al fungicida sulfato de imazalil en el medio de manzana que en el de patata, lo que indica una excelente adaptación del hongo al sustrato.
6. El modelo de superficie de respuesta utilizando el método de Baranyi es más adecuado para la predicción de la acumulación de

las micotoxinas estudiadas en las condiciones ensayadas que el modelo predictivo en el que se emplea el método por regresión múltiple.

7. El modelo predictivo de Baranyi indica que la actividad de agua, tiempo y temperatura afectan significativamente a la acumulación de toxinas en los cultivos de los aislados estudiados. Sin embargo, el tamaño de inóculo únicamente afecta a la acumulación de OTA en los cultivos de *A. ochraceus*, mientras que no ejerce influencia en la acumulación de DON en los cultivos de *F. graminearum*.
8. Las columnas MycoSep 225 y las que contienen Alúmina-carbón activo-C₁₈ sílica diseñadas en nuestro laboratorio, ofrecen los mejores resultados en la etapa de purificación, para el análisis de los tricotecenos tipo B en trigo. La purificación se desarrolla en un simple paso y es más efectiva que con otros procedimientos ensayados. Hay que destacar, sin embargo, que la columna comercial, MycoSep 225, presenta una menor recuperación de NIV y un mayor coste económico que la columna diseñada en el laboratorio.
9. Para el análisis de los derivados de los tricotecenos mediante cromatografía gaseosa, en las muestras que presentan baja contaminación, la columna capilar HP-5 ofrece mejores resultados que la columna HP-1701 debido a su bajo sangrado y mayor sensibilidad. Sin embargo, la última, permite la separación de los derivados 3- y 15-ADON. Por otra parte, con la columna HP-1701 se obtienen tiempos de retención de los fluoroderivados de los tricotecenos diferentes a los obtenidos con la HP-5, por lo que puede resultar muy útil en análisis comparativos y confirmativos. El reactivo seleccionado para la formación de derivados de los tricotecenos es el anhídrido pentafluoropropiónico frente al anhídrido heptafluorobutírico por su mayor estabilidad a la humedad, menor coste y en general similar sensibilidad de análisis.
10. Para la determinación de OTA en trigo, los mejores resultados se obtienen mediante purificación con columnas de inmunoafinidad. El resto de métodos ensayados ofrecen bajas recuperaciones y elevada desviación estándar relativa.
11. Los métodos propuestos para la determinación de PAT en zumos de manzana y derivados de manzana (purés y compotas) mejoran significativamente a los métodos propuestos hasta ahora, son en general sencillos, rápidos, económicos y permiten trabajar a pH ácido lo que favorece la estabilidad de la toxina.
12. La aplicación de los métodos optimizados a la determinación de las micotoxinas ha permitido conocer la incidencia de tricotecenos B y OTA en trigo y harina de trigo y de PAT en manzana y derivados de la manzana en España. Se ha encontrado que el 9.1%, 21.2% y 97.0% de las muestras de trigo estudiadas contenían NIV, DON y OTA respectivamente; el 27.8%, 83.3% y 94.6% de las muestras de

harina de trigo contenían NIV, DON y OTA respectivamente, el 15%, 52%, 100% y 35% de las muestras de pan contenían NIV, DON, OTA y los derivados acetilados de DON respectivamente y el 3.7% de las muestras de alimentos a base de manzana contenían PAT a nivel de trazas.

13. La fermentación de pan reduce el contenido inicial de OTA en un 31.3%, mientras que no existe una disminución significativa de los tricotecenos durante el proceso. El horneado reduce el nivel de OTA entre un 17% y 45% el de DON entre un 36% y 65% el de 3-ADON entre un 54 y 75% y el de NIV entre un 70% y 91%, dependiendo de la combinación temperatura/tiempo y concentración de toxina añadida. Existen diferencias significativas en la reducción de DON, 3-ADON y NIV entre la parte interna y externa de la pieza de pan, mientras que para la OTA esas diferencias no fueron significativas aunque hubo una disminución media superior, en la corteza que en la parte blanda del pan, de un 10.8%.
14. La determinación simultánea de distintas micotoxinas requiere de la optimización de las fases de extracción y de análisis. Sin embargo la etapa de purificación puede omitirse debido a la alta selectividad del espectrómetro de masas. Teniendo en cuenta la diversidad química de los distintas micotoxinas analizadas, se desarrolla un método de preparación de muestra poco específico que impide la segregación de las micotoxinas objeto de estudio. Además, el método puede ser aplicado para la detección y cuantificación de las micotoxinas en muestras de trigo y de otros productos derivados. Los nuevos equipos de espectrometría de masas mejoran sensiblemente la ionización de los analitos estudiados y por consiguiente se mejora el límite de detección.

VII BIBLIOGRAFÍA

- Abarca M.L.; M.R. Bragulat, G. Castellá, F. Accensi, F.J. Cabañes. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev. Iberoam. Micol. 17: S63–S68.
- Abarca M.L.; M.R. Bragulat, G. Castellá, F.J. Cabañes. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2650–2652.
- Abarca, M.L.; F. Accensi, M.R. Bragulat, F.J. Cabañes. 2001. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* sp. J. Food Prot. 64: 903–906.
- Abarca, M.L.; F. Accensi, M.R. Bragulat, G. Castellá, F.J. Cabanes. 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. J. Food Prot. 66: 504–506.
- Abbas, H.K.; C.J. Mirocha, R.J. Pawlosky, D.J. Pusch. 1985. Effect of cleaning, milling and baking on deoxynivalenol in wheat. Appl. Environ. Microbiol. 50: 482–486.
- Abdel-Hadi, A.; N. Magan. 2009. Influence of physiological factors on growth, sporulation and ochratoxin A/B production of the new *Aspergillus ochraceus* grouping. World Mycotox. J. 2: 429–434.
- Abdel-Wahhab, M.A.; H.H. Ahmed, M.M. Hagazi. 2006. Prevention of aflatoxin B₁-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. J. Appl. Toxicol. 26: 229–238.
- Abdel-Wahhab, M.A.; S.A. Nada, M.S. Arbid. 1999. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. J. Appl. Toxicol. 19: 7–12.
- Abid, S.; W. Hassen, A. Achour, H. Skhiri, K. Maaroufi, F. Ellouz, E. Creppy, H. Bacha. 2003. Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? Hum. Exp. Toxicol. 22: 77–84.
- Abouzied, M.M.; J.I. Azcona, W.E. Braselton, J.J. Pestka. 1991. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: Evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. Appl. Environ. Microbiol. 57: 672–677.
- Abramson, D.; J.T. Mills, B.R. Boycott. 1983. Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in western Canada. Can. J. Comp. Med. 47: 23–26.
- Accensi, F.; J. Cano, L. Figuera, M.L. Abarca, F.J. Cabañes. 1999. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. FEMS Microbiol. Lett. 180: 191–196.
- Accensi, F.; M.L. Abarca, F.J. Cabanes. 2004. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. Food Microbiol. 21: 623–627.
- Ackermann, A. 1998. Mycoflora of South African barley and malt. J. Am. Soc. Brew. Chem. 56: 169–176.
- Adányi, N.; I.A. Levkovets, S. Rodríguez-Gil, A. Ronald, M. Váradi, I. Szendrő. 2007. Development of immunosensor based on OWLS technique for determining aflatoxin B₁ and ochratoxin A. Biosensors and Bioelectronics 22: 797–802.
- Adebajo, L.O.; O.A. Bamgbelu, R.A. Olowu. 1994. Mould contamination and the influence of water activity and temperature on mycotoxin production by two *Aspergilli* in melon seed. Nahrung 38: 209–217.
- Ake, M.; B. Eba, A.K. Malan, E. Atindehou. 2001. Détermination de la patuline dans le jus de fruits commercialisés en Côte d’Ivoire. Sci. Aliment. 21:199–206.
- Akerstrand, K.; A. Molander, A. Andersson, G. Nilsson. 1976. Occurrence of moulds and mycotoxins in frozen blueberries. Vår Föda 28:197–200.

- Akiyama, H.; D. Chen, M. Miyahara, M. Toyoda, Y. Saito. 1996. Simple HPLC determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in nuts and corn. *J. Food Hyg. Soc.* 37: 195–201.
- Akiyama, H.; Y. Goda, T. Tanaka, M. Toyoda. 2001. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *J. Chromatogr. A* 932: 153–157.
- Alexopoulos, C.J.; C.W. Mims, M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology* (4th Ed.). John Wiley and Sons, Nueva York, EEUU. p. 868.
- Amiri, A.; G. Bompeix. 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathol.* 54:74–81.
- Andersen, B.; J. Smedsgaard, J.C. Frisvad. 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: 2421–2428.
- Andersen, B.A.; E. Kroger, R.G. Roberts. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycol. Res.* 105: 291–299.
- Andersen, B.A.; E. Kroger, R.G. Roberts. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol. Res.* 106: 170–182.
- Anderson, M.S.; M.F. Dutton, K. Harding. 1979. Production and degradation of patulin by *Paecilomyces* species, a common contaminant of silage. *J. Sci. Food Agric.* 30: 229–232.
- Ansari, A.A.; A.K. Shrivastava. 1990. Natural occurrence of *Alternaria* toxins in sorghum and ragi from North Bihar, India. *Food Addit. Contam.* 7: 815–820.
- Anselme, M.; E.K. Tangni, L. Pussemier, J.C. Motte, F. Van Hove, Y.J. Schneider, C. Van Peteghem, Y. Larondelle. 2006. Comparison of ochratoxin A and deoxynivalenol in organically and conventionally produced beers sold on the Belgian market. *Food Addit. Contam.* 23: 910–918.
- Arafat, W.; D. Kern, G. Dirheimer. 1985. Inhibition of aminoacyl-tRNA synthetases by the mycotoxin patulin. *Chem. Biol. Interact.* 56: 333–49.
- Arafat, W.; M.N. Musa. 1995. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 87: 177–86.
- Araguás, C.; E. González-Peñas, A. López de Cerain. 2005. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chem.* 92: 459–464.
- Arenas, R. 1993. *Micología médica ilustrada*. McGraw-Hill/Interamericana, México, pp. 13–16.
- Arora, R.G.; H. Frolen, A. Nilsson. 1981. Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. I. Influence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone. *Acta Vet. Scand.* 22: 524–34.
- Arranz, I.; J. Stroka, K. Kroeger, M. Derbyshire, C. Mischke, E. Anklam. 2004. Validation of an analytical method to determine the content of patulin in apple juice and fruit puree: Collaborative trial. Euroreport: EUR 21008. Brussels: European Commission.
- Arranz, I.; M. Derbyshire, K. Kroeger, C. Mischke, J. Stroka, E. Anklam. 2005. Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 88: 518–525.
- Ashoor, S.H.; F.S. Chu. 1973. Inhibition of muscle aldolase by penicillic acid and patulin *in vitro*. *Food Cosmet. Toxicol.* 11: 995–1000.
- Atkinson, H.A.C.; K. Miller. 1984. Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation. *Toxicol. Lett.* 23: 215–221.

- Austwick, P.K.C. 1978. Mycotoxicoses in poultry. En: Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: An Encyclopedic Handbook. Volume 2: Mycotoxicoses of Domestic and Laboratory Animals, Poultry, and Aquatic Invertebrates and Vertebrates. T.D. Wyllie, L.G. Morehouse (Eds.). Marcel Dekker, Inc, Nueva York, EEUU, pp. 279–301.
- Aytac, S.A.; J. Acar. 1994. Einflub von L-ascorbinsäure und schwefeldioxidzusatz auf die stabilität von patulin in apfelälften und pufferlösungen. Ernährung 1: 15–7.
- Badii, F.; M.O. Moss. 1988. The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. Lett. Appl. Microbiol. 7: 37–39.
- Baert, K.; B. De Meulenaer, A. Kamala, C. Kasase, F. Devlieghere. 2006. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. J. Food Prot. 69: 1371–1378.
- Baert, K.; F. Devlieghere, H. Flyps, M. Oosterlinck, M. Morshed Ahmed, A. Rajković, B. Verlinden, B. Nicolai, J. Debevere, B. De Meulenaer. 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. Int. J. Food Microbiol. 119: 170–181.
- Bakan, B.; L. Pinson, B. Cahagnier, D. Melcion, E. Sémon, D. Richard-Molard. 2001. Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. Food Addit. Contam. 18: 998–1003.
- Baranyi, J.; T.A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23: 277–294.
- Barhoumi, R.; R.C. Burghardt. 1996. Kinetic analysis of the chronology of patulin- and gossypol-induced cytotoxicity *in vitro*. Fundam. Appl. Toxicol. 30: 290–297.
- Barkai-Golan, R. 1974. Species of *Penicillium* causing decay of stored fruits and vegetables in Israel. Mycopathol. 54: 141–145.
- Barna-Vétró, I.; L. Solti, J. Téren, Á. Gyöngyösi, E. Szabó, A. Wölfling. 1996. Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. Agric. Food Chem. 44: 4071–4074.
- Barnett, H.L.; B. Hunter, 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, EEUU.
- Battilani, P.; A. Logrieco, P. Giorni, G. Cozzi, T. Bertuzzi, A. Pietri. 2004. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. J. Sci. Food Agric. 84: 1736–1740.
- Battilani, P.; A. Pietri, T. Bertuzzi, S. Formenti, C. Barbano, L. Languasco. 2003. Effect of fungicides on ochratoxin producing black *aspergilli*. J. Plant Pathol. 85: 285.
- Battilani, P.; A. Pietri. 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. Eur. J. Plant Pathol. 108: 639–643.
- Baudrimont, I.; A.M. Betbeder, A. Gharbi, A. Pfohl-Leszkwicz, G. Dirheimer, E.E. Creppy. 1994. Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. Toxicol. 89: 101–111.
- Baxter, E.D. 1996. The fate of ochratoxin A during malting and brewing. Food Addit. Contam. 13 (suppl.): 23–24.
- Baxter, E.D.; I.R. Slaiding, B. Kelly. 2001. Behavior ochratoxin A in brewing J. Am. Soc. Brew. Chem. 59: 98–100.
- Bayman, P.; J.L. Baker, M.A. Doster, T.J. Michailides, N.E. Mahoney. 2002. Ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2326–2329.

- Beaver, R.W.; M.A. James, T.Y. Lin. 1991. Comparison of an ELISA-based screening test with liquid chromatography for the determination of aflatoxins in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 827–829.
- Becker, M.; P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier, H.U. Humpf. 1998. Column liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. J. Chromatogr. A 818: 260–264.
- Belli, N.; A.J. Ramos, I. Coronas, V. Sanchis, S. Marín. 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. J. Appl. Microbiol. 98: 839–844.
- Belli, N.; E. Pardo, S. Marín, G. Farré, A.J. Ramos, V. Sanchis. 2004. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. J. Sci. Food Agric. 84: 541–546.
- Belli, N.; S. Marín, V. Sanchis, A.J. Ramos. 2006. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. Food Addit. Contam. 23: 1021–1029.
- Belmadani, A.; G. Tramu, A.M. Betbeder, E.E. Creppy. 1998a. Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartame, a sweetener. Hum. Exp. Toxicol. 17: 380–386.
- Belmadani, A.; G. Tramu, A.M. Betbeder, P.S. Steyn, E.E. Creppy. 1998b. Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. Arch. Toxicol. 72: 656–662.
- Bendele, A.M.; S.B. Neal, T.J. Oberly, C.Z. Thompson, B.J. Bewsey, L.E. Hill, M.A. Rexroat, W.W. Carlton, G.S. Probst. 1985b. Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. Food Chem. Toxicol. 23: 911–918.
- Bendele, A.M.; W.W. Carlton, P. Krogh, E.B. Lillehoj. 1985a. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. J. Natl. Cancer Inst. 75: 733–742.
- Bennett, J.W. 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. Mycopathologia 100: 3–5.
- Bennett, J.W.; M. Klich. 2003. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16: 497–516.
- Berestets'kyi, O.O.; V.M. Synyts'kyi. 1973. Phytotoxic activity in different strains of *Penicillium urticae* banier. Mikrobiol Zh. 35: 349.
- Berger, U.; M. Oehme, F. Kuhn. 1999. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 47: 4240–4245.
- Bertrand, P.F.; J.L. Saulie-Carter. 1978. The occurrence of benomyl-tolerant strains of *Penicillium expansum* and *Bortytis cinerea* in the mid-Columbia region of Oregon and Washington. Plant Dis. Rep. 62: 302–305.
- Betina, V. 1989. Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects. Ed. Elsevier. Bratislava, pp. 350.
- Bhat, R.V. 1991. Aflatoxins: successes and failure of three decades of research. En: B.R. Champ, E. Highley, A.D. Hocking, J.I. Pitt (Eds.) Fungi and Mycotoxins in Stored Products: Proceedings of an International Conference, Bangkok, Thailand (1991). Canberra ACIAR Proceedings N° 36.
- Bhat, R.V.; S.R. Beedu, Y. Ramakrishna, K.L. Munshi. 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, India. Lancet 1: 35–37.
- Biro K.; I. Barna-Vetro, T. Pecsí, E. Szabo, G. Winkler, J. Fink-Gremmels, L. Solti. 2003. Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A – challenged boars. Theriogenology 60: 199–207.

- Birzele, B.; A. Prange, J. Krämer. 2000. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Addit. Contam.* 17: 1027–1035.
- Black, R.M.; R.J. Clarke, R.W. Read. 1987. Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in environmental residues and foodstuffs using gas chromatography with mass spectrometric or electron-capture detection. *J. Chromatogr.* 388: 365–378.
- Blesa, J.; J.M. Soriano, J.C. Moltó, J. Mañes. 2004. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *J. Chromatogr. A* 1054: 397–401.
- Boonzaaijer, G.; I. Bobeldijk, W.A. van Osenbruggen. 2005. Analysis of patulin in Dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control* 16: 587–591.
- Boorman, G.A.; H.L. Hong, M.P. Dieter, H.T. Hayes, A.E. Pohland, M. Stack, M. Luster. 1984. Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72: 304–312.
- Borecka, H. 1977. Fungi of the genus *Penicillium* on apples and pears during the storage period. *Acta Agrobot.* 30: 213–227.
- Bottalico, A.; G. Ferrone. 2002. Toxicogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 611–624.
- Bottalico, A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant. Pathol.* 80: 85–103.
- Boudra, H.; P. Le Bars, J. Le Bars. 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1156–1158.
- Boutrif, E.; C. Canet. 1998. Mycotoxin prevention and control: FAO programmes. *Revue Méd. Vét.* 149: 681–694.
- Brackett, R.E.; E.H. Marth. 1979. Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice. *J. Food Prot.* 42: 864–866.
- Brackett, R.E.; E.H. Marth. 1979. Patulin in apple juice from roadside stands in Wisconsin. *J. Food Prot.* 42: 862–863.
- Bradburn, N.; R.D. Coker, G. Blunden. 1994. The aetiology of turkey ‘x’ disease. *Phytochem.* 35: 817.
- Brause, A.R.; M.W. Trucksess, T.S. Frederick, S.W. Page. 1996. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. *J. AOAC int.* 79: 451–455.
- Brian, P.W.; G.W. Elson, D. Lowe. 1956. Production of patulin in apple fruits by *Penicillium expansum*. *Nature* 178: 263–264.
- Brown, A.H.S.; G. Smith. 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. *Transactions Brit. Mycol. Soc.* 40: 17–89.
- Buchanan, R.L.; S.B. Jones, H.G. Stahl. 1987. Effect of miconazole on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 100: 135–144.
- Buchanan, J.R.; N.F. Sommer, R.J. Fortlage, E.C. Maxie, F.G. Mitchell, D.P.H. Hsieh. 1974. Patulin from *Penicillium expansum* in stone fruits and pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99: 262–265.
- Bullerman, L.B. 1985. Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *Lebensm. Wiss. Technol.* 18: 197–200.
- Bullerman, L.B.; W.Y. Tsai. 1994. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. *J. Food Prot.* 57: 541–546.
- Bullerman, L.B.; D. Ryu. 2002. Stability of fumonisins in food processing. *Adv. Exper. Med. Biol.* 504: 195–204.
- Bullerman, L.B.; F.J. Olivigni. 1974. Mycotoxin producing potential of molds isolated from cheddar cheese. *J. Food Sci.* 39: 1166–1168.

- Burdaspal, P.A.; T.M. Legarda. 1998b. Ocratoxina A en muestras de café comercializado en España. *Alimentaria* 296 :31–35.
- Burdaspal, P.A.; T.M. Legarda. 1999. Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria* 299: 107–113.
- Burdaspal, P.A.; T.M. Legarda. 1998a. Datos sobre la presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria* 292: 103–109.
- Burdaspal, P.A.; T.M. Legarda. 1998c. Ocratoxina A en cervezas. elaboradas en España y en otros países Europeos. *Alimentaria* 291: 115–122.
- Burghardt, R.C.; R. Barhoumi, E.H. Lewis, R.H. Bailey, K.A. Pyle, B.A. Clement, T.D. Phillips. 1992. Patulin–induced cellular toxicity: a vital fluorescence study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112: 235–244.
- Cabañes, F.J.; F. Accensi, M.R. Bragulat, M.L. Abarca, G. Castellá, S. Minguéz, A. Pons. 2002. What is the source of ochratoxin A in wine?. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 213–215.
- Cahill, L.M.; S.C. Kruger, B.T. McAlice, C.S. Ramsey, R. Prioli, B. Kohn. 1999. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 859: 23–28.
- Calvo, M. 2007. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/micotoxinas.htm>
- Campbell, H.; T.M. Choo, B. Vigier, L. Underhill. 2000. Mycotoxin in barley and oat samples from eastern Canada. *Can. J. Plant Sci.* 80: 977–980.
- Canady, R. A.; R.D. Coker, S.K. Egan, R. Krska, T. Kuiper–Goodman, M. Olsen, J. Pestka, S. Resnik, J. Schlatter. 2001. Deoxynivalenol. In *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Geneva: World Health Organization. pp. 420–529.
- Canela, R.; R. Viladrich, C.A. Velazquez, V. Sanchis. 1994. A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain. *Mycopathologia* 135: 29–32.
- CAST. 1989. Mycotoxins, Economic and Health Risk. Task Force Report, No. 116, noviembre 1989. Council for Agricultural Science and Technology, CAST. Ames, Iowa, EEUU.
- Castegnaro, M.; U. Mohr, A. Pfohl–Leszkowicz, J. Esteve, J. Steinmann, T. Tillmann, J. Michelon, H. Bartsch. 1998. Sex– and strain–specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int. J. Cancer* 77: 70–75.
- Castillo Sánchez, M.D.; M.T. León Espinosa de los Montes. 2002. Evolución del consumo de alimentos en España. *Medicina de Familia Andalucía* 3: 269–273.
- Castoria, R.; G. Lima, R. Ferracane, A. Ritieni. 2005. Occurrence of mycotoxin in farro simples from southern Italy. *J. Food Prot.* 68: 416–420.
- Cawood, M.; W.C.A. Gelderblom, R. Vleggaar, Y. Behrend, P.G. Thiel, W.F.O. Marasas. 1991. Isolation of fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1958–1962.
- Cecchini, F.; M. Morassut, E. Garcia–Moruno, R. di Stefano. 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.* 23: 411–417.
- CEN (European Committee for Standardization). 1999. Food analysis – Biotoxins – Criteria of analytical methods for mycotoxins, CEN working group "Biotoxins" CR 13505, Food Analysis, Biotoxins, 1ª edición, 30 pp.
- CEN (European Committee for Standardization). 2003. Foodstuffs – Determination of patulin in clear and cloudy apple juice and puree – HPLC method with liquid/liquid partition clean–up. CEN/TC 275/WG5. Food analysis – Biotoxins – Foodstuffs –EN 14177:2003. Bruselas: CEN.

- CEN (European Committee for Standardization). 2009. Foodstuffs – Determination of ochratoxin A in wine and beer – HPLC method with immunoaffinity column clean-up. Method EN 14133:2009. Bruselas: CEN.
- Chandelier, A.; J.Y. Michelet, E.K. Tangni, K. Baert, E. Moons, C. Vinkx. 2004. Mycotoxins survey in Belgium and toxigenic *Fusarium* in Belgian wheat. En: An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. A. Logrieco, A. Visconti (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. pp. 11–32.
- Charmley, L.L.; D.B. Prelusky. 1994. Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. En: J.D. Miller, H.L. Trenholm (Eds.). Mycotoxins in Grain—Compounds other than Aflatoxins. Eagan Press, St. Paul, MN, EEUU. pp. 421–435.
- Charmley, L.L.; H.L. Trenholm, D.B. Prelusky, A. Rosenberg. 1995. Economic losses and decontamination. *Nat. Toxins* 3: 199–203.
- Chelkowski, J. 1991. Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda.
- Chelkowski, J.; H. Lew. 1992. *Fusarium* species of *Liseola* section – occurrence in cereals and ability to produce fumonisins. *Microbiol. Alim. Nutr.* 10: 40–53.
- Chelkowski, J.; G. Dopierala, B. Godlewska, W. Radomyska, K. Szebioto. 1981. Mycotoxins in cereal grain. Part III. Production of ochratoxin A in different varieties of wheat, rye and barley. *Nahrung* 25: 625–629.
- Chernoziemsky, I.N.; I.S. Stoyanov, T.K. Petkova–Bocharova, I.G. Nicolov, I.V. Draganov, I.I. Stoichev. Y. Tanchev, D. Naidenov, N.D. Kalcheva. 1977. Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in vratzka district, Bulgaria. *Int. J. Cancer* 19: 1–11.
- Christensen, C.M. 1987. En: Food and Beverage Mycology. L.R. Beuchat (Ed.). Van Nostrand Reinhold, Nueva York, EEUU. cap. 7.
- Christensen, C.M.; H.H. Kaufman. 1969. Grain storage: the role of fungi in quality loss. University of Minnesota Press. Minneapolis, MN, EEUU. pp 3–36.
- Chulze, S.N.; A.M. Torres, A.M. Dalcerro, M.G. Etcheverry, M.L. Ramirez, M.C. Farnochi. 1995. *Alternaria* mycotoxins in sunflower seeds: incidence and distribution of the toxins in oil and meal. *J. Food Prot.* 58: 1133–1135.
- Ciegler, A. 1978. Trichothecenes: occurrence and toxicoses. *J. Food Prot.* 41: 399–403.
- Ciegler, A.; A.C. Beckwith, L.K. Jackson. 1976. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 664–667.
- Ciegler, A.; R.W. Detroy, E.B. Lillehoj. 1971. Patulin, penicillic acid, and other carcinogenic lactones. En: A. Ciegler, S. Kadis, S.J. Ajl (Eds.). *Microbial toxins*. Vol 6. Academic Press, Nueva York y Londres. p 409.
- Cirillo, T.; A. Ritieni, M. Visone, R.A. Cocchieri. 2003. Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 8128–8131.
- Codex Alimentarius Commission. 1999. Position Paper on Patulin, Document CX/FAC 99/16 – Enero 1998. 31st Session Codex Committee on Food Additives and Contaminants. La Haya, Holanda, 22–29 Marzo 1999.
- Cohen, H.; B. Boutin–Muma. 1992. Fluorescence detection of trichothecene mycotoxins as coumarin–3–carbonyl chloride derivatives by high–performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 595: 143–148.
- Coker, R.D. 2000. Aflatoxins and mycotoxins, chromatography. En: *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole (Eds.), Academic Press, San Diego, CA, EEUU. pp. 1873–1888.
- Coker, R.D. 1997. Mycotoxins and their control: constraints and opportunities. NRI Bulletin 73. Chatham, Reino Unido: Natural Resources Institute.
- Cole, R.J.; R.H. Cox. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, Nueva York, EEUU. pp. 987.

- Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. Diario Oficial de la Unión Europea, 29/09/2007. L 255 p. 14–17.
- Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Diario Oficial de la Unión Europea, 20/12/2006. L 364 p. 5–24.
- Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. Diario Oficial de la Unión Europea, 06/02/2010. L 35 p. 7–8.
- Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Diario Oficial de la Unión Europea, 26/02/2010. L 50 p. 8–12.
- Cooray, R.; K.H. Kiessling, K. Lindahl–Kiessling. 1982. The effects of patulin and patulin–cysteine mixtures on DNA synthesis and the frequency of sister–chromatid exchanges in human lymphocytes. Food Chem. Toxicol. 20: 893–898.
- Corbett, D. 2003. Patulin—U.K. producers perspective En: Patulin technical symposium. 18–19 Febrero 2003; Kissimmee, Fla. National Center for Food safety and Technology. Summit, Ill.
- Corneli, S.; C.M. Maragos. 1998. Capillary electrophoresis with laser–induced fluorescence: method for the mycotoxin ochratoxin A. J. Agric. Food Chem. 46: 3162–3165.
- Corry, J.E.L. 1987. Relationships of water activity to fungal growth. En: Food and beverage mycology. 2ª edición. L.R. Beuchat (Ed.). Van Nostrand Reinhold, Nueva York, EEUU. pp: 51–99.
- Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett. 127: 19–28.
- Creppy, E.E.; A.M. Betbeder, J.P. Godin, J.P. Fillastre, P. Simon, P. Lasseur C. Combe, M. Aparico. 1995. Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft, vol. 157. Proceedings from 17 Mykotoxin–Workshop in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig, Völkenrode, Alemania. p. 56.
- Creppy, E.E.; D. Kern, P.S. Steyn, R. Vleggaar, R. Roschenthaler, G. Dirheimer. 1983a. Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl–tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. Toxicol. Lett. 19: 217–224.
- Creppy, E.E.; R. Roesenthaler, G. Dirheimer. 1984. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. Food Chem. Toxicol. 22: 883–886.
- Croteau, S.M.; D.B. Prelusky, H.L. Trenholm. 1994. Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. J. Agric. Food Chem. 42: 928–933.
- Cunniff, P.A. (Ed.). 1998. Official Methods of Analysis, 16th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, 4th revision, Method No. 986.17.
- Curtui, V.; E. Usleber, R. Dietrich, J. Lepschy, E. Märflbauer. 1998. A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. Mycopathologia 143: 97–103.
- Curtui, V.; M. Gareis, E. Usleber, E. Märflbauer. 2001. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. Food Addit. Contam. 18: 730–738.
- Czerwiecki, L.; D. Czajkowska, A. Witkowska–Gwiazdowska, 2002b. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and

- ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. *Food Addit. Contam.* 19: 1051–1057.
- Czerwiecki, L.; D. Czajkowska, A. Witkowska–Gwiazdowska. 2002a. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Addit. Contam.* 19: 470–477.
- D'Agostino, P.A.; L.R. Provost, D.R. Drover. 1986. Analysis of trichothecene mycotoxins in human blood by capillary column gas chromatography–ammonia chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 367: 77–86.
- D'Mello, J.P.F.; C.M. Placinta, A.M.C. Macdonald. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 80: 183–205.
- da Motta, S.; L.M. Valente Soares. 2000. A method for the determination of two alternaria toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products. *Brazilian J. Microbiol.* 31: 315–320.
- da Silva, J.B.; C.R. Pozzi, M.A.B. Mallozzi, E.M. Ortega, B. Corrêa. 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ during storage of brazilian sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4352–4356.
- Dalcero, A.; A. Torres, M. Etcheberry, S. Chulze, E. Varsavsky. 1997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinean wheat. *Food Addit. Contam.* 14: 11–14.
- Dall'Asta, C.; G. Galaverna, A. Biancardi, M. Gasparini, S. Sforza, A. Dossena, R. Marchelli. 2004b. Simultaneous liquid chromatography–fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin–3–carbonyl chloride. *J. Chromatogr. A* 1047: 241–247.
- Dall'Asta, C.; J. de Dea Lindner, G. Galaverna, A. Dossena, E. Neviani, R. Marchelli. 2008. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chem* 106: 729–734.
- Dall'Asta, C.; S. Sforza, G. Galaverna, A. Dossena, R. Marchelli. 2004a. Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. *J. Chromatogr. A* 1054: 389–395.
- Dallyn, H. 1978. Effect of substrate. water activity on the growth of certain xerophilic fungi. PhD Thesis. London: Polytechnic of the South Bank London. CNNA.
- Damoglou, A.P.; G.A. Downey, W. Shannon. 1984. The production of ochratoxin A and citrinin in barley. *J. Sc. Food Agric.* 35: 395–400.
- Davey. K.R.; S.H. Lin. D.G. Wood. 1978. The effect of pH on continuous high–temperature/short–time sterilization of liquid foods. *AIChE J.* 24: 537–540.
- Davis, N.D.; J.W. Searcy, U.L. Diener. 1969. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.* 17: 742–744.
- Dawson, R.J. 1991. A global view of the mycotoxin problem. En: *Fungi and Mycotoxins in Stored Products*, ACIAR Proceedings No. 36 of an international conference held at Bangkok, Thailand, 23–26 April 1991. B.P.Champ, E. Highley, A.D. Hocking, J.I. Pitt (Eds.). The Griffin Press Ltd., Netley, Reino Unido. p. 22–28.
- de Girolamo, A.; M. Solfrizzo, C. von Holst, A. Visconti. 2001. Comparison of different extraction and clean–up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize–based food products. *Food Addit. Contam.* 18: 59–67.
- de Groene, E.M.; I.G. Hassing, M.J. Blom, W. Seinen, J. Fink–Gremmels, G.J. Horbach. 1996. Development of human cytochrome P450–expressing cell

- lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Res.* 56: 299–304.
- de Sylos, C.M.; D.B. Rodriguez–Amaya. 1999. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. *Food Addit. Contam.* 16: 71–74.
- Degelmann, P.; M. Becker, M. Herderich, H.U. Humpf. 1999. Determination of ochratoxin A in beer by high–performance liquid chromatography. *Chromatographia* 49: 543–546.
- Demirci, M.; M. Arici, T. Gumus. 2003. Presence of patulin in fruit and fruit juices produced in Turkey. *Ernaehrungs–Umschau* 50: 262–263.
- Derjardins, A.E.; G. Manandhar, R.D. Plattner, C.M. Maragos, K. Shrestha, S.P. McCormick. 2000. Occurrence of *Fusarium Species* and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1377–1383.
- Desjardins, A.E.; T.M. Hohn, S.P. McCormick. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiol. Rev.* 57: 595–604.
- Díaz, G.J.; A.E. Céspedes. 1997. Natural occurrence of zearalenone in feeds and feedstuffs in poultry and pig nutrition in Colombia. *Mycotoxin Res.* 13: 81–87.
- Dickens, F.; H.E.H. Jones. 1961. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *Brit. J. Cancer* 15: 85–100.
- Dirheimer, G.; E.E. Creppy. 1991. Mechanisme of action of ochratoxin A. *IARC Sci. Publ.* 115: 171–186.
- D'Mello, J.P.F.; A.M.C. Macdonald, D. Postel, W.T.P. Dijkma, A. Dujardin, C.M. Placinta. 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 741–751.
- Dombrink–Kurtzman, M.A.; J.A. Blackburn. 2005. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 241–248.
- Domijan, A.M.; M. Peraica, M. Miletić–Medved, A. Lucic, R. Fuchs. 2003. Two different clean–up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine. *J. Chromatogr. B* 798: 317–321.
- Dong, Z.; G. Liu, Z. Dong, Y. Qian, Y. An, J. Miao, Y. Zhen. 1987. Induction of mutagenesis and transformation by the extract of *Alternaria alternata* isolated from grains in Linxian, China. *Carcinogenesis* 8: 989–991.
- Dortant, P.M.; G.W.M. Peters–Volleberg, H. Van Loveren, R.R. Marquardt, G.J.A. Speijers. 2001. Age–related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. *Food Chem. Toxicol.* 39: 55–65.
- Draughon, F.A.; J.C. Ayres. 1980. Insecticide inhibition of growth and patulin production in *Penicillium expansum*, *Penicillium urticae*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, and *Byssosclamyces nivea*. *J. Agric. Food Chem.* 28: 1115–1117.
- Dreher, R.M.; E. Usleber. 1996. Comparison study of a fumonisin enzyme immunoassay and high–performance liquid chromatography. En: *Immunoassays for residue analysis: food safety, proceedings of a symposium, Anaheim, Abril 1995*. R.C. Beier, L.H. Stanker (Eds.). ACS Symposium Series 821. Washington D.C., EEUU. pp. 341–348.
- Drusch, S.; W. Ragab. 2003. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *J. Food Prot.* 66:1514–1527.
- Edel, V.; C. Steinberg, I. Avelange, G. Lagurre, C. Alabouvette. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathol.* 85: 579–585.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2006. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the

- Commission related to ochratoxin A in food. http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1521.Par.0001.File.dat/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en1.pdf
- EHC. 2000. Environmental Health Criteria 219: fumonisin B₁, International Programme on Chemical Safety (IPCS; UNEP, ILO and WHO). W.H.O. Marasas, J.D. Miller, R.T. Riley, A. Visconti (Eds.). WHO, Geneva, Suiza. p. 150.
- Ehlers, D. 1986. HPLC–Bestimmung von patulin in obstsäften–probenaufarbeitung mit einum modifizierten extraktions–und reinigungsverfahren. *Lebensm. Cerichtl. Chem.* 40: 1–5.
- Eisele, T.A.; M.Z. Gibson. 2003. Syringe–cartridge solid–phase extraction method for patulin in apple juice. *J. AOAC Int.* 86: 1160–1163.
- El Banna, A.A.; P.Y. Lau, P.M. Scott. 1983. Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs II – Deoxynivalenol (vomitoxin) during making of Egyptian bread. *J. Food Prot.* 46: 484–486.
- El–Banna, A.A.; P.M. Scott. 1984. Fate of mycotoxins during processing. III. Ochratoxin A during cooking of faba beans (*Vicia faba*) and polished wheat. *J. Food Prot.* 47: 189–192.
- El–Kady, I.A.; S.S.M. El–Maraghy, A.Y. Abdel–Mallek, H.A.H. Hasan. 1993. Effect of four pesticides on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* IMI 89717. *Zentralbl Mikrobiol.* 148: 549–557.
- Elmholt, S. 2002. Ecology of the ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum*: Occurrence in field soil and grain with special attention to farming system and on–farm drying practices. *Biol. Agric. Hort.* 20: 311–337.
- Engel, G. 2000. Ochratoxin A in sweets, oil seeds and dairy products. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51: 98–101.
- Eriksen, G.S.; J. Alexander. 1998. *Fusarium* toxins in cereals – risk assessment. *TemaNord 1998: 502*, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Dinamarca. pp. 23, 28–58.
- Errampalli, D. 2004. Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala. *Crop Prot.* 23: 811–817.
- Errampalli, D. 2006. Postharvest control of blue mold of apples with reduced–risk fungicides together with anti–scald agent diphenylamine under cold and controlled atmosphere storage conditions. *J. Food Agric. Environ.* 4: 43–47.
- Errampalli, D.; N.R. Brubacher, J.R. Deell. 2006. Sensitivity of *Penicillium expansum* to diphenylamine and thiabendazole and postharvest control of blue mold with fludioxonil in ‘McIntosh’ apples. *Postharv. Biol. Technol.* 39: 101–107.
- Errampalli, D.; N. Crnko. 2004. Control of blue mold caused by *Penicillium expansum* on apples ‘Empire’ with fludioxonil and cyprodinil. *Can. J. Plant Pathol.* 26: 70–75.
- Escoula, L. 1977. Moulds in silage and their toxic effect. *Fourrages* 69: 97–114.
- Eskola, M.; A. Rizzo, L. Soupas. 2000. Occurrence and amounts of some *Fusarium* toxins in Finnish cereal Samples in 1998. *Acta Agric. Scand. Sect. B–Soil Plant Sci.* 50: 183–186.
- Eskola, M.; P. Parikka, A. Rizzo. 2001. Trichothecenes, ochratoxin A, and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in Finnish cereal samples in 1998. *Food Addit. Contam.* 18: 707–718.
- Falleiros de Pádua, R.A.; M. Machinski Junior. 2005. Toxicological aspects and occurrence of patulin in apple juice. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 26: 535–542.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1979. Perspective on mycotoxins. Proceedings of the Joint FAO/WHO/UNEP Conference on

- Mycotoxins, Nairobi, Kenya, 1977 (Food and Nutrition Paper 13, MYC 4a) 1979, Roma, Italia.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1996. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper, Roma, Italia, vol. 64, p. 6.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Agriculture Data, Agricultural production.
<http://apps.fao.org/page/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&language=EN&hostname=apps.fao.org&version=default>
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation). 2001a. Ochratoxin A. En: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 47, World Health Organisation, Geneva, Suiza, pp 281–387.
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation). 2001b. Ochratoxin A. En: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 47, World Health Organisation, Geneva, Suiza,
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm>
- Fazekas, B.; A.K. Tar, M. Zomborszky–Kovacs. 2002. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Vet. Hung.* 50: 177–188.
- Filali, A.; A.M. Betbeder, I. Baudrimont, A. Benayada, R. Soulaymani, E.E. Creppy. 2002. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Hum. Exp. Toxicol.* 21: 241–245.
- Filali, A.; L. Ouammi, A.M. Betbeder, I. Baudrimont, R. Soulaymani, A. Benayada, E.E. Creppy. 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Addit. Contam.* 18: 565–568.
- Fliege, R.; M. Metzler. 1999. The mycotoxin patulin induces intra and intermolecular protein crosslinks *in vitro* involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and –amino groups. *Chem. Biol. Interac.* 123: 459–465.
- Florjanowicz, T. 1991. Effect of some fungicides on growth of *Penicillium expansum* and patulin production. *Pestycydy (Warsaw)* 1991(4): 25–30.
- Flynn, T.J.; M.E. Stack, A.L. Troy, S.J. Chirtel. 1997. Assessment of the embryotoxic potential of the total hydrolysis product of FB1 using cultured organogenesis–staged rat embryos. *Food Chem. Toxicol.* 35: 1135–1141.
- Forgacs, J.; W.T. Carll. 1962. Mycotoxicoses. *Adv. Vet. Sci.* 7: 273–382.
- Forsell, J.H.; M. F. Witt, J. H. Tai, R. Jensen, J.J. Pestka. 1986. Effects of 8–week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem. Toxicol.* 24: 213–219.
- Frank, H.K.; R. Orth, A. Figge. 1977. Patulin in foods of plant origin. II. Several kinds of fruit and vegetables and fruit and vegetable products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 163: 111–114.
- Frisvad, J.C.; U. Thrane. 1993. Liquid column chromatography of mycotoxins. En: *Chromatography of Mycotoxins, Techniques and Applications*. V. Betina (Ed.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. p. 253–371.
- Frisvad, J.C.; F. Lund. 1993. Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species. En: *Proceedings of the United Kingdom Workshop on Occurrence and Significance of Mycotoxins*. Slough: Central Science Laboratory. K.A. Scudamore (Ed.). MAFF, pp. 146–171.

- Frisvad, J.C.; J.M. Frank, J.A.M.P. Houbraken, A.F.A. Kuijpers, R.A. Samson. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 50: 23–43.
- Frisvad, J.C.; R.A. Samson. 2000. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 45: 201–207.
- Fukal, L. 1990. A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by radioimmunoassay. *Food Addit. Contam.* 7: 253–258.
- Furlong, E.B.; L.M. Valente Soares. 1995. Gas chromatographic method for quantitation and confirmation of trichothecenes in wheat. *J. AOAC Int.* 78: 386–390.
- Gajecki, M. 2002. Zearalenone–undesirable substances in feed. *Polish J. Vet. Sci.* 5: 117–122.
- Galán Alejo, L.C.; J.J. Rodríguez Jerez. 2003. Diario de la Seguridad Alimentaria <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2003/06/04/6735.php>
- Galtier, P. 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. *Rev. Méd. Vét. Toulouse* 149: 549–554.
- Galvano, F.; A. Piva, A. Ritieni, G. Galvano. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food Prot.* 64: 120–131.
- Garaleviciene, D.; H. Pettersson, M. Agnedal. 2002. Occurrence of trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in cereals and mixed feed from central Lithuania. *Mycotoxin Res.* 18: 77–89.
- García-Gimeno, R.M.; C. Hervás-Martínez, R. Rodríguez-Pérez, G. Zurera-Cosano. 2005. Modelling the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by artificial neural networks. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 317–332.
- García-Gimeno, R.M.; C. Sanz-Martínez, J.M. García-Martos, G. Zurera-Cosano. 2002a. Modeling *Botrytis cinerea* spores growth in carbon dioxide enriched atmospheres. *J. Food Sci.* 67: 1904–1907.
- García-Gimeno, R.M.; C. Hervás-Martínez, M.I. de Silóniz. 2002b. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 19–30.
- Gareis, M. 1999. Contamination of German malting barley and of malt produced from it with the mycotoxins ochratoxin A and B. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 50: 83–87.
- Gareis, M.; J. Wolff. 2000. Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin. *Mycoses* 43 (Suppl. 1): 79–83.
- Gareis, M.; R.C. Schothorst, A. Vidnes, C. Bergsten, B. Paulsen, C. Brera, M. Miraglia. 2003. ‘SCOOP task 3.2.10. Collection of Occurrence Data of *Fusarium* Toxins in Food and Assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member States’. <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>
- Geiser, D.M.; M.A. Klich, J.C. Frisvad, S.W. Peterson, J. Varga, R.A. Samson. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 59: 1–10.
- Gharbi, A.; O. Trillon, A.M. Betbeder, J. Counord, M.F. Gauret, A. Pfohl-Leszkiowicz, G. Dirheimer, E.E. Creppy. 1993. Some effects of ochratoxin A, a mycotoxin contaminating feeds and food, on rat testis. *Toxicol.* 83: 9–18.
- Gilbert, J.; J.R. Startin, C. Crews. 1985. Optimisation of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. *J. Chromatogr.* 319: 376–381.

- Gledhill, L.; A.R. Hesketh, B.W. Bycroft, P.M. Dewick, J. Gilbert. 1991. Biosynthesis of trichothecene mycotoxins: cell-free epoxydation of a trichodiene derivative. *FEMS Microbiol. Lett.* 81: 241–246.
- Gökmen, V.; J. Acar, K. Sarioğlu. 2005. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta* 543: 64–69.
- Gökmen, V.; J. Acar. 1996. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Chromatogr. A* 730: 53–58.
- Gökmen, V.; J. Acar. 1998. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *J. Chromatogr. A* 815: 99–102.
- Gökmen, V.; J. Acar. 1999. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 847: 69–74.
- González, H.H.L.; A. Pacin, S.L. Resnik, E.J. Martínez. 1996. Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia* 135: 129–134.
- González, H.H.L.; E.J. Martínez, A. Pacin, S.L. Resnik. 1999. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. *Mycopathologia* 144: 97–102.
- González-Osnaya, L.; J.M. Soriano, J.C. Moltó, J. Mañes. 2007a. Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. *International J. Food Microbiol.* 118: 87–91.
- González-Osnaya, L.; J.M. Soriano, J.C. Moltó, J. Mañes. 2007b. Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food Addit. Contam.* 24: 1268–1274.
- Gordon, W.C.; L.J. Gordon. 1990. Rapid screening method for deoxynivalenol in agricultural commodities by fluorescent minicolumn. *J. AOAC Int.* 73: 266–270.
- Gqaleni, N.; J.E. Smith, J. Lacey, G. Gettinby. 1997. Effects of temperature, water activity and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1048–1053.
- Grabarkiewicz-Szczesna, J.; M. Kostecki, P. Golinsli, I. Kiecana. 2001. Fusariotoxins in kernels of winter wheat cultivars field samples collected during 1993 in Poland. *Nahrung* 45: 28–30.
- Graniti, A. 1972. The evolution of the toxic concept in plant pathology. En: *Phytotoxins in plant diseases*. R.K. Wood, A. Ballio, A. Graniti (Eds.). Academic Press, New York, EEUU. pp. 1–18.
- Gravesen, S.; P.A. Nielsen, R. Iversen, K.F. Nielsen. 1999. Microfungal contamination of damp buildings—examples of risk constructions and risk materials. *Environ. Health Perspect.* 107 (Suppl. 3): 505–508.
- Greene, D.M.; J. I. Azcona Olivera, J.J. Pestka. 1994. Vomitoxin (deoxynivalenol)-induced IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse: dose response and male predilection. *Toxicol.* 92: 245–260.
- Greenhalgh, R.; G.A. Neish, J.D. Miller. 1983. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 625–629.
- Grove, J.F. 1988. Non-macrocyclic trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.* 5: 187–209.
- Grove, J.F. 2000. Non-macrocyclic trichothecenes. Part 2. *Chem. Org. Nat. Prod.* 69: 1–70.
- Gruber-Schley, S.; A. Thalmann. 1988. Zum Vorkommen von *Alternaria* spp. und deren Toxine in Getreide und mögliche Zusammenhänge mit

- leistungsminderungen landwirtschaftlicher nutziere. Landwirtsch, Forchung 41: 11–29.
- Gumus, T.; M. Arici, M. Demirci. 2004. A Survey of barley, malt and beer contamination with ochratoxin A in Turkey. J. Inst. Brew. 110: 146–149.
- Häggbloom, P. 1982. Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum size. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1205–1207.
- Häggbloom, P.E.; J. Ghosh. 1985. Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels. Appl. Environ. Microbiol. 49: 787–790.
- Haikara, A.; V. Mäkinen, R. Hakulinen. 1977. On the microflora of barley after harvesting, during storage and in malting. Proceedings of the Congress — European Brewery Convention 16th, pp. 35–46.
- Hajmeer, M.; I. Basheer, Y. Najjar. 1997. Computational neural networks for predictive microbiology: II. Application to microbial growth. Int. J. Food Microbiol. 34: 51–66.
- Hardman, J.G.; L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A. Goodman Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill–Interamericana, Vol. 1, México.
- Hardwick, W.A. 1983. En: Beer. H.J. Rehm, G. Reed (Eds.). Biotechnology—a Comprehensive Treatise in 8 Volumes, vol. 5. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Alemania. pp. 165–229.
- Hartung, H.; C. Kinast, U. Kirchheim, G. Eckert, B. Meixner, F. Schoene. 2005. Concentrations of deoxynivalenol (DON) in Thuringer bread and fine bakery products. Mycotox. Res. 21: 89–91.
- Harvey, J.M.; W.L. Smith Jr., J. Kaufman. 1972. Market diseases of stone fruits: cherries, peaches, nectarines, apricots, and plums. USDA Handbook 414: 64.
- Harwig, J.; B.J. Blanchfield, P.M. Scott. 1978. Patulin production by *Penicillium roqueforti* Thom from grape. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 11: 149–151.
- Harwig, J.; P.M. Scott, B.P.C. Kennedy, Y.K. Chen. 1973a. Disappearance of patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces* spp. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6: 45–46.
- Harwig, J.; P.M. Scott, D.R. Stoltz, B.J. Blanchfield. 1979. Toxins of molds from decaying tomato fruit. Appl. Environ. Microbiol. 38: 267–274.
- Harwig, J., Y.K. Chen, B.P.C. Kennedy, P.M. Scott. 1973b. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6: 22–25.
- Hasan, H.A.H. 2000. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. World J. Microbiol. Biotechnol. 16: 607–612.
- Hasan, H.A.H. 1995. *Alternaria* toxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. Mycopathologia 130: 171–177.
- Hatey, F.; P. Gaye. 1978. Inhibition of translation in reticulocyte lysate by the mycotoxin patulin. FEBS Lett. 95: 252–256.
- Hawksworth, D.L.; P.M. Kirk, B.C. Sutton, D.N. Pegler. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8th Ed.). CAB International, Wallingford, Reino Unido. p. 616.
- Hayes, A.W.; T.D. Phillips, W.L. Williams, A. Ciegler. 1979. Acute toxicity of patulin in mice and rats. Toxicol. 13: 91–100.
- Heenan, C.N.; K.J. Shaw, J.I. Pitt. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. J. Food Mycol. 1: 67–72.
- Hennig, A.; J. Fink–Gremmels, L. Leistner. 1991. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic

- activation. IARC Scientific Publications 115 (Mycotoxins, Endem. Nephropathy Urinary Tract Tumours), pp. 255–260.
- Hennigen, M.R.; T. Dick. 1995. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Addit. Contam.* 12: 677–681.
- Hernández, M.J.; M.V. García–Moreno, E. Durán, D. Guillén, C.G. Barroso. 2006. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed–phased high–performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. *Anal. Chim. Acta* 566: 117–121.
- Hesseltine, C.W.; E.E. Vandegrift, D.I. Fennell, M.L. Smith, O.L. Shotwell. 1972. *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia* 64: 539–550.
- Hesseltine, C.W.; O.T. Shotwell, M. Smith, L.I. Ellis, F. Vandegrift, G. Shannon. 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. En: Proceedings of the First US–Japan Conference on Toxic Microorganisms and the US Department of the Interior, Washington, DC, EEUU.
- Hewetson, D.W.; C.J. Mirocha. 1987. Development of mass spectral library of trichothecenes based on positive chemical ionization mass spectra. *J. AOAC Int.* 70: 647–653.
- Hinojo, M.J.; A. Medina, F.M. Valle–Algarra, J.V. Gimeno–Adelantado, M. Jiménez, R. Mateo. 2006. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiol.* 23: 119–127.
- Hocking, A.D. 1997. En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.). ASM Press, Washington, EEUU. pp. 393–405.
- Höhler, D. 1998. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernährungswiss.* 37: 2–12.
- Höhler, D.; K.H. Südekum, S. Wolfram, A.A. Frohlich, R.R. Marquardt. 1999. Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep. *J. Anim. Sci.* 77: 1217–1223.
- Holmberg, T.; A. Breitholtz–Emanuelsson, P. Häggblom, O. Schwan, K. Hult. 1991. *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathologia* 116: 169–176.
- Homdork, S.; H. Fehrmann, R. Beck. 2000. Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium* infected wheat grain. *J. Phytopathol.* 148: 7–15.
- Hope, R.; D. Aldred, N. Magan. 2005. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 295–300.
- Horie, Y. 1995. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho* 36: 73–76.
- Howard, P.C.; L.H. Couch, R.E. Patton, R.M. Eppley, D.R. Doerge, M.L. Churchwell, M.M. Marques, C.V. Okerberg. 2002. Comparison of the cytotoxicity of several fumonisin derivatives in a 28–day feeding study with female B6C3F(1) mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185: 153–165.
- Hsia, C.C.; J.L. Wu, X.Q. Lu, Y.S. Li. 1988. Natural occurrence and clastogenic effects of nivalenol, deoxynivalenol, 3–acetyl–deoxynivalenol, 15–acetyl–deoxynivalenol, and zearalenone in corn from a high–risk area of esophageal cancer. *Cancer Detect. Prev.* 13: 79–86.
- Hsueh, C.; Y. Liu, M.S. Freund. 1999. Indirect electrochemical detection of type–B trichothecene mycotoxins. *Anal. Chem.* 71: 4075–4080.
- Hughes, D.M.; M.J. Gahl, C.H. Graham, S.L. Grieb. 1999. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *J. Anim. Sci.* 77: 693–700.

- Hussein, H.S.; J.M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* 167: 101–134.
- Hyde, M.B.; H.B. Galley. 1951. The subepidermal fungi of cereal grains. II. The nature, identity, and origin of the mycelium in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 38: 348–357.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1986. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Lyon, Francia. 40: 83–98.
- IARC (International Agency for research on Cancer). 1991. Y.Z. Zhen., Y.M. Xu, G.T. Liu, J. Miao, Y.D. Xing, Q.L. Zheng, Y.F. Ma, T. Su, X.L. Wang, L.R. Ruan, J.F. Tian, G. Zhou, S.L. Yang. En: Relevance to Human Cancer of *N*-Nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins. I.K. O'Neil, J. Chen, H. Bartsch. (Eds.). International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, Francia. Vol 56.
- Ichinoe, M., H. Kurata. 1983. Trichothecene-producing fungi. En: Developments in Food Science. IV Trichothecenes – Chemical, biological and toxicological aspects. Y. Ueno (Ed.). Tokyo/Amsterdam: Kodansha/Elsevier. pp. 73–82.
- Iha, M.H.; M. Sabino. 2006. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 89: 139–143.
- IPCS 1990. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. International Program of Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria No. 105. WHO, Ginebra, Suiza.
- Isaac, S.; J.C. Frankland, R. Watling, A.J.S. Whalley. 1993. Aspects of Tropical Mycology. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- ISO Method, 8128–1. 1993. Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice—Determination of patulin content.
- Ito, R.; H. Yamazaki, K. Inoue, Y. Yoshimura, M. Kawaguchi, H. Nakazawa. 2004. Development of liquid chromatography–electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: investigation of its contamination levels in Japan. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7464–7468.
- Järvenpää, E.P.; S.L. Taylor, J.W. King, R. Huopalahti. 1997. The use of supercritical fluid extraction for the determination of 4–deoxynivalenol in grains: the effect of the sample clean-up and analytical methods on quantitative results. *Chromatographia* 46: 33–39.
- JEFCA. 1995. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Forty-fourth meeting. Technical Report Series N° 859, Ginebra, Suiza.
- Jelinek, C.F.; A.E. Pohland, G.E. Wood. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72: 223–230.
- Jiménez, A.M.; A. López de Cerain, E. Gonzalez–Peñas, J. Bello. 2001. Determination of ochratoxin A in pig liver–derived pâtés by high–performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* 18: 559–563.
- Jiménez, M.; A. Logrieco, A. Bottalico. 1993. Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in bananas fruits. *J. Phytopathol.* 137: 214–220.
- Jiménez, M.; J.J. Mateo, R. Mateo. 2000. Determination of type A trichothecenes by high–performance liquid chromatography with coumarin–3–carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 870: 473–481.
- Jiménez, M.; M. Máñez, E. Hernández. 1996. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 417–421.

- Jiménez, M.; R. Mateo, A. Querol, T. Huerta, E. Hernandez. 1991. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia* 115: 121–127.
- Jodlbauer, J.; N.M. Maier, W. Lindner. 2002. Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid–phase extraction. *J. Chromatogr. A* 945: 45–63.
- Jorgensen, K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 15: 550–554.
- Jorgensen, K.; G. Rasmussen, I. Thorup. 1996. Ochratoxin A in danish cereals 1986–1992 and daily intake by the danish population. *Food Addit. Contam.* 13: 95–104.
- Jorgensen, K.; J.S. Jacobsen. 2002. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992–99. *Food Addit. Contam.* 19: 1184–1189.
- Jornet, D.; O. Busto, J. Guasch. 2000. Solid–phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed–phase high–performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 882: 29–35.
- Josefson, E.; A. Andersson. 1976. Analysis of patulin in apple beverages sold in Sweden. *Vår Foda* 28: 189–196.
- Josephs, R.D.; R. Krska, M. Grasserbauer, J.A.C. Broekaert. 1998. Determination of trichothecenes mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high–performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A* 795: 297–304.
- Juan, C.; C.M. Lino, A. Pena, J.C. Moltó, J. Mañes, I. Silveira. 2007. Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. *Talanta* 73: 246–250.
- Juan, C.; J.C. Moltó, C.M. Lino, J. Mañes. 2008. Determination of ochratoxin A in organic and non–organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chem.* 107: 525–530.
- Jung, K.Y.; H. Endou. 1989. Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100: 383–390.
- Kale, S.; J.W. Bennett. 1992. En: *Handbook of Applied Mycology*, vol. 5. D. Bhatnagar, E.B.Lillehoj, D.K. Arora (Eds.). Marcel Dekker, Nueva York, EEUU. cap. 12.
- Kanhere, S.R.; P.M. Scott. 1990. Heptafluorobutyrylation of trichothecenes using a solid–phase catalyst. *J. Chromatogr.* 511: 384–389.
- Kanisawa, M. 1984. Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *Develop. Food Sci.* 7: 245–254.
- Kanisawa, M.; S. Suzuki. 1978. Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann* 69: 599–600.
- Kasali, O.B.; H.B. Schiefer, D.S. Hancock, B.R. Blakley, R.S. Tomar, R. Greenhalgh. 1985. Subacute toxicity of dietary 3–acetyldeoxynivalenol in mice. *Can. J. Comp. Med.* 49: 319–322.
- Katerere, D.R.; S. Stockenström, G. Balducci, G.S. Shephard. 2007. Determination of patulin in apple juice: comparative evaluation of four analytical methods. *J. AOAC Int.* 90: 162–166.
- Kawasaki, Y.; O. Uchida, K. Sekita, K. Matsumoto, T. Ochiai, A. Usui, Y. Nakaji, L. Furoya, Y. Kurokawa, M. Tobe. 1990. Single and repeated oral administration toxicity studies of nivalenol in F344 rats. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 31: 144–154.
- Keblys, M.; A. Flaoyen, W. Langseth. 2000. The occurrence of type A and B trichothecenes in Lithuanian cereals. *Acta Agric. Scand. Sect. B, Soil Plant Sci.* 50: 155–160.

- Khera, K.S.; C. Whalen, G. Angers. 1986. A teratology study on vomitoxin (4-deoxynivalenol) in rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 24: 421–424.
- Khera, K.S.; D.L. Arnold, C. Whalen, G. Angers, P.M. Scott. 1984. Vomitoxin (4-deoxynivalenol): Effects on reproduction of mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 345–356.
- Kientz, C.E.; A. Verweij. 1986. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. *J. Chromatogr.* 355: 229–240.
- Klick, M.A.; J.I. Pitt. 1998. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. En: Commonwealth Scientific and Industrial research organization. Division of food processing (Eds.), Australia.
- Kok, W.T.; T.C.H. van Teer, W.A. Traag, L.G.M.T. Tuinstra. 1986. Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine. *J. Chromatogr.* 367: 231–236.
- Korte, A. 1980. Chromosomal analysis in bone marrow cells of Chinese hamsters after treatment with mycotoxins. *Mutat. Res.* 78: 41–49.
- Kostiainen, R.; A. Rizzo, A. Hesso. 1989. The analysis of trichothecenes in wheat and human plasma samples by chemical ionization tandem mass spectrometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 356–364.
- Kostiainen, R.; A. Rizzo. 1988. The characterization of trichothecenes as their heptafluorobutyrate esters by negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 204: 233–246.
- Kotal, F.; Z. Radová. 2002. A simple method for determination of deoxynivalenol in cereals and flours. *Czech J. Food Sci.* 20: 63–68.
- Kozakiewicz, A.; D. Smith. 1994. Physiology of *Aspergillus*. En: *Aspergillus*. J.E. Smith (Ed.). Biotechnology Handbooks 7. Plenum Press, New York, pp. 23–40.
- Krishnamachari, K.A.V.; R.V. Bhat, V. Nagarajan, T.B.G. Tilak. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in western India. *Lancet* I: 1061–1063.
- Krska, R. 1998. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *J. Chromatogr. A* 815: 49–57.
- Krska, R.; S. Baumgartner, R. Josephs. 2001. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371: 285–299.
- Kuiper-Goodman, T.; P.M. Scott, H. Watanabe. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 7: 253–306.
- Kuiper-Goodman, T.; P.M. Scott, N.F. McEwen, G.A. Lambert, W. Ng. 1996. Approaches to the risk the assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392: 369–393.
- Kuiper-Goodman, T.; P.M. Scott. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179–248.
- Kussak, A.; B. Andersson, K. Andersson. 1993. Automated sample clean-up with solid-phase extraction for the determination of aflatoxins in urine by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 616: 235–241.
- Kussak, A.; B. Andersson, K. Andersson. 1995. Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and Q₁ in urine. *J. Chromatogr. B* 672: 253–259.
- Kusters van Someren, M.A.; R.A. Samson, J. Visser. 1991. The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: Reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. *Curr. Genet.* 19: 21–26.
- Lacey, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *J. Appl. Bacter. Symposium* 18 (Suppl.): 11S–25S.
- Lacey, J.; N. Magan. 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in*

- drying and storage. J. Chelkowski (Ed.). Elsevier, Amsterdam, Holanda. 5: 77–118.
- Lacey, J.; S.T. Hill, M.A. Edwards. 1980. Micro-organisms in stored grains—their enumeration and significance. *Tropical Stored Products Information* 39: 19–33.
- Lai, C.; Y. Fuh, D.Y. Shin. 2000. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. *J. Food Drug Anal.* 8: 85–96.
- Laidou, I.A.; C.C. Thanassoulpopoulos, M. Liakopoulou-Kyriakides. 2001. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens. *J. Phytopathol.* 149: 457–461.
- Langseth, W.; A. Bernhoft, T. Rundberget, B. Kosiak, M. Gareis. 1999. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 144: 103–113.
- Langseth, W.; O. Elen. 1997. The occurrence of deoxynivalenol in Norwegian cereals – Differences between years and districts, 1988–1996. *Acta Agric. Scand. Sect. B–Soil Plant Sci.* 47: 176–184.
- Langseth, W.; P.E. Clasen. 1992. Automation of a clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal–alumina column. *J. Chromatogr.* 603: 290–293.
- Langseth, W.; T. Rundberget. 1998. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J. Chromatogr. A* 815: 103–121.
- Langseth, W.; T. Rundberget. 1999. The occurrence of HT–2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia* 147: 157–165.
- Larsen, T.O.; A. Svendsen, J. Smedsgaard. 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3630–3635.
- Larsen, T.O.; J.C. Frisvad, G. Ravn, T. Skaaning. 1998. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Addit. Contam.* 15: 671–675.
- Lau, B.P.Y.; P.M. Scott, D.A. Lewis, S.R. Kanhere, C. Cléroux, V.A. Roscoe. 2003. Liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *J. Chromatogr. A* 998: 119–131.
- Lauren, D.R.; R. Greenhalgh. 1987. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 70: 479–483.
- Lee, K–S., R.J. Rösenthaller. 1986. DNA–damaging activity of patulin in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1046–1054.
- Lee, K–S.; R.J. Rösenthaller. 1987. Strand scissions of DNA by patulin in the presence of reducing agents and cupric ions. *J. Antibiot.* 40: 692–696.
- Lee, M.G.; O.P. Yuan, L.P. Hart, J.J. Pestka. 2001. Enzyme–linked immunosorbent assays of zearalenone using polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. *Methods Mol. Biol.* 157: 159–170.
- Lee, S.L.; J.W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.). *PCR protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press Inc., San Diego, EEUU. p. 282–286.
- Legarda T.M.; P.A. Burdaspal. 1998. Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países europeos. *Alimentaria* 291: 115–122.
- Legarda T.M.; P.A. Burdaspal. 2001. Presencia de ocratoxina A en muestras de pan comercializado en España y en muestras procedentes de doce países extranjeros. *Alimentaria* 321: 89–96.

- Legarda, T.M.; P.A. Burdaspal. 2005. Patulina en alimentos infantiles a base de manzana comercializados en España y otros países europeos, usando un método de análisis adecuado para su determinación a niveles inferiores a 10 µg/Kg. *Alimentaria* 368: 69–79.
- Leggott, N.L.; G.S. Shephard, S. Stockenström, E. Staal, D.J. van Schalkwyk. 2001. The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. *Food Addit. Contam.* 18: 825–829.
- Leggott, N.L.; G.S. Shephard. 2001. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control* 12: 73–76.
- Leistner, L.; C. Eckardt. 1979. Occurrence of toxinogenic *Penicillia* in meat products. *Fleischwirtschaft* 59: 1892–1896.
- Leong, S.L.; A.D. Hocking, E.S. Scott. 2006. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 209–216.
- Lewis, L.; M. Onsongo, H. Njapau, H. Schurz–Rogers, G. Lubber, S. Kieszak, J. Nyamongo, L. Backer, A.M. Dahiye, A. Misore, K. DeCock, C. Rubin., Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ. Health Persp.* 113: 1763–1767.
- Li, F.Q.; X.Y. Luo, T. Yoshizawa. 1999. Mycotoxins (trichothecenes, zearalenone and fumonisins) in cereals associated with human red–mold intoxications stored since 1989 and 1991 in China. *Nat. Toxins* 7: 93–97.
- Li, H.X.; C.L. Xiao. 2008. Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. *Postharv. Biol. Technol.* 47: 239–245.
- Li, J–K.; R–N. Wu, Q–H. Hu, J–H. Wang. 2007. Solid–phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food control* 18: 530–534.
- Lillehøj, E.B. 1991. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.). CRC Press, Boca Raton. cap. 1.
- Lillehøj, E.B.; C.W. Hesseltine. 1977. En: *Mycotoxins in Humans and Health*. J.W. Rodricks, C.W. Hesseltine, M.A. Hehlman (Eds.). Pathotox, Park Forest. IL, EEUU.
- Lillehøj, E.B.; F. Elling. 1983. Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agr. Scand.* 33: 113–128.
- Lin, L–C.; F.C. Chen, Y.M. Fu, D.Y.C. Shih. 2005. Ochratoxin A contamination in coffees, cereals, red wines and beers in Taiwan. *J. Food Drug Anal.* 13: 84–92.
- Lin, L.M.; J. Zhang, K. Sui, W.B. Sung. 1993. Simultaneous thin layer chromatographic determination of zearalenone and patulin in maize. *J. Planar Chromatography–Modern TLC* 6: 274–277.
- Lindenmeier, M.; P. Schieberle, M. Rychlik. 2004. Quantification of ochratoxin A in foods by a stable isotope dilution assay using high–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1023: 57–66.
- Llorens, A.; R. Mateo, M.J. Hinojo, A. Logrieco, M. Jiménez. 2004a. Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *System. Appl. Microbiol.* 27: 253–260.
- Llorens, A.; R. Mateo, M.J. Hinojo, F.M. Valle–Algarra, M. Jimenez. 2004b. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 43–54.
- Llovera, M.; M. Balcells, M. Torres, R. Canela. 2005. Parallel synthesis: A new approach for developing analytical internal standards. Application to the

- analysis of patulin by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6643–6648.
- Logrieco, A.; A. Bottalico, A. Visconti, M. Vurro. 1988. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in some plant products. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 6: 13–17.
- Logrieco, A.; G. Stea, F. Battilani, G. Mulè. 2002. AFLP and sequence analyses of different ochratoxin producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* from grape in Europe. En: Proceedings of the 6th European Conference on Fungal Genetics. G. Vannacci, S. Sarrocco (Eds.). Pisa, Italy. p. 426.
- Lombaert, G.A.; P. Pellaers, V. Roscoe, M. Mankotia, R. Neil, P.M. Scott. 2003. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit. Contam.* 20: 494–504.
- Lopez de Cerain, A.; E. González–Peñas, A.M. Jiménez, J. Bello. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Addit. Contam.* 19: 1058–1064.
- Lopez–Díaz, T.M.; B. Flannigan. 1997. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 35: 129–136.
- Lou, W.; S. Nakai. 2001a. Artificial neural network based predictive model for bacterial growth in a simulated medium of modified–atmosphere–packed cooked meat products. *J. Agr. Food Chem.* 49: 1799–1804.
- Lou, W.; S. Nakai. 2001b. Application of artificial neural network for predicting thermal inactivation of bacteria: A combined effect of temperature, pH and water activity. *Food Res. Int.* 34: 573–579.
- Lovett, J.; B. Boutin, R.G. Thompson. 1974. Patulin production in cherry by *Penicillium* and *Aspergillus* species. *J. Milk Food Technol.* 37: 530.
- Lovett, J.; J.T. Peeler. 1973. Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. *J. Food Sci.* 38: 1094–1095.
- Luo, Y. 1988. *Fusarium* toxins contamination of cereals in China. En: Proceedings of the 7th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokio, agosto de 1988. K. Aibara, S. Kumagai, K. Ohtsubo, T. Yoshizawa (Eds.). Japanese Association of Mycotoxicology, Tokio, Japón. pp. 97–98.
- Lusky, K.; D. Tesch, R. Göbel, K.D. Doberschütz. 1994. Ochratoxin A. Residue behaviour in the pig and in food prepared from it. *Fleischwirtschaft* 74: 558–560.
- MacDonald, S.; M. Long, J. Gilbert, I. Filgueiras. 2000. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *J AOAC Int.* 83: 1387–1394.
- MacDonald, S.; P. Wilson, K. Barnes, A. Damant, R. Massey, E. Mortby, M.J. Shepherd. 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Addit. Contam.* 16: 253–260.
- MacDonald, S.; T.J. Prickett, K.B. Wildey, D. Chan. 2004. Survey of ochratoxin A and deoxynivalenol in stored grains from the 1999 harvest in the UK. *Food Addit. Contam.* 21: 172–181.
- Madhyastha, S.M.; R.R. Marquardt, A.A. Frohlich, G. Platford, D. Abramson. 1990. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J. Agr. Food Chem.* 38: 1506–1510.
- Magan, N.; J. Lacey. 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions Brit. Mycol. Soc.* 82: 83–93.
- Magan, R.; R. Hope, A. Collete, E.S. Baxter. 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 685–690.

- Mahfoud, R.; M. Maresca, N. Garmy, J. Fantini. 2002. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18: 209–218.
- Maier, N.M.; G. Buttinger, S. Welhartizki, E. Gavioli, W. Lindner. 2004. Molecularly imprinted polymer–assisted sample clean–up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. *J. Chromatogr. B* 804: 103–111.
- Majerus, P.; H. Bresch, H. Otteneder. 2000. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51: 95–97.
- Majerus, P.; K. Kapp. 2002. Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.8. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Brussels: SCOOP Report. http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.8_en.pdf
- Malone, B.R.; C.W. Humphrey, K.D. Fleetwood, T. Romer. 1998. Rapid low–solvent methods for patulin in apple juice and apple juice concentrate. *Mycotox*, Toulouse, Francia.
- Mannon, J.; E. Johnson. 1985. Fungi down on the farm. *New Sci.* 105: 12–16.
- Mantle, P.G.; A.M. Chow. 2000. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 105–109.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 2007a. La alimentación en España. <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/libro/capitulo07.htm>
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 2007b. Anuario de estadística agroalimentaria, 2006. Secretaría General Técnica, Madrid, España.
- Maragos, C.M.; R.D. Plattner. 2002. Rapid fluorescence polarization immunoassay for the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1827–1832.
- Marasas, W.F.O.; P.E. Nelson, T.A. Toussoun. 1984. Toxigenic *Fusarium* species. University Park, PA, Pennsylvania, EEUU University Press.
- Marín, S.; N. Bellí, S. Lasram, S. Chebil, A.J. Ramos, A. Ghorbel, V. Sanchis. 2006. Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. *J. Food Sci.* 71: M196–M200.
- Marks, H.S. 2007. Rapid gas chromatography/mass spectrometry determination and confirmation of patulin in apple juice. *J. AOAC Int.* 90: 879–883.
- Marr, J.S.; C.D. Malloy. 1996. An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus* (Springfield, Ill, EEUU.) 12: 7–24.
- Martins, M.L.; A. Gimeno, H.M. Martins, F. Bernardo. 2002. Co–occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit. Contam.* 19: 568–574.
- Martins, M.L.; H.M. Martins. 2001. Determination of deoxynivalenol in Wheat–based breakfast cereals marketed in Portugal. *J. Food Prot.* 64: 1848–1850.
- Mateo, J.J.; A. Llorens, R. Mateo, M. Jiménez. 2001. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *J. Chromatogr. A* 918: 99–112.
- Mateo, R.; Á. Medina, E.M. Mateo, F. Mateo M. Jiménez. 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 79–83.
- Mateo, R.; A. Medina, J.V. Gimeno–Adelantado, M. Jiménez. 2004. An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. En: *Advances on the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Europe.* A. Visconti, A. Logrieco (Eds.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Holanda. pp. 219–235.

- Matossian, M.K. 1982. Ergot and the Salem witchcraft affair. *Am. Scientist* 70: 355–357.
- Matrella, R.; L. Monaci, M.A. Milillo, F. Palmisano, M.G. Tantillo. 2006. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control* 17: 114–117.
- Mayer, V.W.; M.S. Legaror. 1969. Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin. *J. Agric. Food Chem.* 17: 454–456.
- Mayura, K.; J.F. Edwards, E.A. Maull, T.D. Phillips. 1989. The effects of ochratoxin A on postimplantation rat embryos in culture. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 411–415.
- McCallum, J.L.; R. Tsao, T. Zhou. 2002. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.* 65: 1937–1942.
- McElroy, L.J.; C.M. Weiss. 1993. The production of polyclonal, antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate. *Can. J. Microbiol.* 39: 861–863.
- McKinley, E.R.; W.W. Carlton, G.D. Boon. 1982. Patulin mycotoxicosis in the rat: toxicology, pathology, and clinical pathology. *Food Chem. Toxicol.* 20: 289–300.
- McKinley, E.R.; W.W. Carlton. 1980a. Patulin mycotoxicosis in the Swiss ICR mice. *Food Cosmet. Toxicol.* 18: 181–187.
- McKinley, E.R.; W.W. Carlton. 1980b. Patulin mycotoxicosis in the Syrian hamster. *Food Cosmet. Toxicol.* 18: 173–179.
- McMullen, M.; R. Jones, D. Gallenberg. 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81: 1340–1348.
- Medina, A.; F.M. Valle Algarra, J.V. Gimeno Adelantado, R. Mateo, F. Mateo, M. Jiménez. 2006a. A new method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *J Chromatogr A.* 1121: 178–183.
- Medina, A.; F.M. Valle-Algarra, R. Mateo, J.V. Gimeno-Adelantado, F. Mateo, M. Jiménez. 2006b. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Food Microbiol.* 108:196–203.
- Medina, A.; G. González, J.M. Sáez, R. Mateo, M. Jiménez. 2004. Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin a production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 261–267.
- Medina, A.; M. Jiménez, J.V. Gimeno-Adelantado, F.M. Valle-Algarra, R. Mateo. 2005b. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *J. Chromatogr. A* 1083: 7–13.
- Medina, A.; R. Mateo, L. López-Ocaña, F.M. Valle-Algarra, M. Jiménez. 2005a. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4696–4702.
- Mégmégnaeu, B.; F. Debets, R.F. Hoekstra. 1993. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 23: 323–329.
- Miedaner, T.; J. Perkowski. 1996. Correlations among *Fusarium culmorum* head blight resistance, fungal colonization and mycotoxin contents in winter rye. *Plant Breeding* 115: 347–351.
- Miller, J.C.; J.N. Miller. 1993. En: *Estadística para Química Analítica*. E. Horwood (Ed.). Addison-Wesley Iberoamerican, Wilmington, Delaware, EEUU. p. 99.
- Miller, J.D. 1994. En: *Mycotoxins in Grain, Compounds other than Aflatoxins*. J.D. Miller, H.L. Trenholm (Eds.). Eagan Press, St. Paul, MN, EEUU. pp. 19–36.

- Miller, J.D. 1995. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J. Stored Prod. Res.* 31: 1–16.
- Miller, N.; C. Miller. 2000. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4ª Ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, EEUU.
- Mirete, S.; B. Patiño, C. Vázquez, M. Jiménez, M.J. Hinojo, C. Sodevilla, M.T. González-Jaén. 2003. Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 213–221.
- Mirocha, C.J.; E. Kolaczowski, W. Xie, H. Yu, H. Jelen. 1998. Analysis of deoxynivalenol and its derivatives (batch and single kernel) using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1414–1418.
- Mitchell, D.; R. Parra, D. Aldred, N. Magan. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.* 97: 439–445.
- Miura, S.; K. Hasumi, A. Endo. 1993. Inhibition of protein prenylation by patulin. *FEBS Lett.* 318:88–90.
- Moake, M.M.; O.I. Padilla-Zakour, R.W. Worobo. 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 4: 8–21.
- Moir, J.C. 1955. The history and present day use of ergot. *Can. Med. Assoc. J.* 72: 727–734.
- Möller, T.E.; H. Gustavsson. 1992. Determination of type A and B trichothecenes in cereals by gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.* 75: 1049–1053.
- Moltó, G.; M.M. Samar, S. Resnik, E.J. Martínez, A. Pacin. 2000. Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer. A preliminary exposure assessment. *Food Addit. Contam.* 17: 809–813.
- Mongi, J. 1987. Segunda conferencia internacional conjunta FAO/WHO/PNUMA sobre micotoxinas. Tailandia.
- Montemurro, N.; A. Visconti. 1992. *Alternaria* metabolites, chemical and biological data. En: *Alternaria: Biology, plant diseases and metabolites*. J. Chelkowski, A. Visconti (Eds.). Elsevier, Amsterdam, Holanda. pp. 449–557.
- Morales, H.; S. Marín, A. Rovira, A.J. Ramos, V. Sanchis. 2007. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. *Letts. Appl. Microbiol.* 44: 30–35.
- Morales, H.; S. Marín, L. Obea, B. Patiño, M. Doménech, A.J. Ramos, V. Sanchis. 2008a. Ecophysiological characterization of *Penicillium expansum* population in Lleida (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 122: 243–252.
- Morales, H.; V. Sanchis, J. Coromines, A.J. Ramos, S. Marín. 2008b. Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiol.* 25: 378–385.
- Moreno-Contreras, M.C.; A.J. Martínez-Yepaz, R. Raybaudi-Martínez. 2000. Determinación de deoxinivalenol (DON) en trigo, cebada y maíz y su relación con los niveles de mohos totales, *Fusarium* spp., porcentaje de colonización y actividad de agua. *Arch. Latinoam. Nutr.* 50: 183–186.
- Moss M.O. 1991a. Economic importance of mycotoxin-recent incidence. *Int. Biodegr.* 27: 195–204.
- Moss M.O. 1991b. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.). CRC Press, Boca Ratón. cap. 2.
- Moss, M.O. 1996a. Mycotoxins. *Mycol. Res.* 100: 513–523.
- Moss, M.O. 1996b. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13 (Suppl.): 5–9.
- Moss, M.O.; M.T. Long. 2002. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Addit. Contam.* 19: 387–399.
- Mossoba, M.M.; S. Adams, J.A.G. Roach, M.W. Trucksess. 1996. Analysis of trichothecene mycotoxins in contaminated grains by gas

- chromatography/matrix isolation/Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 79: 1116–1123.
- Moule, Y.; F. Hately. 1977. Mechanism of the *in vitro* inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *Byssoschlamys nivea*. *FEBS Lett.* 74: 121–125.
- Müller, H.M.; J. Reimann, U. Schumacher, K. Schwadorf. 1997. Occurrence of *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area of southwest Germany. *Mycopathologia* 137: 185–192.
- Murillo-Arbizu, M.; S. Amézqueta, E. González-Peñas, A. López de Cerain. 2009. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Control* 113: 420–423.
- Murphy, P.A.; K. Miller, E.C. Hopmans, S. Hendrich. 1995. Can fumonisins be detoxified?. En: *Toxicants in Food*. T. Bidlack, S.T. Omaye (Eds.). Technomic Publishing, Lancaster, PA. 1: 105–117.
- Murray, P.; W. Drew, G. Kobayashi, J. Thompson. 1992. *Microbiología médica*. Mosby Year Book, Londres, Reino Unido.
- Nakajima, M.; H. Tsubouchi, M. Miyabe. 1999. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beer in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 82: 897–902.
- Neira, M.S.; A. Pacin, E.J. Martínez, G. Moltó, S.L. Resnik. 1997. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 21–27.
- Nelson, P.E.; M.C. Dignani, E.J. Anaissie. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 479–504.
- Nelson, P.E.; T.A. Toussoun, R.J. Cook (Eds.). 1981. *Fusarium: disease, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, EEUU.
- Nelson, P.E.; T.A. Toussoun, W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. University Press, University Park, Pennsylvania, EEUU.
- Nielsen, K.F.; U. Thrane. 2001. Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 929: 75–87.
- Nordic Council of Ministers. 1998. *Fusarium* toxins in cereals – a risk assessment. *TemaNord* 1998: 502.
- Norred, W.P.; K.A. Voss, R.T. Riley, F.I. Meredith, C.W. Bacon, A.H. Merrill Jr. 1998. Mycotoxins and health hazards: toxicological aspects and mechanism of action of fumonisins. *Toxicol. Sci.* 23: 160–164.
- Norstadt, F.A.; T.M. McCalla. 1963. Phytotoxic substance from a species of *Penicillium*. *Science* 140: 410–411.
- Norstadt, F.A.; T.M. McCalla. 1968. Microbiological population in stubblefield mulched soil. *Soil Sci.* 107: 188.
- Northolt, M.D.; H.P. van Egmond, W.E. Paulsch. 1979. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.* 42: 485–490.
- Northolt, M.D.; L.B. Bullerman. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Protect.* 45: 519–526.
- NTP (Nacional Toxicology Program). 1989. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No. 303–47–9) in F344/N rats (gavage studies). NIH Publication No. 88–2813. G. Boorman (Ed.). U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health, Research, Triangle Park, NC, EEUU.
- NTP (Nacional Toxicology Program). 1999. NTP technical report on the Toxicology and Carcinogenesis studies of fumonisin B₁ (CAS No. 116355–83–0) in

- F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed studies). NTP 498 TR 496, NIH Publication No. 99-3955, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, Triangle Park, NC, EEUU. pp. 1-46.
- O'Brien, E.; D. Dietrich. 2005. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit. Rev. Toxicol.* 35: 33-60.
- Olsen, M.; N. Jonsson, N. Magan, J. Banks, C. Fanelli, A. Rizzo, A. Haikara, A. Dobson, J. Frisvad, S. Holmes, J. Olkku, S.J. Persson, T. Börjesson. 2006. Prevention of ochratoxin A in cereals in Europe. *Adv. Exp. Med. Biol.* 571 (Advances in Food Mycology): 317-342.
- Olsson, J.; T. Börjesson, T. Lundstedt, J. Schnürer. 2002. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 203-214.
- Onji, Y. 1990. Metabolism and toxicities of nivalenol (mycotoxin). II. Absorption, metabolism, excretion, and toxicities of nivalenol in rats. *Nara Igaku Zasshi* 41: 335-343.
- Onji, Y.; Y. Aoki, N. Tani, K. Umabayashi, Y. Kitada, Y. Dohi. 1998. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 815: 59-65.
- Onji, Y.; Y. Dohi, Y. Aoki, T. Moriyama, H. Nagami, M. Uno. 1989. Deepoxynivalenol: a new metabolite of nivalenol found in the excreta of orally administered rats. *J. Agric. Food Chem.* 37: 478-481.
- Osborne, B.G.; F.I. Ibe, G.L. Brown, F. Patagine, K.A. Scudamore, J.N. Banks, M.T. Hetmanski. 1996. The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13: 141-153.
- Ospital, M.; J.M. Cazabeil, A.M. Befbeder, C. Tricard, E.E. Creppy, B. Medina. 1998. Ochratoxin A in wines. *Rev. Fr. Oenol.* 169: 16-18.
- Oswald, H.; H.K. Frank, D. Komitowski, H. Winter. 1978. Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Food Cosmet. Toxicol.* 16: 243-247.
- Ough, C.S.; C.A. Corison. 1980. Measurement of patulin in grapes and wines. *J. Food Sci.* 45: 476-478.
- Özçelik, N.; A. Kosar, D. Soysal. 2001. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol. Lett.* 121: 9-13.
- Ozcelik, S.; N. Ozcelik, L.R. Beuchat. 1990. Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 187-194.
- Pacin, A.; S.L. Resnik, M.S. Neira, G. Moltó, E.J. Martínez. 1997. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. *Food Addit. Contam.* 14: 327-331.
- Pacin, A. 1992. Las micotoxinas como factor de riesgo en la salud humana. En: *Memorias Seminario Internacional sobre Micotoxinas. Asociacion Colombiana de Postcosecha de Granos, Santafe de Bogotá, Colombia, abril 1991. IDEMA, pp. 87-108.*
- Palermo, D.; P. Pietrobono, C. Palermo, T. Rotunno. 2002. Occurrence of ochratoxin A in cereals from Puglia (Italy). *Ital. J. Food Sci.* 14: 447-453.
- Papachristou, A.; P. Markaki. 2004. Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* 21: 85-92.
- Pardo, E.; M. Malet, S. Marin, V. Sanchis, A.J. Ramos. 2006. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxinogenic

- Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. Int. J. Food Microbiol. 106: 25–31.
- Pardo, E.; S. Marín, V. Sanchis, A.J. Ramos. 2004. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. Int. J. Food Microbiol. 95: 79–88.
- Park, J.J.; F.S. Chu, S. Fun. 1996. Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. J. AOAC Int. 79: 465–471.
- Park, J.W.; S.Y. Choi, H.J. Hwang, Y.B. Kim. 2005. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished ricedestined for humans. Int. J. Food Microbiol. 103: 305–314.
- Pascale, M.; A. de Girolamo, A. Visconti, D. Pancaldi. 2000. Indagine sulla presenza di deossinivalenolo in cereali prodotti in alcune aree del Nord Italia nel 1998. Informatore Agrario 10: 68–73.
- Pascale, M.; D. Pancaldi, A. Visconti, G. Perrone, A. Bottalico. 2001. *Fusarium* ear blight, deoxynivalenol and toxigenic *Fusarium* species in selected wheat cultivars assayed all over Italy, in 2000. En: Proceedings of 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 17–20 Septiembre 2001, Evora, Portugal, pp 123–125.
- Paster, N.; D. Huppert, R. Barkai–Golan. 1995. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. Food Addit. Contam. 12: 51–58.
- Paster, N.; N. Lisker, I. Chet. 1983. Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm grown under controlled atmospheres. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1136–1139.
- Patel, S.; C.M. Hazel, A.G.M. Winterton, E. Mortby. 1996. Survey of ethnic foods for mycotoxins. Food Addit. Contam. 13: 833–841.
- Pemberton, A.D.; T.J. Simpson. 1991. En: Mycotoxins and Animal Foods. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.). CRC Press, Boca Ratón. cap. 35.
- Penrose, L.J.; W. Koffmann, H.I. Ridings. 1989. Factors affecting the efficacy of post–harvest fungicide applications for the control of blue mold (*Penicillium expansum*) in stored apples. Plant Pathol. 38: 421–426.
- Peraica, M.; B. Ralic, A. Lucic, M. Pavlovic. 1999. Efectos toxicos de las micotoxinas en el ser humano. Bull. World Health Organ. 77: 754–766.
- Pérez Zúñiga, F.J. 1985. Postharvest control of *Penicillium expansum* on Golden Delicious and Belleza de Roma apples by kasugamycin. Alimentaria 22(162): 71–76.
- Perkowski, J.; I. Kiecana, U. Schumacher, H.M. Müller, J. Chelkowski, P. Golinski. 1997. Head infection and accumulation of *Fusarium* toxins in kernels of 12 barley genotypes inoculated with *Fusarium graminearum* isolates of two chemotypes. Eur. J. Plant Pathol. 103: 85–90.
- Pestka, J.J.; A.T. Smolinski. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. J. Toxicol. Environ. Health, Part B: Crit. Rev. 8: 39–69.
- Pestka, J.J.; J.H. Tai, M.F. Witt, D.E. Dixon, J.H. Forsell. 1987. Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. Food Chem. Toxicol. 25: 297–304.
- Pestka, J.J.; J.S. Bondy. 1990. Alterations of immune function following dietary mycotoxin exposure. Can. J. Physiol. Pharmacol. 68: 1009–1016.
- Peterson, S.W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: Classification of *Penicillium* and *Aspergillus*: integration of modern taxonomic methods. R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.). Harwood publishers, Reading, Reino Unido. pp. 323–356.

- Petzinger, E.; A. Weidenbach. 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livest. Prod. Sci.* 76: 245–250.
- Petzinger, E.; K. Ziegler. 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 23: 91–98.
- Pfeiffer, E.; K. Gross, M. Metzler. 1998. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis* 19: 1313–1318.
- Pfohl–Leszkowicz, A.; E. Pinelli, H. Bartsch, U. Mohr, M. Castegnaro. 1998. Sex– and strain–specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A–induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Mol. Carcinog.* 23: 76–85.
- Phillips, T.D.; W. Hayes. 1977. Effects of patulin on adenosine triphosphatase activities in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 42: 175–187.
- Phillips, T.D.; W. Hayes. 1978. Effects of patulin on the kinetics of substrate and cationic ligand activation of adenosine triphosphatase in mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 606–616.
- Piemontese, L.; M. Solfrizzo, A. Visconti. 2005. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Addit. Contam.* 22: 437–442.
- Pierard, J.Y.; C. Depasse, A. Delafortrie, J.C. Motte. 2004. Multi–mycotoxin determination methodology. En: Meeting the mycotoxin menace. D. Barug, H. van Egmond, R. Lopez–Garcia, T. van Osenbruggen, A. Visconti (Eds.). Wageningen Academic Publishers, Holanda. pp. 255–268.
- Pierson, C.F.; M.J. Ceponis, L.P. McColloch. 1971. Market diseases of apples, pears, and quinces. *Agric. Handbook* 376: 14–16.
- Pitt, J.I. 1985. A laboratory guide to common *Penicillium* species. En: Commonwealth Scientific and Industrial research organization. CSIRO, Division of Food Processing, Canberra, Australia.
- Pitt, J.I. 1991. A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO, Division of Food Processing. Canberra, Australia.
- Pitt, J.I., A.D. Hocking. 1985. Fungi and spoilage. Academic Press. Sydney, Australia.
- Pitt, J.I.; A.D. Hocking. 1997. Fungi and food Spoilage. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
- Pitt, J.I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 266–269.
- Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an updated review. *Rev. Méd. Vét. Toulouse* 149: 479–492.
- Placinta, C.M.; A.M.C. Macdonald, J.B.F. D’Mello, R. Harling. 1996. The influence of carbendazim on mycotoxin production in *Fusarium sporotrichioides*. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference 1996: Pests and Diseases. British Crop Protection Council, Farnham, Reino Unido. pp. 415–416.
- Placinta, C.M.; J.P.F. D’Mello, A.M.C. Macdonald. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* 78: 21–37.
- Pohland, A.E.; S. Nesheim, L. Friedman. 1992. Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.* 64: 1029–1046.
- Prelusky, D.B.; B.A. Rotter, R.G. Rotter, 1994. En: Mycotoxins in grain, compounds other than aflatoxins. J.D. Miller, H.L. Trenholm (Eds.). Eagan Press, St Paul, Minn, EEUU. p. 359.
- Prieta, J.; M.A. Moreno, S. Diaz, G. Suarez, L. Dominguez. 1994. Survey of patulin in apple juice and children’s apple food by diphasic dialysis membrane procedure. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1701–1703.

- Prom, L.K.; R.D. Horsley, B.J. Steffenson, P.B. Schwarz. 1999. Development of *Fusarium* Head Blight and accumulation of deoxynivalenol in barley sampled at different growth stages. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57: 60–63.
- Question N° EFSA-Q–2005–154, 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. Adopted on 4 abril 2006 http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1521.Par.0001.File.dat/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en1.pdf
- Quiroga, N.; S.L. Resnik, A. Pacin, E.J. Martínez, A. Pagano, I. Riccobene, S. Neira. 1995. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. *Food Control* 6: 201–204.
- Radic, B.; R. Fuchs, M. Peraica, A. Lucis. 1997. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol. Lett.* 91: 105–109.
- Radová, Z.; K. Holadová, J. Hajšlová. 1998. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J. Chromatogr. A* 829: 259–267.
- Rajakylä, E.; K. Laasasenaho, P.J.D. Sakkars. 1987. Determination of mycotoxins in grain by high-performance liquid chromatography and thermospray liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 384: 391–402.
- Ramirez, M.L.; S. Chulze, N. Magan. 2006 Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 291–296.
- Ramos, A.J.; N. Labernia, S. Marín, V. Sanchis, N. Magan. 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 133–140.
- Razzazi-Fazeli, E.; J. Böhm, W. Luf. 1999. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography–mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *J. Chromatogr. A* 854: 45–55.
- Recomendación (CE) n° 576/2006 de la Comisión de 17 de agosto de 2006, sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T–2 y HT–2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 23/08/2006. L 229 p. 7.
- Reglamento (CE) n° 257/2002 de la Comisión de 12 de febrero de 2002, que modifica el Reglamento (CE) n° 194/97 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, y el Reglamento (CE) n° 466/2001, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios *Diario Oficial de la Unión Europea* de 13/02/2002. L 41 p. 12.
- Reglamento (CE) n° 1425/2003 de la Comisión de 11 de agosto de 2003 que modifica el Reglamento (CE) n° 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 12/8/2003. L 203 p. 1.
- Reglamento (CE) n° 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 9/03/2006. L 70 p. 12.
- Reglamento (CE) n° 455/2004 de la Comisión de 11 de marzo de 2004 que modifica el Reglamento (CE) n° 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 12/3/2004. L 74 p.11.

- Reglamento (CE) nº 856/2005 de la Comisión de 6 de junio de 2005 que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea de 7/6/2005. L 143 p. 3.
- Reglamento nº 472/2002 de la Comisión, de 12 de marzo de 2002, que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea de 16/03/2002. L 75 p. 18.
- Reinsch, M.; A. Töpfer, A. Lehmann, I. Nehls, U. Panne. 2007. Determination of ochratoxin A in beer by LC–MS/MS ion trap detection. *Food Chem.* 100: 312–317.
- Reiss, J. 1972. Nachweis von patulin in spontan verschimmeltem brot und gebäck. *Naturwissenschaften* 59: 37.
- Reiss, J. 1976. Prevention of the formation of mycotoxins in whole wheat bread by citric acid and lactic acid (mycotoxins in foodstuffs IX). *Experientia* 32:168–169.
- Reiss, J. 1977. Inhibition of urease by the mycotoxin patulin. *Naturwissenschaften* 64: 97.
- Ren, Y.; Y. Zhang, S. Shao, Z. Cai, L. Feng, H. Pan, Z. Wang. 2007. Simultaneous determination of multi–component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra–performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1143: 48–64.
- Rheeder, J.P.; F.O. Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, D.J. Van-Schalkwyk. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. *Pathophysiology* 82: 353–357.
- Rice, S.L.; L.R. Beuchat, R.E. Worthington. 1977. Patulin production by *Byssoschlamys* spp. in fruit juices. *App. Environ. Microbiol.* 34: 791–796.
- Riley, R.T.; J.L. Showker. 1991. The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109: 108–126.
- Ritieni, A. 2003. Patulin in Italian commercial apple products. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6086–6090.
- Rizzo, A.; M. Eskola, M. Atroshi. 2002. Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 631–637.
- Robbana–Barnat, T.; C. Lafarge Frayssinet, H. Cohen, G.A. Neish, C. Frayssinet. 1988. Immunosuppressive properties of deoxynivalenol. *Toxicol.* 48: 155–166.
- Robinson, T. 1981. *The biochemistry of alkaloids*. 2ª Ed. Springer, Nueva York, EEUU.
- Roland, J.O., L.R. Beuchat. 1984a. Biomass and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂, and temperature. *J. Food Sci.* 49: 402–406.
- Roland, J.O.; L.R. Beuchat. 1984b. Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 205–207.
- Roll, R.; G. Matthiaschk, A. Korte. 1990. Embryotoxicity and mutagenicity of mycotoxins. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10: 1–7.
- Romano, M.L.; M.L. Gullino, A. Garibaldi. 1983. Evaluation of the sensitivity to several fungicides of post–harvest apple pathogens in northwestern Italy. *Universiteit Gent* 48: 591–602.
- Röschenthaler, R.; E.E. Creppy, H. Dreismann., G. Dirheimer. 1984. Ochratoxin A on the mechanism of action. *Dev. Food Sci.* 7 (Toxicogenic Fungi): 255–264.

- Rosenberger, D.A. 2003. Control of *Penicillium expansum* during apple harvest and storage. En: Patulin technical symposium. Feb 18–19, 2003; Kissimmee, Fla. National Center for Food safety and Technology; Summit, Ill, EEUU.
- Rosenberger, D.A.; D.T. Wicklow, V.A. Korjagin, S.M. Rondinaro. 1991. Pathogenicity and benzimidazole resistance to *Penicillium* species recovered from flotation tanks in apple packinghouses. *Plant Dis.* 75: 712–715.
- Rosenberger, D.A.; F.W. Meyer. 1979. Benomyl-tolerant *Penicillium expansum* in apple packinghouses in eastern New York. *Plant Dis. Rep.* 63: 37–40.
- Rosenberger, D.A.; F.W. Meyer. 1985. Negatively correlated cross-resistance to diphenylamine in benomyl-resistant *Penicillium expansum*. *Phytopathol.* 75: 74–79.
- Rosner, H.; B. Rohrmann, G. Peiker. 2000. Ochratoxin A in human serum. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51: 104–107.
- Ross, P.F.; L.G. Rice, R.D. Plattner, G.D. Osweiler, T.M. Wilson, D.L. Owens, H.A. Nelson, J.L. Richard. 1991. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia* 114: 129–135.
- Rotter, B.A.; B.K. Thompson, M. Lessard, H.L. Trenholm, H. Tryphonas. 1994. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* 23: 117–124.
- Rotter, B.A.; D.B. Prelusky, J.J. Pestka. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 1–34.
- Rupp, H.S.; S.B. Turnipseed. 2000. Confirmation of patulin and 5-HMF in apple juice by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 83: 612–620.
- Russell, R.; M. Paterson. 2007. Some fungicides and growth inhibitor/biocontrol-enhancer 2-deoxy-D-glucose increase patulin from *Penicillium expansum* strains in vitro. *Crop Prot.* 26: 543–548.
- Rychlik, M.; P. Schieberle. 1999. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3749–3755.
- Ryu, J.C.; J.S. Yang, Y.S. Song, O.S. Kwon, J. Park, I.M. Chang. 1996. Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 13: 333–341.
- Ryu, J-C.; K. Ohtsubo, N. Izumiyama, K. Nakamura, T. Tanaka, H. Yamamura, Y. Ueno. 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundam. Appl Toxicol.* 11: 38–47.
- Ryu, J-C.; K. Ohtsubo, N. Izumiyama, M. Mori, T. Tanaka, Y. Ueno. 1987. Effects of nivalenol on the bone marrow in mice. *J. Toxicol. Sci.* 12: 11–21.
- Sáez, J.M.; Á. Medina, J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo, M. Jiménez. 2004. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1029: 125–133.
- Sage, L.; D. Garon, F. Seigle-Murandi. 2004. Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5764–5768.
- Sage, L.; S. Krivobok, E. Delbos, F. Seigle-Murandi, E.E. Creppy. 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1306–1311.
- Samar, M.; S.L. Resnik, H.H.L. González, A.M. Pacin, M.D. Castillo. 2007. Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. *Food Control* 18: 1295–1299.
- Samar, M.M.; C. Ferro-Fontán, S. Resnik, A. Pacin, M. Castillo. 2003. Distribution of deoxynivalenol in wheat, wheat flour, bran, and gluten, and variability associated with the test procedure. *J. AOAC Int.* 86: 551–556.

- Samar, M.M.; M.S. Neira, S.L. Resnik, A. Pacin. 2001. Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology. *Food Addit. Contam.* 18: 1004–1010.
- Samarajeewa, U. 1991. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, cap. 34.
- Samson, R.A.; E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad (Eds.). 2004. *Introduction to food- and airborne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Amsterdam, Holanda.
- Samson, R.A.; S.B. Hong, J.C. Frisvad. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med. Mycol.* 44: S133–S148.
- Sanderson, P.G.; R.A. Spotts. 1995. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathol.* 85:103–110.
- Sangare-Tigori, B.; S. Moukha, J.H. Kouadio, D.S. Dano, A.M. Betbeder, A. Achour, E.E. Creppy. 2006. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Toxicon* 47: 894–900.
- Sano, A.; S. Matsutani, M. Suzuki, S. Takitani. 1987. High-performance liquid chromatographic method for determining trichothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.* 410: 427–436.
- Sansing, G.A.; N.D. Davis, V.L. Diener. 1973. Effect of time and temperature on ochratoxin A productions by *Aspergillus ochraceus*. *Can. J. Microbiol.* 19: 1259–1263.
- Santos, E.A.; E.A. Vargas. 2002. Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. *Food Addit. Contam.* 19: 447–458.
- Sato, N.; T. Ito, H. Kumada, Y. Ueno, K. Asano, N. Saito, K. Ohtsubo, I. Ueno, S.Y. Hatanaka. 1978. Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*, XVIII hematological changes in mice by a single and repeated administration of trichothecenes. *J. Toxicol. Sci.* 3: 335–356.
- Sava, V.; O. Reunova, A. Velasquez, R. Harbison, J. Sánchez-Ramos. 2006. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *NeuroToxicol.* 27: 82–92.
- SCF. 1998. Health Scientific Committees. Outcome of discussions 14. Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A, Office for Official Publications of the European Communities, vol. 56, Luxemburgo. p. 489.
- SCF. 1999. Opinion on *Fusarium* toxins, Part 1: Deoxynivalenol (DON) expressed on 2 Diciembre 1999. European Commission SCF/CS/CNTM/MYC/19 Final, http://europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf
- SCF. 2000a. Scientific Committee on Food, Marzo 2000. Minutes of the 120th meeting, Brussels. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out55_en.pdf
- SCF. 2000b. Opinion on *Fusarium* toxins. Part 4: Nivalenol expressed on 19 Octubre 2000. European Commission SCF/CS/CNTM/MYC/26 Final, http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf
- SCF. 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, adopted on 26 Febrero 2002. European Commission SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final, http://europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf
- Schaafsma, A.W.; R.W. Nicol, M.E. Savard, R.C. Sinha, L.M. Reid, G. Rottinghaus. 1998. Analysis of *Fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. *Mycopathologia* 142: 107–113.
- Schiefer, H.B.; S. Nicholson, O.B. Kasali, D.S. Hancock, R. Greenhalgh. 1985. Pathology of acute 3-acetyldeoxynivalenol toxicity in mice. *Can. J. Comp. Med.* 49: 315–318.

- Schollenberger, M.; W. Drochner, M. Rühle, S. Suchy, H. Terry-Jara, H.M. Müller. 2005. Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the German market. *J. Food Comp. Anal.* 18: 69–78.
- Schothorst, R.C.; A.A. Jekel, H.P. van Egmond, A. de Mul, P.E. Boon, J.D. van Klanveren. 2005. Determination of trichothecenes in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Food Addit. Contam.* 22: 48–55.
- Schothorst, R.C.; A.A. Jekel. 2001. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chem.* 73: 111–117.
- Schroeder, H.W.; R.J. Cole. 1977. Natural occurrence of alternariols in discolored pecans. *J. Agric. Food Chem.* 25: 204–206.
- Schwabe, M.; J. Krämer. 1995. Influence of water activity on the production of T-2 toxin by *Fusarium sporotrichioides*. *Mycotox. Res.* 11: 35–39.
- Schwarz, P.B.; H.H. Casper, S. Beattie. 1995. Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53: 121–127.
- Scott, P.M. 1987. Mycotoxins: Review. *J. AOAC Int.* 70: 276–281.
- Scott, P.M. 1989. The natural occurrence of trichothecenes. En: V.R. Beasley (Ed.). *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1–26.
- Scott, P.M. 1991. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. En: J. Chelkowski (Ed.). *Cereal grains. Mycotoxins. fungi and quality in drying and storage*. Elsevier, Amsterdam, Holanda. pp. 529–572.
- Scott, P.M. 1993c. Gas chromatography of mycotoxins. En: *Chromatography of Mycotoxins, Techniques and Applications*, V. Betina (Ed.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. p. 373–425.
- Scott, P.M. 1996a. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.* 79: 875–882.
- Scott, P.M. 1996b. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food Addit. Contam.* 13 (suppl.): 19–22.
- Scott, P.M. 1997. En: *Mycotoxins in Grain—Compounds other than Aflatoxin*. J.D. Miller, H.L. Trenholm (Eds.). Eagan Press, St. Paul, MN, p. 97.
- Scott, P.M. 2002. Methods of analysis for ochratoxin A. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 117–134.
- Scott, P.M.; D. Weber, S.R. Kanhere. 1997. Gas chromatography–mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *J. Chromatogr. A* 765: 255–263.
- Scott, P.M.; G.A. Lawrence. 1997. Determination of aflatoxins in beer. *J. AOAC Int.* 80: 1229–1234.
- Scott, P.M.; J.W. Lawrence, W. van Walbeek. 1970. Detection of mycotoxins by thin–layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Appl. Microbiol.* 20: 839–842.
- Scott, P.M.; M.W. Trucksess. 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J. AOAC Int.* 80: 941–949.
- Scott, P.M.; S.R. Kanhere, D. Weber. 1993a. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 10: 381–389.
- Scott, P.M.; S.R. Kanhere, J.E. Dexter, P.W. Brennan, H.L. Trenholm. 1984. Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. *Food Addit. Contam.* 1: 313–323.
- Scott, P.M.; S.R. Kanhere, P.Y. Lau, J.E. Dexter, R. Greenhalgh. 1983. Effects of experimental flour milling and breadbaking on retention of deoxynivalenol (vomitoxin) in hard red spring wheat. *Cereal Chem.* 60: 421–424.

- Scott, P.M.; S.R. Kanhere, R. Canela, G.A. Lombaert, S. Bacler. 1991. Determination of ochratoxin A in meat by liquid chromatography. *Prehrambeno-tehnol. Biotehnol. Rev.* 29: 61–64.
- Scott, P.M.; S.R. Kanhere. 1995. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Addit. Contam.* 12: 591–598.
- Scott, P.M.; W.F. Miles, P. Toft, J.G. Dube. 1972. Occurrence of patulin in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 20: 450–451.
- Scott, W.T.; L.B. Bullerman. 1975. Patulin: a mycotoxin of potential concern in foods. *J. Milk Food Technol.* 38: 695–705.
- Scott, P.M. 1993b. Recent developments in methods of analysis for mycotoxins in foodstuffs. *TrAC Trends Anal. Chem.* 12: 382–386.
- Scudamore, K.A. 1996. Ochratoxin A in animal feed – effects of processing. *Food Addit. Contam.* 13 (suppl.): 39–42.
- Scudamore, K.A. 1999a. Mycotoxins, an independent assessment of MAFF-funded applied research and surveillance 1993–1996. Report of studies commissioned by the Food Contaminants Division of the UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, PB 4045.
- Scudamore, K.A.; M.T. Hetmanski, S. Nawaz, J. Naylor, S. Rainbird. 1997b. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit. Contam.* 14: 175–186.
- Scudamore, K.A.; C.T. 1998. Livesey. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* 77: 1–17.
- Scudamore, K.A.; J. Banks, S.J. MacDonald. 2003. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Addit. Contam.* 20: 1153–1163.
- Scudamore, K.A.; M.T. Hetmanski, H.K. Chan, S. Collins. 1997a. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Addit. Contam.* 14: 157–173.
- Scudamore, K.A.; S. Patel, V. Breeze. 1999b. Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 16: 281–290.
- Serra, R.; F.J. Cabañes, G. Perrone, G. Castellá, A. Venancio, G. Mulè, Z. Kozakiewicz. 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* 98: 295–306.
- Serra, R.; L. Abrunhosa, Z. Kozakiewicz, A. Venancio. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 63–68.
- Sewram, V.; J.J. Nair, T.W. Nieuwoudt, N.L. Leggott, G.S. Shephard. 2000. Determination of patulin in apple juice by high performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 897: 365–374.
- Shane, S.M. 1994. Economic issues associated with aflatoxins. En: *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. D.L. Eaton, J.D. Groopman (Eds.). Academic Press, San Diego, CA, EEUU. pp. 513–527.
- Sharman, M.; S. MacDonald, J. Gilbert. 1992. Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. *J. Chromatogr. A* 603: 285–289.
- Shephard, G.S.; A. Fabiani, S. Stockenström, N. Mshicileli, V. Sewram. 2003. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1102–1106.
- Shephard, G.S.; E.W. Sydenham, P.G. Thiel, W.C.A. Gelderblom. 1990. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance

- liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liquid Chromatogr.* 13: 2077–2087.
- Shephard, G.S.; N.L. Leggott. 2000. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *J. Chromatogr. A* 882: 17–22.
- Shepherd, M.J.; J. Gilbert. 1984. An investigation of HPLC post-column iodination conditions for the enhancement of aflatoxin B₁ fluorescence. *Food Addit. Contam.* 1: 325–335.
- Sheu, F.; O. Lee, Y.T. Shyu. 1999. The synthesis of antigens and the production of antibodies against patulin derivatives. *J. Food Drug Anal.* 7: 65–72.
- Shim, W.B.; J.C. Kim, J.A. Seo, Y.W. Lee. 1997. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. *Food Addit. Contam.* 14: 1–5.
- Sholberg P.L.; K. Bedford, S. Stokes. 2005b. Sensitivity of *Penicillium* spp. and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. *Crop Prot.* 24:127–134.
- Sholberg, P.L.; C. Harlton, P. Haag, C.A. Levésque, D. O’Gorman, K. Seifert. 2005a. Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using β -tubulin gene sequences. *Postharv. Biol. Technol.* 36: 41–49.
- Siantar, D.P.; C.A. Halverson, C. Kirmiz, G.F. Peterson, N.R. Hill, S.M. Dugar. 2003. Ochratoxin A in wine: survey by antibody- and polymeric-based SPE columns using HPLC/fluorescent detection. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 170–177.
- Singh, G.S.P.; H.V.S. Chauhan, G.J. Jha, K.K. Singh. 1990. Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *J. Comp. Pathol.* 103: 399–410.
- Sinha, R.C.; M.E. Savard, R. Lau. 1995. Production of monoclonal antibodies for the Specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1740–1744.
- Skaug, M.A. 1999. Analysis of norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 16: 75–78.
- Slayne, M.A. 2001. Ochratoxin A in food in the UK. En: *Mycotoxins and phycotoxins in perspective of the turn of the millenium.* W.J. de Koe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert, M. Sabino (Eds.). Wageningen, Holanda. pp. 143–149.
- Smith, J.E.; C.W. Lewis, J.G. Anderson, G.L. Solomons. 1994. *Mycotoxins in human nutrition and health.* Brussels, Bélgica: European Commission, Directorate-General XII Science, Research and Development, Agro-Industrial Research Division, EUR 16048 EN.
- Smith, W.; D.C.L., LL.D. (Ed.). 1875. *A Dictionary of Greek and Roman Antiquities* John Murray, Londres. pp. 1294.
- Snowdon, A.L. 1990. *A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. 1. General Introduction and Fruits,* Londres: Wolfe Scientific.
- Snowdon, A.L. 1991. *A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. 2. Vegetables,* Londres: Wolfe Scientific.
- Soleas, G.J.; J. Yan, D.M. Goldberg. 2001. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J. Agr. Food Chem.* 49: 2733–2740.
- Solfrizzo, M.; G. Avantaggiato, A. Visconti. 1998. Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. *J. Chromatogr. A* 815: 67–73.
- Solti, L.; T. Pécsi, I. Barna-Vetró, F. Szász Jr, K. Biró, E. Szabó. 1999. Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Anim. Reprod. Sci.* 56: 123–132.

- Sommer, N.F.; J.R. Buchanan, R.J. Fortlage. 1974. Production of patulin by *Penicillium expansum*. Appl. Microbiol. 28: 589–593.
- Song, J.Y.; G.F. Yu, X.H. Wei. 1999. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. Chinese J. Health Lab. Tech. 9: 227–228.
- Spadaro, D.; A. Ciavarella, S. Frati, A. Garibaldi, M.L. Gullino. 2007. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. Food Control 18: 1098–1102.
- Sreemannarayana, O.; A.A. Frohlich, T.G. Vitti, R.R. Marquardt, D. Abramson. 1988. Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. J. Anim. Sci. 66: 1703–1711.
- Stansfield, J.M.; A.E. Francis, C.H. Stuart–Harris. 1944. Laboratory and clinical trials of patulin. Lancet 2: 370–372.
- Steiner, I.; D. Werner, J. Washüttl. 1999. Patulin in fruit juices. Part 1. analysis and control in Austrian apple and pear juices. Ernährung Nutr. 23: 202–208.
- Steyn, P.S. 1971. Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. Microbial Toxins 6: 179–205.
- Stinson, E.E.; D.D. Bills, S.F. Osman, J. Siciliano, M.J. Ceponis, E.G. Heisler. 1980. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. J. Agric. Food Chem. 28: 960–963.
- Stinson, E.E.; S.F. Osman, E.G. Heisler, J. Siciliano, D.D. Bills. 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, and lemons. J. Agric. Food Chem. 29: 790–792.
- Storer, A.J.; T.R. Gordon, S.L. Clark. 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. pini, with Monterey pine seeds and seedlings in California. Plant Pathol. 47: 649–656.
- Strange, R.N. 1991. En: Mycotoxins and Animal Foods. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.). CRC Press, Boca Raton, cap.15.
- Stroka, J.; E. Anklam, U. Jörissen, J. Gilbert, A. Barmark, C. Brera, P.E. Clasen, F. Galagher, J. Gardikis, L.B. Jensen, F. Lee, M. Luz, J.Y. Michelet, K.I. Noutio, L. Palvras, A. Pittet, M. Reutter, J.M. Scholten, E. Strassmeier, L. Szymanski. 2000. 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: 320–340.
- Studer–Rohr, I.; D.R. Dietrich, J. Schlatter, Ch. Schlatter. 1995. The presence of ochratoxin A (OA) in coffee. Food Chem. Toxicol. 33: 341–355.
- Subirade, I. 1996. Fate of ochratoxin A during breadmaking. Food Addit. Contam. 13 (suppl.): 25–26.
- Sugita–Kinoshi, Y.; Y. Hara–Kudo, F. Kasuga, S. Kumagai. 1998. The effects of trichothecenes on host defense against infectious diseases. Mycotoxins 47: 19–23.
- Sugita–Konishi, Y.; B.J. Park, K. Kobayashi–Hattori, T. Tanaka, T. Chonan, K. Yosshikawa, S. Kumagai. 2006b. Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products. Biosci. Biotech. Biochem. 70: 1764–1768.
- Sugita–Konishi, Y.; T. Tanaka, M. Nakajima, K. Fujita, H. Norizukie, N. Mochizuki, K. Takatori. 2006a. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. Talanta 69: 650–655.
- Sugita–Konsihi, Y.; T. Tanaka, Y. Sugiura, S. Tabata, M. Nakajima, H. Sakurai, Y. Nakaie, K. Sato, Y. Kitani, K. Fujita, S. Hayashi, T. Iizuka, Y. Hirakawa, N. Mochizuki, M. Hoshino, Y. Sato, N. Takahashi, K. Takatori. 2005. Inter–

- laboratory study for validation of a Japanese official analytical method for determination of patulin in apple juice. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 46: 224–227.
- Sulyok, M.; F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 2649–2659.
- Swamy, H.V.; T.K. Smith, E.J. MacDonald, H.J. Boermans, E.J. Squires. 2002. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* 80: 3257–3267.
- Swanson, B.G. 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Hort. (ISHS)* 207: 49–62.
- Sweeney, M.J.; A.D.W. Dobson. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 141–158.
- Sydenham, E.W.; G.S. Shephard. 1996. En: *Progress in food contaminant analysis*. J. Gilbert (Ed.). Blackie Academic and Professional, London, Reino Unido. pp. 65–146.
- Sydenham, E.W.; W.C.A. Gelderblom, P.G. Thiel, W.F.O. Marasas. 1990. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.* 38: 285–290.
- Sydenham, E.W.; W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, G.S. Shephard, J.J. Nieuwenhuis. 1991. Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *F. crookwellense* isolates. *Food Addit. Contam.* 8: 31–41.
- Sylvia, V.L.; T.D. Phillips, B.A. Clement, J.L. Green, L.F. Kubena, N.D. Heidelbauch. 1986. Determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 362: 79–85.
- Tacke, B.K.; H.H. Casper. 1996. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.* 79: 472–475.
- Takino, M.; S. Daishima, T. Nakahara. 2003. Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 1965–1972.
- Tanaka, T.; A. Hasegawa, S. Yamamoto, U.S. Lee, Y. Sugiura, Y. Ueno. 1988. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* micotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone: survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* 36: 979–983.
- Tanaka, T.; A. Hasegawa, S. Yamamoto, Y. Matsuki, Y. Ueno. 1986. Residues of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone, in wheat and processed food after milling and baking. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 27: 653–655.
- Tanaka, T.; A. Yoneda, S. Inoue, Y. Sugiura, Y. Ueno. 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 882: 23–28.
- Tanaka, T.; S. Yamamoto, A. Hasegawa, N. Aoki, J.R. Besling, Y. Sugirua, Y. Ueno. 1990. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, in cereals harvested in the Netherlands. *Mycopathologia* 110: 19–22.
- Tangni, E.K.; S. Ponchaut, M. Madoux, R. Rozenberg, Y. Larondelle. 2002. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit. Contam.* 19: 1169–1179.

- Taniwaki, M.H.; J.I. Pitt, A.A. Teixeira, B.T. Iamanaka. 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 173–179.
- Tarter, E.J.; J.P. Hanchay, P.M. Scott. 1984. Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 597–600.
- Taschan, H.; G. Puchtinger, U. Waller, T. Puchtinger. 2000. Deoxynivalenol in grain products. *Mycotoxin Res.* 16 (Suppl. 1): 26–29.
- Tateo, F.; M. Bononi, E. Lubian. 2000. Survey on ochratoxin A in wines. Data concerning the market of table wines in brik. *Bull. O.I.V.* 73: 773–783.
- Tenk, I.; É. Fodor, C.S. Szathmáry. 1982. The effect of pure *Fusarium* toxins (T–2, F–2, DAS) on the microflora of the gut and on plasma glucocorticoid levels in rat and swine. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 252: 384–393.
- Téren, J.; J. Varga, Z. Hamari, E. Rinyu, F. Kevei. 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134: 171–176.
- Thellmann, A.; W. Weber. 1997. Determination of ochratoxin A in cereals, malt, and beer after accumulation and separation on immunoaffinity columns and following high–pressure liquid chromatography with fluorescence detection. *Deuts. Lebens. Runds.* 93: 1–3.
- Thompson, M.; R. Wood. 1993. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.* 76: 926–940.
- Thompson, W.L.; R.W. Wannemacher. 1986. Structure–function relationships of 12,13–epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicol.* 24: 985–994.
- Thust, R.; S. Kneist, J. Mendel. 1982. Patulin, a further clastogenic mycotoxin, is negative in the SCE Assay in Chinese hamster V79–E cells in vitro. *Mutat. Res.* 10: 91–97.
- Thust, R.; S. Kneist, V. Hühne. 1983. Genotoxicity of *Fusarium* mycotoxins (nivalenol, fusarenon–X, T–2 toxin, and zearalenone) in Chinese hamster V79–E cells in vitro. *Arch. Geschwulstforsch* 53: 9–15.
- Tiebach, R.; W. Blaas, M. Kellert, S. Steinmeyer, R. Weber. 1985. Confirmation of nivalenol and deoxynivalenol by on–line liquid chromatography–mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 318: 103–111.
- Tjamos, S.E.; P.P. Antoniou, A. Kazantzidou, D.F. Antonopoulos, I. Papageorgiou, E.C. Tjamos. 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in corinth raisin and wine–producing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control. *J. Phytopathol.* 152: 250–255.
- Torres, M.R.; V. Sanchis, A.J. Ramos. 1998. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by enzyme–linked immunosorbent assay method. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 139–143.
- Trenholm, H.L.; L.L. Charmley, D.B. Prelusky, R.M. Warner. 1991. Two physical methods for decontamination of four cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J. Agric. Food Chem.* 39: 356–360.
- Trenholm, H.L.; W.P. Cochrane, H. Cohen, J.I. Elliot, E.R. Farnworth, D.W. Friend, R.M.G. Hamilton, G.A. Neish, J.F. Standish. 1981. Survey of vomitoxin contamination of the 1980 white winter wheat crop in Ontario, Canada. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 1992A–1994A.
- Trigo–Stockli, D.M.; R.I. Sanchez–Marinez, M.O. Cortez–Rocha, J.R. Pedersen. 1998. Comparison of the distribution and occurrence of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol in hard red winter wheat for 1993–1996. *Cereal Chem.* 75: 841–846.
- Trucksess, M.W. 1998. Mycotoxins. *J. AOAC Int.* 81: 128–137.

- Trucksess, M.W.; D.E. Ready, M.K. Pender, C.A. Ligmond, G.E. Wood, S.W. Page. 1996. Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour and bran. *J. AOAC Int.* 79: 883–887.
- Trucksess, M.W.; F. Thomas, K. Young, M.E. Stack, W.J. Fulgueras, S.W. Page. 1995. Survey of deoxynivalenol in U.S. 1993 wheat and barley crops by enzyme–linked immunosorbent assay. *J. AOAC Int.* 78: 631–636.
- Trucksess, M.W.; J. Giler, K. Young, K.D. White, S.W. Page. 1999. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee–1997. *J. AOAC Int.* 82: 85–89.
- Trucksess, M.W.; Y.F. Tang. 1999. Solid–phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. *J. AOAC Int.* 82: 1109–1113.
- Trucksess, M.W.; Y.F. Tang. 2001. Solid phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. *Method Mol. Biol.* 157: 205–213.
- Tryphonas, H.; F. Iverson, Y. So, E.A. Nera, P.F. McGuire, L. O’Grady, D.B. Clayson, P. M. Scott. 1986. Effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice. *Toxicol. Lett.* 30: 137–150.
- Tryphonas, H.; L. O’Grady, D.L. Arnold, P.F. McGuire, K. Karpinski, R.F. Vesonder. 1984. Effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral immunity of mice. *Toxicol. Lett.* 23: 17–24.
- Tsao, R.; T. Zhou. 2000. Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5231–5235.
- Tutelyan, V.A. 2004. Deoxynivalenol in cereals in Russia. *Toxicol. Lett.* 153: 173–179.
- Udagawa, S. 1988. Mycotoxicoses – the present problems and prevention of mycotoxins. *Asian Med. J.* 31: 599–604.
- Ueno, T.; H. Matsumoto, K. Ishii, K–I. Kukita. 1976. Inhibitory effects of mycotoxins on Na⁺–dependent transport of glycine in rabbit reticulocytes. *Biochem. Pharmacol.* 25: 2091–2095.
- Ueno, Y. 1984. Toxicological features of T–2 toxin and related trichothecenes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4: S124–S132.
- Ueno, Y. General toxicology. 1983. En: *Developments in Food Science. IV Trichothecenes – Chemical, biological and toxicological aspects.* Y. Ueno (Ed.). Tokyo/Amsterdam: Kodansha/Elsevier.
- Ueno, Y. Mycotoxins. 1987a. En: *Toxicological aspects of food.* K. Miller (Ed.). Elsevier. London, Reino Unido. pp. 139–204.
- Ueno, Y. Trichothecenes in food. 1987b. En: *Mycotoxins in food.* P. Krogh (Ed.). London, Academic Press. pp. 123–47.
- Ueno, Y.; O. Kawamura, Y. Sugiura, K. Horiguchi, M. Nakajima, K. Yamamoto, S. Sato. 1991. Use of monoclonal antibodies, enzyme–linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin–producing fungi. En: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours.* M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky, H. Bartsch (Eds.). IARC, Lyon, Francia. pp. 71–75.
- Ueno, Y.; S. Aoyama, M. Sekijama, M. Masuda, D.J. Kim, R. Hasegawa, N. Ito. 1992. Enhancement of GST–P–positive liver cell foci development by nivalenol, a trichothecene mycotoxin. *Carcinogenesis* 13: 433–437.
- Ueno, Y.; S. Maki, J. Lin, M. Furuya, Y. Sugiura, O. Kawamura. 1998. A 4–year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column–linked HPLC. *Food Chem. Toxicol.* 36: 445–449.
- Valenta, H. 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *J. Chromatogr. A* 815: 75–92.

- Valero, A.; J.R. Farré., V. Sanchis, A.J. Ramos, S. Marín. 2006. Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and a_w . *Int. J. Food Microbiol.* 110: 160–164.
- Valle-Algarra, F.M.; A. Medina, J.V. Gimeno-Adelantado, A. Llorens, M. Jiménez, R. Mateo. 2005. Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD. *Talanta* 66: 194–201.
- van der Merwe, K.J.; P.S. Steyn, L. Fourie, D.B. Scott, J.J. Theron. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205: 1112–1113.
- van Egmond, H.P. 1989. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Addit. Contam.* 6: 139–188.
- van Egmond, H.P.; G.J.A. Speijers. 1999. Natural Toxins I. Mycotoxins. En: K. Van der Heijden, M. Younes, L. Fishbein, S. Miller (Eds.). *International Food Safety Handbook*. New York: Marcel Dekker Inc. 341–355.
- van Walbeek, W.; P.M. Scott, J. Harwig, J.W. Lawrence. 1969. *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Can. J. Microbiol.* 15: 1281–1285.
- Var, I., B. Kabak. 2007. Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. *Microchem. J.* 86: 241–247.
- Varga, J.; F. Kevei, A. Vriesema, F. Debets, Z. Kozakiewicz, J.H. Croft. 1994. Mitochondrial DNA restriction fragments length polymorphism in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Can. J. Microbiol.* 40: 612–621.
- Varga, J.; F. Kevei, É. Rinyu, J. Téren, Z. Kozakiewicz. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4461–4464.
- Varga, J.; K. Rigó, J. Réren, A. Mesterházy. 2001. Recent advances in ochratoxin research. I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal Res. Commun.* 29: 85–92.
- Veldman, A.; G.J. Borggreve, E.J. Mulders, D. van de Lagemaat. 1992. Occurrence of the mycotoxins ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in feed components. *Food Addit. Contam.* 9: 647–655.
- Ventura, M.; A. Gómez, I. Anaya, J. Díaz, F. Broto, M. Agut, L. Comellas. 2004. Determination of aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂ in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1048 25–29.
- Ventura, M.; C. Vallejos, I.A. Anaya, F. Broto Puig, M. Agut, L. Comellas. 2003. Analysis of ochratoxin A in coffee by solid-phase cleanup and narrow-bore liquid chromatography–fluorescence detector–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7564–7567.
- Vero, S.; A. Vazquez, M.P. Cerdeiras, M. Soubes. 1999. A rapid TLC–scanning method for the determination of patulin in apple products. *J. Planar Chromatogr.–Modern TLC* 12: 172–174.
- Versonder, R.F.; J.J. Ellis, W.F. Kwolek, D.J. DeMarini. 1982. Production of vomitoxin on corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and *Fusarium roseum* 'graminearum'. *Soil Biol. Biochem.* 11: 661–667.
- Vesonder, R.F.; A. Ciegler, H.R. Burmeister, A.H. Jensen. 1979. Acceptance by swine and rats of corn amended with trichothecenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 344–346.
- Vicam, L.P. 1999. *OchraTest* instruction manual. Watertown, MA, EEUU. Vicam L.P. Int.
- Viñas, I.; E. Vela, V. Sanchis. 1993. Capacidad productora de patulina de cepas de *Penicillium expansum* procedentes de centrales hortofrutícolas de Lleida. *Rev. Iberoamer. Micol.* 10: 30–32.

- Viñas, I.; J. Usall, V. Sanchis. 1991. Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest fungicide treatments in apple packingshouses in Lerida (Spain). *Mycopathol.* 113: 15–18.
- Visconti A.; A. de Girolamo. 2005. Fitness for purpose—ochratoxin A analytical developments. *Food Addit. Contam.* 22 (Suppl): 37–44.
- Visconti, A.; A. Bottalico. 1983. Detection of *Fusarium* trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, fusarenone and 3-acetyldeoxynivalenol) by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 17: 97–100.
- Visconti, A.; M. Pascale, G. Centonze. 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 864: 89–101.
- Visconti, A.; M. Pascale, G. Centonze. 2000. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 888: 321–326.
- Visconti, A.; M. Pascale, G. Centonze. 2001. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study. *J. AOAC Int.* 84: 1818–1827.
- Voss, K.A.; C.W. Bacon, F.I. Meredith, W.P. Norred. 1996. Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalised and water extracted *Fusarium moniliforme* culture material. *Food Chem. Toxicol.* 34: 623–632.
- Vrabcheva, T.; E. Usleber, R. Dietrich, E. Märtlbauer. 2000. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from bulgarian villages with a history of balkan endemic nephropathy. *J. Agr. Food Chem.* 48: 2483–2488.
- Vukelic, M.; B. Sostaric, R. Fuchs. 1991. Some pathomorphological features of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *IARC scientific publications* 115: 37–42.
- Walker, F.; B. Meier. 1998. Determination of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and 15-O-acetyl-4-deoxynivalenol in contaminated whole wheat flour by liquid chromatography with diode array detection and gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.* 81: 741–748.
- Walker, J.R.L. 1969. Inhibition of the apple phenolase system through infection by *Penicillium expansum*. *Phytochem.* 8: 561–566.
- Walker, K.; B.P. Wiesner. 1944. Patulin and clavacin. *Lancet* 246: 294.
- Wang, S.M.; W.L. Yang. 2003. High-performance liquid chromatography determination of patulin in concentrated apple juice. *Biotech.* 13: 18.
- Ware, G.M.; C.W. Thorpe, A.E. Pohland. 1974. Liquid chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *J AOAC Int.* 57: 111–113.
- Wasicki, P.; F. Scholz, K.D. Schleinitz. 1986. Polarographic determination of patulin. *Pharmazie* 41: 843–844.
- Wearing, A.H.; L.W. Burgess. 1979. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* ‘*graminearum*’. *Soil Biol. Biochem.* 11: 661–667.
- Weingaertner, J.; R. Krska, W. Praznik, M. Grasserbauer, H. Lew. 1997. Use of Mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electron capture gas chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357: 1206–1210.
- Wernimont, G.T. 1985. Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. *AOAC*, Arlington, VA, EEUU. p. 183.
- West, D.I.; L.B. Bullerman. 1991. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.). CRC Press, Boca Ratón. cap. 33.
- Westby, A.; A. Reilly, Z. Bainbridge. 1997. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. *Food Control* 8: 329–339.

- Wetter, M.T. 1999. Occurrence and distribution of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol in sweet corn ears. *Food Addit. Contam.* 16: 119–124.
- Wheeler, J.L.; M.A. Harrison, P.E. Koehler. 1987. Presence of patulin in pasteurized apple cider. *J. Food Sci.* 52: 479–480.
- White, T.J.; T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press Inc., San Diego, EEUU. p. 315–322.
- WHO (World Health Organization). 1979. *Environmental Health Criteria*, 11. Mycotoxins. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- WHO (World Health Organization). 1990. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. *Environmental Health Criteria* 105. Ginebra, Suiza: International Programme on Chemical Safety, World Health Organization. pp. 71–164.
- WHO (World Health Organization). 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO. Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Ginebra, Suiza: Technical Report Series 859. pp. 36–38.
- WHO (World Health Organization). 1998. Food Safety Unit, Programme of Food Safety and Food Aid: Regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities. WHO/FSF/FOS/98.3.
- Wichmann, G.; O. Herbarth, I. Lehmann. 2002. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ. Toxicol.* 17: 211–218.
- Widenstrand, J.; H. Pettersson. 2001. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. *Food Addit. Contam.* 18: 987–992.
- Wolff, J. 2000. Ochratoxin A in cereals and cereal products. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51: 85–88.
- Wolff, J.; H. Bresch, C. Cholmakov-Bodechtel, G. Engel, M. Gareis, P. Majerus, H. Rosner, R. Scheuer. 2000. Ochratoxin A: Contamination of foods and consumer exposure general introduction. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51: 84.
- Wood, G.E. 1992. Mycotoxins in Foods and Feeds in the United States. *J. Anim. Sci.* 70: 3941–3949.
- Wood, G.M.; S. Patel, A.C. Entwisle, A. Boenke. 1996. Ochratoxin A in wheat: a second intercomparison of procedures. *Food Addit. Contam.* 13: 519–539.
- Wouters, M.F.A.; G.J.A. Speijers. 1996. Patulin. *Food Additives Series* 35. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: World Health Organization. pp. 337–402. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je16.htm>
- Wu, L. 1992. An investigation of patulin in fruits products in China. *J. Hyg. Res.* 21: 101.
- Wu, M.T.; J.C. Ayres. 1974. Effects of dichlorvos on ochratoxin production. *J. Agric. Food Chem.* 22: 536–537.
- Yabe, T.; H. Hashimoto, M. Sekijima, M. Degawa, Y. Hashimoto, F. Tashiro. 1993. Effects of nivalenol on hepatic drug-metabolizing activity in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 31: 573–581.
- Yazdanpanah, H.; M. Miraglia, F.R. Calfapietra, C. Brera. 2001. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in corn and barley from Mazandaran and Golestan in north provinces of Iran. *Mycotox. Res.* 17: 21–30.
- Yoshizawa, T. 1991. Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barley, rye, oats, sorghum, millet, rice). En: *Mycotoxins and animal foods*. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.). CRC Press, Londres. pp. 301–324.

- Yoshizawa, T. 1997. Geographic difference in trichothecene occurrence in Japanese wheat and barley. *Bull. Inst. Compr. Agric. Sci. Kinki University* 5: 23–30.
- Yoshizawa, T.; N. Morooka. 1974. Studies on the toxic substances in the infected cereals (III). Acute toxicities of the new trichothecene mycotoxins: deoxynivalenol and its monoacetate. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 15: 261–269.
- Yoshizawa, T.; Y.Z. Jin. 1995. Natural occurrence of acetylated derivatives of deoxynivalenol and nivalenol in wheat and barley in Japan. *Food Addit. Contam.* 12: 689–694.
- Young, L.C. 1986. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated corn by chemical and physical treatment. *J. Agric. Food Chem.* 34: 665–667.
- Young, L.C.; L.M. Subryan, D. Potts, M.E. McLaren, F.H. Gobran. 1986. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. *J. Agric. Food Chem.* 34: 659–664.
- Yumbe–Guevara, B.E.; T. Yoshizawa. 2003. Reduction of deoxynivalenol and nivalenol content during roasting of naturally contaminated barley. *Mycotoxins* 53: 87–93.
- Zaika, L.L.; E. Moulden, L. Weimer, J.G. Phillips, R.L. Buchanan. 1994. Model for the combined effects of temperature, initial pH, sodium chloride and sodium nitrite concentrations on anaerobic growth of *Shigella flexneri*. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 345–358.
- Zanic–Grubisic, T.; R. Zrinski, I. Cepelak, J. Petrik, B. Radic, S. Pepeljnjak. 2000. Studies of ochratoxin A–induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167: 132–139.
- Zhou, H.R.; D. Yan, J.J. Pestka. 1997. Differential cytokine mRNA expression in mice after oral exposure to the trichothecenes vomitoxin (deoxynivalenol): dose response and time course. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 294–305.
- Zhou, K.Q. 2001. Determination of patulin by chemical methods. *Foreign Med. Sci. Sect. Hyg.* 28: 29–32.
- Zimmerli, B.; R. Dick. 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high–performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *J. Chromatogr. B* 666: 85–99.
- Zimmerli, B.; R. Dick. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape–juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13: 655–668.
- Zinedine, A.; C. Brera, S. Elakhdari, C. Catano, F. Debegnach, S. Angelini, B. de Santis, M. Faid, M. Benlemlih, V. Minardi, M. Miraglia. 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17: 868–874.
- Zinedine, A.; C. Juan, L. Idrissi, J. Mañes. 2007. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. *Microchem. J.* 87: 154–158.
- Zöllner, P.; A. Leitner, D. Lubda, K. Cabrera, W. Lindner. 2000. Application of a Chromolith SpeedROD RP–18e HPLC column: determination of ochratoxin A in different wines by high–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 52: 818–820.
- Zomborszky–Kovács, M.; F. Vetési, P. Horn, I. Repa, F. Kovács. 2002. Effects of prolonged exposure to low–dose fumonisin B₁ in pigs. *J. Vet. Med. B* 49: 197–201.
- Zwietering, M.H.; I. Jongenburger, F.M. Rombouts, K. van ’t Riet. 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1875–1881.