TESE DE DOUTORAMENTO

DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EVALUAR LA INCIDENCIA Y LA ESTABILIDAD DE MICOTOXINAS DEL GÉNERO *FUSARIUM* EN FORRAJES DE MAÍZ ENSILADOS

Asdo. .....

Alicia Latorre Fernández

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E TECNOLOXÍA QUÍMICA/ FACULTADE DE QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TUTOR DA TESE

D. Thierry Dagnac

Investigador do INGACAL (Instituto Galego de Calidade Alimentaria)-CIAM (Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo), Xunta de Galicia

Dna. María Llompart Vizoso

Profesora do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela

Como Directores da Tese de Doutoramento titulada "**Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para evaluar la incidencia y la estabilidad de micotoxinas del género *Fusarium* en forrajes de maíz ensilados"**

Presentada por Dna. Alicia Latorre Fernández

Alumna do Programa de Doutoramento en Ciencia e Tecnoloxía Química

Autoriza a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Director da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 40/2015.

Asdo. D. Thierry Dagnac

Asdo. Dna. María Llompart Vizoso

AGRADECIMIENTOS

Y llegó el momento de cerrar un ciclo y escribir una nueva historia. Y llegó el momento de agradecer a todos los que me han acompañado hasta ahora y a todos los que me seguirán acompañando. Suerte la mía de poder dar las gracias a tanta gente.

Esta tesis que lleva mi nombre, la hemos construido entre muchos (científicos y no científicos); entre todos le hemos dado forma a esta investigación, así que paso a agradecer a todos los colaboradores.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores, Thierry y María por su plena dedicación y su buen criterio. Dos expertos y dos amigos que, desde lugares distintos, me han sabido guiar y motivar a lo largo de todo este proceso. Ha sido un auténtico privilegio haberos tenido como directores. Me gustaría agradecer también al que considero mi otro director: Bruno. En gran medida él ha sido el artífice de todo esto. Entre los tres habéis hecho fácil lo difícil, y hoy éste es el resultado.

Gracias a Daniel Franco, mi exjefe, mi amigo y el precursor de mi carrera investigadora. Fue él el que ayudó a que me metiese en este "lío". Siempre has creído en mí Dani, te lo agradezco inmensamente.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias al INIA por haberme concedido la beca sin la cual nada de esto hubiera sido posible; además de asistencias a congresos internacionales y estancias en centros en el extranjero. Por supuesto dar las gracias al CIAM, lugar en el que día a día desarrollé mi tesis y que me proporcionó un fantástico soporte tanto humano como instrumental. Del mismo modo, me gustaría agradecer al LIGAL toda la ayuda brindada, principalmente en la recta final de este trabajo. Querría también dar las gracias al Dr. Angelo Visconti y a la Dra. Verónica por haber hecho posible mi estancia en el ISPA. Igualmente darle las gracias a todos mis compañeros del ISPA por haberme atendido tan bien desde el primer momento, por haberme hecho sentir una más en su equipo de una manera tan cálida y enseñarme lo bonito de su tierra. Llevo la Puglia en el corazón. Gracias también a la Dra. Sarah De Saeger por mi tiempo de aprendizaje en el Laboratory of Food Analysis de la Universidad de Gante.

Tengo mucho que agradecer a todo el personal del CIAM, sobre todo a todos aquellos que me han ayudado en las labores de campo, muestreo y elaboración de los silos. Sin su colaboración este trabajo hubiera sido complicado, largo y mucho menos entretenido. Mil gracias a cada uno. Muchas gracias a Sonia por tantísimas veces que me animó a seguir batallando y por haber compartido conmigo momentos de risas cuando necesitaba una desconexión. Gracias a Meri Chao y a Laurita, grandes científicas e increíbles compañeras y amigas. Meri, ¡qué suerte habernos tropezado de nuevo en Mabegondo! Todo lo que hemos vivido desde entonces y todo lo que aún está por venir. Todo lo que me has ayudado en esto. Eres un ejemplo de ilusión, alegría y me regalas momentos fantásticos. Eres mi medio tronzón. Gracias Meri, por tanto. Lauri, las vueltas que todo ha dado desde aquel día que nuestras vidas se cruzaron en un laboratorio y continuaron desde aquella en la misma dirección. Desde entonces siempre hemos estado la una para la otra. Gracias por confiar

siempre en mí, por haberme animado constantemente de esa manera tan bonita en la que tú sabes hacer las cosas.

Gracias a mis amigas, a las de siempre y a las de para siempre: Alba, Carolina, Inés, Iria, Laura, Marta, Paula, Pele y Sabela. Las mejores amigas/hermanas del mundo. Gracias por confiar en mí, por apoyarme, y por cada momento que compartís conmigo que es un regalo. Qué bueno es teneros y saber que os tengo. Gracias por haberos sabido juntar con buena gente: Novo, Diego, Pablo A., Carlos, Alex, Pablo L., Ayad y Héctor. Gracias por hacer que la pandilla haya aumentado con Mauro, Simón, Martina, Noor, Claudia y Olivia…y los que estarán por venir. A todos vosotros, gracias por acompañarme en todo esta tarea que por momentos parecía titánica e interminable.

Thanks to my awesome group of friends from Peak District for sharing such nice times and for making me feel part of the band from the early beginning. All of you guys are tremendous. I do want to say thank you to Bingham family, my beautiful English family. I do really appreciate all the love and support from all of them. Thanks for loving me as a daughter, granddaughter, sister and auntie.

Gracias a mis dos grandes familias, grandes en todos los sentidos. Gracias por haber creído en mí desde que era la pequeña Copeco, la que nunca callaba y la que tanto os hacía reír. Desde entonces habéis compartido conmigo todos mis logros e ilusiones y acompañado en mis frustraciones con una increíble positividad. Habéis supuesto mucho en mi vida y me hacéis tremendamente feliz. Gracias por haberme transmitido una inmensa admiración hacia mis dos abuelas. Mil gracias a Mamá Pura y a la abuela Carmen, la que me enseña a hacer pan y la que me manda whatsapps, con la que me iba a la aldea y con la que pasaba veranos en la playa. Estas dos grandes mujeres, las que encabezan estas dos grandes familias, son y serán mi ejemplo de constancia, de superación y de una admirable fortaleza. Sé lo felices que les hace todo esto a ellas. Sólo por eso, esta batalla ha merecido la pena.

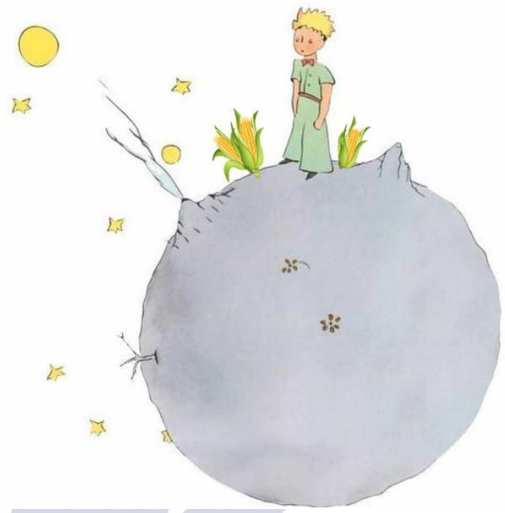
Gracias papá, gracias mamá. Gracias porque me habéis hecho libre e independiente habiéndome concedido la oportunidad de conocer, viajar, estudiar…desde que era una niña Heredo de ti papá, además de un buen gusto musical, tus ganas de aprender y tu ilusión por las pequeñas cosas; y de ti mamá la sonrisa y el modo tan pasional en la que lo haces todo. Cuando quiero que algo salga bien, sólo tengo que mirar para vosotros. Sois extraordinarios, sois un regalo y os quiero con todo mi corazón. Gracias por haber peleado conmigo en todo esto y por confiar siempre siempre en mí.

Gracias a mi pequeña gran hermana, por su cariño, su mimo y su comprensión, porque siempre me hace ver la vida bonita. Por ser mi cómplice, mi amiga, mi artista preferida y por enseñarme a luchar y no a competir. Siempre serás un referente para mí. Aquí estoy siempre para ti pequeniña.

Mister Bingham, my cheecky monkey, what can I tell to you that you don´t know already? My awesome support, my best friend, my amazing teacher, my unconditional love. Thank you very very much for all your amazing help in all this process, for being supportive

and caring in good and bad moments, for feeling always so proud of me, for loving me every day and every minute, for letting me love you every day and every minute. And our adventure continues, as a team, always together. There are still so many things that I want to learn from you, that I want to share with you. Thanks with all my heart. I love you always and I love you strongly.

Y después de todo esto, seguiré siendo la misma que aparca mal el coche y la que echa una lágrima cuando deja atrás Montelouro. Y continuaré con ganas de aprender y de superarme a mí misma, así que no os vayáis muy lejos porque os seguiré necesitando. Sois todos imprescindibles para que lo logre. Prometo estar aquí siempre para vosotros. Os lo agradezco enormemente…..until the moon and back!



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

"Entendemos poco el mundo que nos rodea, pero es vital entender lo que sabemos, porque es la única manera de ser más libres y poder enjuiciar mejor las cosas"

Ángel Carracedo

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mis padres y hermana
A Nick

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

As micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diversos fungos que poden infectar o millo forraxeiro e producir micotoxinas durante o seu cultivo e o proceso de ensilado. Estas substancias poden ocasionar efectos prexudiciais agudos e crónicos sobre a saúde animal e humana, e reducen a productividade nas explotacións. Existen evidencias de que os ensilados de millo son o constituínte da ración que achega a maior parte das micotoxinas inxeridas polas vacas de leite. Os fungos illados con maior frecuencia en millo gran en España pertencen ao xénero *Fusarium* e a súa contaminación con deoxinivalenol, zearalenona e fumonisinas foi detectada con frecuencia. Na Unión Europea aprobáronse normas que regulan o contido máximo de micotoxinas na alimentación animal particularmente para aflatoxina B_1, ocratoxina A e as producidas por *Fusarium* (zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas B_1 e B_2 e as toxinas T2 e HT2). Ademais, debido a que é común a aparición simultánea de varias micotoxinas nun mesmo alimento, a Axencia Europea para a Seguridade Alimentaria (EFSA) recomenda que se desenvolvan métodos multi-micotoxinas.
Este traballo consistiu en estudar a incidencia e a estabilidade de micotoxinas do *Fusarium* (fumonisinas, deoxinivalenol e zearalenona) en silos de millo (microsilos e trincheira), avaliando o efecto do uso de inoculantes, do tempo de ensilado e da colocación das mostras no silo. Tamén se investigaron as formas de fumonisinas modificadas, confirmándose que máis do 50% do contido total en fumonisinas en silo de millo debeuse a aquelas formas modificadas. Este feito subliña a necesidade de cuantificar esas formas para evitar unha subestimación da cantidade total de fumonisinas. Ademais, un método multi-micotoxinas foi satisfactoriamente validado para 24 micotoxinas e aplicado a 148 mostras de silo de millo procedentes de 19 explotacións lácteas galegas. Deoxinivalenol, ácido micofenólico, zearalenona e os seus metabolitos (α-zearalenol, β-zearalenol) foron as micotoxinas máis abundantes. Tamén observouse a coexistencia de máis dunha micotoxina na misma mostra.

PALABRAS CHAVE

Silo de millo, micotoxinas do *Fusarium,* método multi-micotoxinas, espectrometría de masas, validación, monitorización

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diversos hongos que pueden infectar al maíz forrajero y producir micotoxinas durante su cultivo y su proceso de ensilado. Estas sustancias pueden ocasionar efectos perjudiciales agudos y crónicos sobre la salud animal y humana, y reducen la productividad en las explotaciones. Existen evidencias de que los ensilados de maíz son el constituyente de la dieta que aporta la mayor parte de las micotoxinas ingeridas por las vacas de leche. Los hongos aislados con mayor frecuencia en maíz grano en España pertenecen al género *Fusarium* y su contaminación con deoxinivalenol, zearalenona y fumonisinas fue detectada con frecuencia. En la Unión Europea se han aprobado normas que regulan el contenido máximo de micotoxinas en la alimentación animal, particularmente para aflatoxina B_1, ocratoxina A y las producidas por *Fusarium* (zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas B_1 y B_2, y las toxinas T2 y HT2). Además, debido a que es común la aparición simultánea de varias micotoxinas en un mismo alimento, la Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda que se desarrollen métodos multi-micotoxinas. Este trabajo consistió en estudiar la incidencia y la estabilidad de micotoxinas del *Fusarium* (fumonisinas,deoxinivalenol y zearalenona) en silos de maíz (microsilos y trinchera), evaluando el efecto del uso de inoculantes, del tiempo de ensilado y de la colocación de las muestras en el silo. También se investigaron las formas de fumonisinas modificadas, confirmándose que más de un 50% del contenido total en fumonisinas en silo de maíz se debía a aquellas formas modificadas. Este hecho enfatiza la necesidad de cuantificar esas formas para evitar una subestimación de la cantidad total de fumonisinas. Además, un método multi-micotoxinas se validó satisfactoriamente para 24 micotoxinas y se aplicó a 148 muestras de silo de maíz procedentes de 19 explotaciones lecheras gallegas. Deoxinivalenol, ácido micofenólico, zearalenona y sus metabolitos (α-zearalenol, β-zearalenol) fueron las micotoxinas más abundantes. También se observó la coexitencia de más de una micotoxina en la misma muestra.

PALABRAS CLAVE

Silo de maíz, micotoxinas del *Fusarium,* método multi-micotoxinas, espectrometría de masas, validación, monitorización

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by various fungi. Some of them can infect corn forage and produce mycotoxins during cultivation and ensilage. These toxins can cause acute and chronic effects on animal and human health and reduce productivity in farms. In general, corn silage is the diet constituent that supplies the bulk of the mycotoxins intake in dairy cows. In Spain, the fungi most frequently isolated in maize grain belong to the genus *Fusarium* and subsequent contamination with deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins have been reported. The European Union (EU) has adopted rules limiting their maximum levels in feeding stuffs particularly aflatoxin B_1, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, T-2 and HT-2 toxins. In addition, the European Food Safety Authority (EFSA) recommends developing multi-mycotoxin methods because the simultaneous occurrence of mycotoxins in feed is commonplace.

In this way, this work has studied the incidence and stability of *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxinivalenol and zearalenone) in laboratory silos and conventional silos, and the use of inoculants, the ensiling time and the location of the sample in the silo were assessed. The occurrence of modified forms of fumonisins was also investigated. The data has confirmed that more than 50% of the total amount of fumonisins in corn silage samples was due to the modified forms. This fact has emphasised the need of quantifying these forms in order to avoid an underestimation of the total fumonisin levels.

In addition, a multi-mycotoxin method was satisfactorily validated for 24 mycotoxins and applied to 148 corn silage samples collected from 19 Galicia dairy farms. Deoxinivalenol, mycophenolic acid and zearalenone plus metabolites (α-zearalenol, β-zearalenol) were the most abundant mycotoxins. The results have also shown the co-existence of more than one mycotoxin in the samples analysed.

KEYWORDS

Corn silage, *Fusarium* mycotoxins, multi-mycotoxin method, mass spectrometry, validation strategy, monitoring

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ABSTRACT / RESUMEN 1

I. INTRODUCCIÓN 7

I.A. HONGOS MICOTOXIGÉNICOS Y MICOTOXINAS 9

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS. 9
2. HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS. 11
2.1. Factores que afectan al crecimiento fúngico en el campo 12
2.2. Factores que afectan al crecimiento fúngico durante el almacenaje 12
3. MICOTOXINAS: QUÍMICA Y TOXICIDAD. 14
3.1. Especies productoras y estructura química 14
3.1.1. Tricotecenos 14
3.1.2. Zearalenona 15
3.1.3. Fumonisinas y fumonisinas modificadas 16
3.1.4. Ocratoxina A 18
3.1.5. Aflatoxinas 18
3.1.6. Micotoxinas del género *Penicillium* 20
3.1.7. Otras micotoxinas 21
3.2. Efectos de las micotoxinas sobre la salud y la productividad de las vacas de leche 22
3.2.1. Metabolismo y toxicidad de los tricotecenos 23
3.2.2. Metabolismo y toxicidad de la zearalenona 23
3.2.3. Metabolismo y toxicidad de las fumonisinas 24
3.2.4. Metabolismo y toxicidad de la ocratoxina A 24
3.2.5. Metabolismo y toxicidad de las aflatoxinas 25
4. LEGISLACIÓN SOBRE MICOTOXINAS. 27
4.1. Creación y desarrollo de legislación sobre micotoxinas 27
4.2. Regulaciones y recomendaciones de los niveles de micotoxinas 28
4.3. Metodologías analíticas y materiales de referencia para el cumplimiento de la legislación 30
5. BIBLIOGRAFÍA. 32

I.B. ENSILADOS DE MAÍZ Y PRESENCIA DE MICOTOXINAS 37

1. ENSILADOS. PRINCIPIOS GENERALES. 37
1.1. Proceso de ensilaje 37
1.2. Uso de aditivos en ensilados: *Lactobacillus Buchneri* 38
1.3. Caracterización del ensilado 39
1.3.1. Estabilidad aeróbica 39
1.3.2. Indicadores de la calidad nutritiva 39
1.3.3. Indicadores de la calidad fermentativa 40

2. ENSILADOS DE MAÍZ.....**41**
3. HONGOS MICOTOXIGÉNICOS Y MICOTOXINAS EN MAÍZ Y EN ENSILADOS DE MAÍZ.....**43**
3.1. Pre-cosecha.....43
3.2. Post-cosecha.....45
3.2.1. Incidencia de hongos micotoxigénicos y micotoxinas en los ensilados de maíz.....46
3.2.2. Efecto del ensilado sobre la concentración de micotoxinas: estudio de la estabilidad.....48
3.2.3. Distribución de los hongos y micotoxinas en un silo y efectos de las técnicas de ensilado.....49
4. MÉTODOS DE LUCHA.....**50**
5. BIBLIOGRAFÍA.....**55**

I.C. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS.....61

1. MICOTOXINAS ESTUDIADAS EN ESTA TESIS.....**62**
2. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....**62**
2.1. Incertidumbre y variabilidad asociada al muestreo.....64
2.2. Selección de la muestra.....67
2.3. Preparación de la muestra.....67
3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN.....**67**
3.1. Factores que afectan al proceso de extracción.....68
3.2. Extracción de fumonisinas modificadas.....69
3.3. Técnicas de limpieza o purificación.....70
3.3.1. Extracción líquido-líquido (LLE).....70
3.3.2. Extracción en fase sólida (SPE).....70
3.4. QuEChERS.....72
3.5. Inyección directa sin purificación.....73
4. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....**74**
4.1. Cromatografía líquida de alta resolución.....74
4.2. Detección por ultravioleta y por fluorescencia.....76
4.3. Detección por espectrometría de masas.....78
4.3.1. Fundamentos de la técnica.....78
4.3.2. Instrumentación.....79
4.3.3. Aspectos de la técnica LC-MS/MS.....83
5. TÉCNICA DE INMUNOENSAYO ELISA.....**84**
5.1. Conceptos generales.....84
5.2. Aplicación en el análisis de micotoxinas.....85
6. BIBLIOGRAFÍA.....**88**

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 93

III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 101

1. MUESTRAS DE MAÍZ Y ENSILADOS.....**103**
1.1. Contaminación de maíz con hongos del *Fusarium*.....103
1.2. Elaboración de los silos de laboratorio.....104
1.3. Silos trinchera.....104

1.4. Toma de muestras, procesado y conservación 106
2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO 107
2.1. Patrones 107
2.2. Reactivos, gases y disolventes 109
2.2.1. Reactivos 109
2.2.2. Gases 109
2.2.3. Disolventes 110
2.3. Instrumental 110
2.3.1. Agitación y separación 110
2.3.2. Balanzas 110
2.3.3. Material de uso general en el laboratorio 110
2.3.4. Material de dosificación de líquidos 111
2.3.5. Material de filtración 111
2.3.6. Material kits ELISA 111
2.3.7. Material y sistema para purificación extractos 111
2.3.8. Equipos de evaporación 111
2.3.9. Refrigeración y secado 112
2.3.10. Viales 112
2.4. Dispositivos e instrumentación de detección y cuantificación utilizados 112
2.4.1. Lector de ELISA 112
2.4.2. HPLC-PDA-FLD 112
2.4.3. LC-MS/MS 113
2.5. Preparación de las soluciones de trabajo 113
2.5.1. Disoluciones stock, patrones de calibrado y mezclas de fortificación 113
2.5.2. Soluciones de micotoxinas para la optimización de las transiciones MS/MS 113
2.6. Limpieza del material 113

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 115

IV.A. INCIDENCIA Y ESTABILIDAD DE FUMONISINAS EN ENSILADOS DE MAÍZ EN SILOS DE LABORATORIO Y EN SILOS CONVENCIONALES 117

1. INTRODUCCIÓN 117
2. PARTE EXPERIMENTAL 119
2.1. Patrones empleados. Preparación de las soluciones de trabajo 119
2.2. Descripción de los tipos de muestras analizadas 120
2.2.1. Silos de laboratorio 121
2.2.2. Silos trinchera 121
2.2.3. Estabilidad aeróbica. Toma de muestras, procesado y conservación 122
2.3. Técnica de inmunoensayo ELISA para análisis de fumonisinas totales 122
2.4. Procedimiento de extracción 123
2.4.1. Extracción de las fumonisinas *"libres"* 123
2.4.2. Extracción de las fumonisinas "*modificadas*" 123
2.5. Preparación de las curvas de calibrado 124
2.6. Detección y cuantificación mediante LC-MS/MS 124

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. **126**
3.1. Interpretación de los resultados obtenidos por la técnica ELISA 126
3.2. Optimización de las condiciones del LC-MS/MS 128
3.3. Evaluación de los parámetros de calidad del método de extracción de fumonisinas *"libres"* 129
3.3.1. Optimización del disolvente de extracción 129
3.3.2. Linealidad y límites de detección y cuantificación 130
3.3.3. Evaluación del efecto matriz 131
3.3.4. Exactitud y precisión 133
3.3.5. Repetibilidad y reproducibilidad 133
3.4. Estudio de la existencia de fumonisinas *"modificadas*" en muestras de silo. 134
3.4.1. Pruebas previas 134
3.4.2. Optimización del método de extracción de fumonisinas "*modificadas"* 137
3.4.3. Parámetros de calidad del método de extracción de fumonisinas "*modificadas*" 139
3.5. Incidencia y estabilidad de fumonisinas durante el proceso de ensilado en *silos de laboratorio*. 141
3.5.1. Presencia de fumonisinas *"modificadas"* en silos de laboratorio 145
3.5.2. Estudio de la estabilidad aeróbica 146
3.6. Incidencia y estabilidad de fumonisinas durante el proceso de ensilado en *silos convencionales*. 148
3.6.1. Presencia de fumonisinas *"modificadas"* en silos convencionales 150
4. BIBLIOGRAFÍA. **152**

IV.B. INCIDENCIA Y ESTABILIDAD DE DEOXINIVALENOL Y ZEARALENONA EN ENSILADOS DE MAÍZ EN SILOS DE DE LABORATORIO Y EN SILOS CONVENCIONALES 157

1. INTRODUCCIÓN. **157**
2. PARTE EXPERIMENTAL. **159**
2.1. Patrones empleados. Preparación de las soluciones de trabajo 159
2.2. Descripción de los tipos de muestras analizadas 159
2.2.1. Silos de laboratorio 159
2.2.2. Silos trinchera 160
2.3. Técnica de inmunoensayo ELISA para análisis de deoxinivalenol 160
2.4. Procedimiento de extracción y purificación 161
2.5. Preparación de las curvas de calibrado 162
2.6. Detección y cuantificación mediante LC-MS/MS 162
2.6.1. Preparación de fases móviles 162
2.6.2. Condiciones cromatográficas y del detector de masas empleadas 163
2.7. Detección y cuantificación mediante HPLC-PDA-FLUO 163
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. **166**
3.1. Interpretación de los resultados obtenidos por la técnica ELISA 166
3.2. Optimización de las condiciones del LC-MS/MS 168
3.3. Optimización de las condiciones del HPLC-PDA-FDL 169
3.4. Evaluación del proceso de extracción y purificación de DON, 3-ADON y ZEA 170

3.4.1. Evaluación de la recuperación 170
3.4.2. Evaluación del efecto matriz 171
3.4.3. Otros parámetros de calidad del método LC-MS/MS 172
3.5. Incidencia y estabilidad de DON, 3-ADON y ZEA durante el proceso de ensilado en *silos de laboratorio*. 172
3.6. Incidencia y estabilidad de DON y ZEA durante el proceso de ensilado en *silos convencionales* 176
4. BIBLIOGRAFÍA **178**

IV.C. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO MULTI-MICOTOXINAS BASADO EN LA TÉCNICA LC-MS/MS PARA MUESTRAS DE SILO DE MAÍZ 181

1. INTRODUCCIÓN **181**
2. PARTE EXPERIMENTAL **183**
2.1. Patrones empleados. Preparación de las soluciones de trabajo 183
2.2. Fortificación de la muestra 184
2.3. Procedimientos de extracción y purificación utilizados 184
2.4. Preparación de las curvas de calibrado 186
2.5. Detección y cuantificación mediante LC-MS/MS 187
2.5.1. Preparación de fases móviles 187
2.5.2. Condiciones cromatográficas y del detector de masas empleadas 187
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS **187**
3.1. Optimización de las condiciones del LC-MS/MS 187
3.2. Evaluación del método de extracción 191
3.2.1. Evaluación de la eficacia 192
3.2.2. Evaluación del efecto matriz 195
3.3. Parámetros de calidad del método 198
3.3.1. Linealidad y límites de detección y cuantificación 198
3.3.2. Exactitud y precisión 200
3.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad 201
3.3.4. Límite de decisión (CCα) y capacidad de detección (CCβ) 202
4. BIBLIOGRAFÍA **207**

IV.D. DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE SILO DE MAÍZ DE EXPLOTACIONES GALLEGAS 211

1. INTRODUCCIÓN **211**
2. PARTE EXPERIMENTAL **213**
2.1. Selección de las explotaciones y muestreo de los silos de maíz 213
2.2. Procedimiento de extracción, detección y cuantificación de micotoxinas en las muestras de silo de maíz 214
2.3. Patrones empleados, soluciones de trabajo y preparación de las curvas de calibrado 214
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS **216**
4. BIBLIOGRAFÍA **222**

V. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES **225**

VI. ANEXOS **235**

ABSTRACT / RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABSTRACT / RESUMEN

In many parts of the world, corn silage is one of the most important feed sources for ruminants, constituting between 50-75% of the dry matter intake for dairy cows. In Galicia particularly, silage is used by more than 50% of the dairy farms. Unfortunately, some fungi have the ability to grow in corn forage during cultivation and ensilage, producing complex organic compounds called mycotoxins. Therefore, corn silage could be considered the diet constituent that supplies the bulk of mycotoxin ingestion in dairy cows. These toxins can cause acute and chronic effects on animal and human health and reduce productivity in farms.

Worldwide data on the incidence of mycotoxins in corn silage suggests that this route of exposure should not be underestimated and that more information on this issue is needed. For this reason, the work presented was aimed at assessing the incidence and stability of *Fusarium* mycotoxins in corn silage, optimising and validating a multi-mycotoxin method and finding out what the contamination level of mycotoxins is in corn silage from Galicia.

To achieve the first objective, two experiments were scheduled, both with plants contaminated with *Fusarium* species (fungi most frequently isolated in Spanish corn grain). The incidence and the stability of Fumonisins, Deoxinivalenol and Zearalenone were studied during the ensiling process in laboratory silos as in conventional silos. In laboratory conditions, factors such as the effects of inoculants and the ensiling time were assessed, while in conventional silos, the location of the sample in the silo was considered. The occurrence of modified forms of fumonisins was also investigated. Development of appropriate analytical methodologies was carried out to detect and quantify those *Fusarium* mycotoxin*s* in the corn silages. In laboratory silos, the ensiling time has shown to be a significant factor for the evolution of free fumonisin B_1 and B_2 at the second harvest date. Moreover, the use of inoculant *Lactobacillus Buchneri* had a significant effect on the stability of modified and total (free + modified) fumonisin B_1 at two harvest dates. Samples previously ensiled and exposed to aerobic conditions for seven days have shown higher fumonisins levels than those not exposed to air. For both harvests dates and with both inoculants, the deoxynivalenol content decreased during the ensiling process, whereas the zearalenone amount remained practically constant except for the treatment *Lactobacillus Buchneri* in the second harvest, for which a 50% increase in zearalenone concentration during the storage time was observed. Higher amounts of fumonisins and zearalenone were detected on the top of the conventional silos. Comparing the concentrations of mycotoxins between raw corn and corn silage contained in the bags, it was possible to confirm that the decrease rate for zearalenone and fumonins was higher in the lowest layer of the silo, whereas the deoxynivalenol content was mainly reduced in the higher parts corresponding to the initial section of the silo. The results showed that 65% and 39% of the total of fumonisin B_1 and B_2 contents in laboratory silos and 79% and 69 % of the total of fumonisin B_1 and B_2 contents in conventional silage were due to their modified forms.

The European Union (EU) has adopted rules limiting the maximum levels of mycotoxins in feedingstuffs. Since these regulations cover several mycotoxins and their simultaneous

occurrence is commonplace, the European Food Safety Authority (EFSA) recommends developing multi-mycotoxin methods. The co-occurrence of several mycotoxins in silages then creates the need for multi-mycotoxin methods that should be properly validated for silages. Considering this fact, a multi-mycotoxin method for the detection and quantification of mycotoxins in corn silage by liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer was developed and validated in this Thesis.

As mycotoxin contamination in feed can have negative economic repercussions with immediate effect on animal health and productivity, the prevention of the presence of mycotoxins in silage should be required. Accordingly, another aim in the work presented was to assess the mycotoxin contamination 148 in corn silage samples from 18 Galician dairy farms by using the multi-mycotoxin method validated. 62 % of the analysed samples contained at least one mycotoxin. Zearalenone, deoxynivalenol, fumonisins B_1 and B_2, roquefortine C, α-Zearalenol, β-Zearalenol, Enniantin B and B_1, andrastin A, marcfortine A, verruculogen and mycophenolic acid were quantified, the highest average detection frequency being for Enniantin B (51 %). Deoxynivalenol, mycophenolic acid and zearalenone plus metabolites (α-Zearalenol, β-Zearalenol) were the most abundant mycotoxins.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En muchas partes del mundo, el silo de maíz es una de las más importantes fuentes de alimentación para rumiantes, constituyendo entre un 50-75% de la ingesta de materia seca en las vacas lecheras. Particularmente en Galicia, el silo es usado en más de un 50% de las explotaciones lácteas. Por desgracia, ciertos hongos tienen la habilidad de crecer en el maíz durante su cultivo y su ensilado, produciendo unos complejos compuestos orgánicos llamados micotoxinas. Por tanto, el silo de maíz puede ser considerado como el constituyente de la ración que aporta la mayor parte de micotoxinas ingeridas por las vacas de leche. Estas toxinas pueden ocasionar efectos perjudiciales agudos y crónicos en la salud animal y humana, y reducir la productividad en las explotaciones.

Los datos de incidencia de micotoxinas en ensilados de maíz a nivel mundial indican que esta ruta de exposición no debe ser subestimada y que más información en este campo es necesaria. Por este motivo, el trabajo que se presenta tenía como objetivos: evaluar la incidencia y la estabilidad de micotoxinas del *Fusarium* en silo de maíz, optimizar y validar un método multi-micotoxinas y conocer el nivel de contaminación de micotoxinas en ensilados de maíz de Galicia.

Para conseguir el primero de los objetivos, se plantearon dos ensayos, ambos con plantas de maíz contaminadas con especies del *Fusarium* (hongo aislado con mayor frecuencia en maíz grano en España). La incidencia y estabilidad de las fumonisinas, del deoxinivalenol y de la zearalenona se estudiaron durante el proceso de ensilado en silos de laboratorio y en silos convencionales. En condiciones de laboratorio se evaluaron factores como el efecto del uso de inoculantes y el tiempo de ensilado, mientras que en los silos convencionales, se estudió la localización de la muestra en el silo. También se investigó la posible ocurrencia de formas modificadas de fumonisinas. Se llevó a cabo el desarrollo de un método analítico adecuado para detectar y cuantificar las micotoxinas del *Fusarium* en los silos de maíz. En silos de laboratorio, el tiempo de ensilado resultó ser un factor significativo en la evolución de la fumonisinas B_1 y B_2 en sus formas libres durante la segunda cosecha. El uso del inoculante *Lactobacillus Buchneri* tuvo efecto significativo en la estabilidad de la fumonisina B_1 en su forma modificada y total (libre + modificada) para las dos fechas de cosecha. Las muestras de silo de laboratorio bajo deterioro aeróbico durante siete días mostraron niveles más altos de fumonisinas que aquellas que no habían sido expuestas al aire. Para las dos cosechas y con ambos inoculantes, el contenido de deoxinivalenol disminuyó a lo largo del proceso de ensilado, mientras que la zearalenona permaneció prácticamente constante excepto para el tratamiento con *Lactobacillus Buchneri* en la segunda cosecha, para el cual se observó un aumento de un 50% en la concentración de zearalenona durante el tiempo de almacenamiento. Las mayores cantidades de fumonisinas y de zearalenona se detectaron en las capas superiores de los silos trinchera. Comparado las concentraciones de micotoxinas entre el maíz fresco y el maíz ensilado dentro de los sacos, se pudo confirmar que la tasa de disminución para la zearalenona y las fumonisinas era mayor en las partes más bajas del silo, mientras que el contenido en deoxinivalenol mostraba una mayor reducción en la capa superior de la sección inicial del silo trinchera. Los resultados obtenidos demostraron que el 65% y 39% del contenido total en fumonisina B_1 and B_2 en los silos de laboratorio y el 79% y 69 % del total de fumonisina B_1 and B_2 en silos trinchera, era debido a las formas modificadas.

La Unión Europea (UE) ha adoptado normas que limitan los niveles máximos de las micotoxinas en alimentación destinada a animales. Debido a que dichas regulaciones

contemplan varias micotoxinas y a que es muy común la aparición simultánea de éstas en un mismo alimento, la Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA), recomienda que se desarrollen métodos multi-micotoxinas. Así, la co-ocurrencia de varias micotoxinas en ensilados crea la necesidad de que los métodos mult-micotoxinas para silos estén debidamente validados. Teniendo esto en cuenta, en esta tesis se desarrolló y validó un método multi-micotoxinas para la detección y cuantificación de micotoxinas en silo de maíz empleando la cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas.

Dado que la contaminación con micotoxinas en alimentos para animales puede tener una repercusión económica negativa inmediata a través del su efecto sobre la salud animal y la productividad, se debería prevenir la presencia micotoxinas en los ensilados. Por consiguiente, otro de los objetivos de este trabajo fue evaluar la contaminación de micotoxinas en 148 muestras de silos de maíz procedentes de 18 explotaciones gallegas, mediante el uso del método multi-micotoxinas validado. Un 62% de las muestras analizadas contenían al menos una micotoxina. Zearalenona, deoxinivalenol, fumonisina B_1 y B_2, roquefortina C, α-Zearalenol, β-Zearalenol, eniantina B y B_1, andrastina A, marcfortina A, verruculogen y ácido micofenólico fueron detectados, siendo la eniantina B la más frencuente (51%) y el deoxinivalenol, ácido micofenólico, la zearalenona y sus metabolitos (α-Zearalenol, β-Zearalenol) las más abundantes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I.A. HONGOS MICOTOXIGÉNICOS Y MICOTOXINAS

Las micotoxinas, del griego antiguo *mukus* (hongo) y del latín *toxicum* (veneno), son metabolitos secundarios tóxicos producidos de forma natural por ciertos hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium, Alternaria* y *Claviceps*. Algunos de estos hongos pueden ser ocasionados por factores como la climotología, resistencia genética de los cultivos y malas condiciones de transporte y almacenamiento, lo que se traduce en una posible contaminación con micotoxinas en cualquier punto de la cadena alimentaria: cosecha, recolección, almacenamiento, transporte, elaboración y/o conservación [1,2].

Dada su toxicidad, no es de extrañar que la presencia de estas toxinas fúngicas reduzca el valor nutricional de los alimentos y que su exposición pueda causar efectos perjudiciales sobre la salud animal y humana, además de reducir la productividad en las explotaciones [3].

La contaminación de productos alimenticios y agrícolas por hongos micotoxigénicos es un grave problema a nivel mundial y dichos hongos han sido reconocidos como unos de los contaminantes más peligrosos en alimentos y en piensos. Según ha estimado las Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) un 25% de los cultivos en todo el mundo se ven afectados por micotoxinas. Esta contaminación supone un fuerte impacto económico y comercial, siendo las pérdidas asociadas de miles de millones de dólares [4].

A pesar de que existen cientas descritas hasta ahora, el número de real de micotoxinas en alimentación animal queda aún por determinar y nuevos metabolitos fúngicos se siguen descubriendo [5].

Tratando de mantener los niveles de micotoxinas por debajo de los niveles que entrañarían riesgo para la salud, la Unión Europea ha aprobado ciertas normas que regulan su máximo contenido permitido en alimentos destinado a consumo humano y animal.

La adopción de medidas de prevención y control a lo largo del la cadena productiva de alimentos, así como informar de los riesgos tanto a productores como a consumidores, serían alguna de las medidas para combatir la contaminación con micotoxinas.

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Las evidencias de que ciertas sustancias producidas por hongos eran potentes venenos se remontan a la Edad Media cuando en Europa una serie de epidemias causan la muerte de miles de personas. Tales epidemias eran provocadas por el ergotismo, enfermedad más comúnmente conocida como "fiebre de San Antonio", "fuego de San Antonio" o "fuego del infierno". La posible razón de esta micotoxicosis estaba atribuida a la ingesta de harina contaminada con ergot o cornezuelo (*Claviceps purpurea*), hongo que afectaba principalmente al centeno. Los síntomas comenzaban en las extremidades con la sensación de un frío intenso y repentino que posteriormente se convertía en una quemazón aguda. Alucinaciones, convulsiones, espasmos, manías, eran algunos de los efectos provocados por

el envenenamiento. El clero llegó a relacionar comportamientos provocados por este ergotismo convulsivo con un castigo divino a los pecadores.

Además, las micotoxinas del cornezuelo también provocaban necrosis de los tejidos y aparición de gangrena, dejando a gran parte de las victimas mutiladas. En el caso de mujeres embarazadas llegaba a provocar abortos.

Ante el elevado número de casos de intoxicaciones con el ergot, los frailes de la orden de San Antonio deciden crear hospitales en Centroeuropa dedicados exclusivamente a los enfermos con ergotismo gangrenoso. El único remedio conocido en el Medievo consistía en la peregrinación de las personas afectadas a Santiago de Compostela [6]. Uno de los hospitales que se encontraban a lo largo del peregrinaje a Santiago era el del monasterio de San Antón de Castrojeriz (Burgos), curaba a los enfermos durante su estancia ofreciéndoles un producto local: el pan de trigo candenal. La explicación es sencilla: este trigo estaba desprovisto de Claviceps por lo que sin quererlo producía la curación a todos los que hacían el camino.

Es en el año 1951 cuando otro brote de ergotismo causa en Francia el fallecimiento de 5 personas. Más recientemente en Etiopía, durante el 1977-1978, 140 personas fueron víctimas del ergotismo gangrenoso con una elevada tasa de mortalidad que llegó a alcanzar el 34% [4]. La causa de este brote se asoció a una larga estación húmeda en la que el crecimiento del *Claviceps purpurea* en cultivos de avena se vio favorecido.

Figura I.A.1. Pintura de Brueghel que ilustra los efectos del ergotismo

Otra micotoxicosis encontrada hace décadas es la denominada Aleukia, común en la ex Unión Soviética durante los años 1930 y 1940 cuando el *Fusarium* contaminó harina de trigo causando una intoxicación alimentaria con una tasa de mortalidad del 60%. Es a raíz de este acontecimiento cuando los soviéticos inician una serie de investigaciones con fines médicos, al mismo tiempo que se plantean la utilización del *Fusarium* como un elemento en el Guerra biológica.

Entre los años 1975 y 1979 empiezan a llegar informaciones desde Laos, Camboya y Afganistán acerca del uso de armas biológicas. Médicos, periodistas y victimas describían la presencia de una lluvia oleosa de color amarillo, que denominaban “lluvia amarilla” que se presume causó 6300 muertes en dichos países entre 1974 y 1981. La naturaleza tóxica de este material resistió varios intentos de caracterización. Existían sospechas de que el principal ingrediente activo era la toxina T-2, micotoxina perteneciente al grupo de los tricotecenos. Sin embargo, la composición de la llamada “lluvia amarilla” está aún sujeto a debate y se plantea la posibilidad de más micotoxinas además de la toxina T-2 [7].

Los estudios sobre micotoxinas y las enfermedades provocadas por ellas comenzaron hace relativamente poco, cuando a principios de la década de los 60 científicos británicos extraen una molécula altamente tóxica del hongo *Aspergillus flavus*. Las investigaciones surgieron a partir la muerte repentina de casi cien mil pavos en Escocia en el año 1960. La enfermedad fue denominada la “Enfermedad X de los Pavos” [8]. Científicos de la época

ante la sospecha de una posible intoxicación alimentaria realizaron estudios de la harina de maní importada de Brasil con la que se alimentaba a los pavos. Se consigue entonces aislar una sustancia producto del crecimiento del *Aspergillus flavus* que al ser suministrada a animales sanos producía una síntomas similares a los producidos por la extraña enfermedad. Se identifican así las aflatoxinas, potentes agentes tóxicos que pueden causar la enfermedad o incluso la muerte en humanos y animales. Este descubrimiento llevó a un aumento de la conciencia acerca de la peligrosidad que entrañan estos contaminantes en alimentos y piensos.

Teniendo en cuenta el incremento de conocimientos en el campo de las micotoxina alcanzado a hasta ahora, una adecuada correlación de las micotoxinas encontradas y detectadas actualmente con aquellas documentadas por los brotes históricos, podría ayudar al hallazgo de nuevas micotoxinas en el futuro.

2. HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS

Los hongos se reproducen por medio de esporas. En el caso de los cereales, estas esporas reciben el nombre de conidias y pueden encontrarse latentes por largos períodos de tiempo, meses e incluso años. Cuando las condiciones ambientales, humedad y temperatura, son las favorables, las esporas germinan produciendo células alargadas llamadas hifas, que a su vez se ramifican dando lugar a lo que se conoce como micelio [9].

Se podrían agrupar los hongos en dos grupos: los hongos de campo y los hongos de almacenaje. Las especies de hongos micotoxigénicos encontradas en el campo, difieren según el clima, la posición geográfica y el tipo de vegetal al que contaminan, siendo algunas de las más comunes: *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium* y *Verticillium.* Los hongos de campo que contaminan granos y semillas requieren condiciones de humedad alta para crecer (20-21%) y un amplio rango de temperaturas que oscila entre los 0 y los 30°C. Pero el desarrollo fúngico puede continuar después de la cosecha y los hongos invadir así los granos y semillas durante su almacenamiento. Los hongos presentes en los productos almacenados corresponden principalmente a las especies *Aspergillus* y *Penicillium.* Estos en cambio requieren menor humedad para crecer (15-20%) con un rango de temperaturas más amplio (0-45°C) [10].

Es importante destacar, que además de factores como la humedad y la temperatura, el crecimiento fúngico depende siempre del tipo de especie. Los principales hongos productores de micotoxinas pertenecen a los géneros: *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* [11].

Factores como la temperatura, el pH, la actividad del agua, la composición química, así como la presencia de insectos, las interacciones entre la planta y el hongo y ciertos químicos tienen gran influencia en la proliferación de los hongos y en la síntesis de micotoxinas [12].

En la tabla siguiente se dan algunas de las principales micotoxinas y varias de las especies de los hongos que las producen:

Tabla I.A.1. Principales micotoxinas y algunas de sus especies productoras

Micotoxina	Especies productoras
Ácido cilclopiazónico	*Aspergillus flavus, A. tamarii, A. versicolor, Penicillum commune*
Ácido fusarico	*Fusarium moniliforme*
Ácido micofenólico	*Penicillum roqueforti, P. stoloniferum*
Ácido penicílico	*Aspegillus ochraceus, Penicillum roqueforti, P. aurantiogriseum, P. janczewskii*
Aflatoxinas	*Aspergillus flavus, A. nomius, A. parasiticus*
Alcaloides del ergot	*Claviceps purpurea*
Alternariol	*Alternaria alternata*
Andrastina A	*Penicillum roqueforti, P. albocoremium*
Beauvericina	*Fusarium avanaceum, F. culmorum, F.equiseti, F. moniliforme, F. nivale*
Bovericina	*Fusarium proliferatum, F.subglutinans, F. verticilloides*
Citrina	*Aspergillus carneus, A. terreus, Penicillium citrinum, P. hirsutum, P. verrucosum*
Deoxinivalenol	*Fusarium moniliforme, F. culmorum, F. avenaceum, F. graminearum, F. nivale*
Eniatinas	*Fusarium moniliforme, F. avenaceum, F. roseum, F.solani, F. nivale*
Esterigmatocistina	*Aspergillus flavus, A. nidulans, A. versicolor, A. parasiticus*
Fumigaclavinas	*Aspergillus fumigatus*
Fumitremorginas	*Aspergillus fumigatus*
Fumonisinas	*Fusarium verticilloides, F. proliferatum, F. nygamai*
Fusaproliferina	*Fusarium proliferatum, F. subglutinans*
Fusarenona X	*Fusarium graminearum, F. culmorum*
Gliotoxina	*Alternaria, Aspergillus fumigatus, Penicillium*
Marcfortinas	*Penicillium roqueforti, P. paneum*
Moniliformina	*Fusarium moniliforme, F.avenaceum, F. oxysporum, F.culmorum, F. nivale*
Neosolaniol	*Fusarium moniliforme, F. solani, F. culmorum, F.avenaceum, F. roseum*
Nivalenol	*Fusarium moniliforme, F. culmorum, F. avenaceum, F. oxysporum, F. nivale, F.equiseti*
Ocratoxinas	*Aspergillus ochraceus, Penicillum verrucosum, P. viridictum*
Patulina	*Aspergillus clavatus, Penicillium expansum, P. griseofulfum, P. roqueforti*
Penitrem A	*Penicillium crustosum*
Roquefortinas	*Penicillium roqueforti*
Toxina HT-2	*Fusarium moniliforme, F. culmorum, F. avenaceum, F. nivale, F. poae*
Toxina PR	*Penicillium roqueforti*
Toxina T-2	*Fusarium moniliforme, F. avenaceum, F. culmorum, F. nivale, F.poae, F. equiseti*
Verruculogen	*Aspergillus fumigatus, Penicillum verruculosum, Stachybotrys chartarum*
Zearalenona	*Fusarium culmorum, F. graminearum, F.equiseti, F. cerealis, F. heterosporum*

2.1. Factores que afectan al crecimiento fúngico en el campo

Además de las condiciones climáticas, las prácticas culturales como la rotación de cultivos, el laboreo, la elección de la fecha de siembra y cosecha, la fertilización, le elección de variedades resistente y el control de plagas y malas hierbas, afectan significativamente en el crecimiento de las esporas fúngica en el campo. Estas prácticas agronómicas ayudan a

reducir la infestación por parte de hongos toxigénicos y la consiguiente producción de micotoxinas, pero no consiguen erradicarlas en su totalidad [13]:

- *Rotación de cultivos y cultivo del suelo*. La siembra de cultivos similares o monocultivo [14], así como las técnicas de mínimo laboreo [15], suponen la transferencia de esporas fúngicas en cultivos posteriores. Esto permite el desarrollo del hongo e incrementa el riesgo de conminación con micotoxinas.
- *Fecha de siembra y de cosecha*. En los climas templados, la separación de la floración y de la esporulación mediante siembras tempranas reduce a menudo la contaminación [14]. También es recomendable recoger pronto [16-18], ya que el agua disponible en el grano puede ayudar al crecimiento fúngico [19].
- *Variedad de los cultivos*. Existen ciertas variedades de cultivos cuyas características las hacen más resistentes a enfermedades por hongos.

2.2. Factores que afectan al crecimiento fúngico durante el almacenaje

Una vez finalizada la cosecha, los hongos continúan desarrollándose, pudiendo estar presentes en los productos a lo largo de su almacenaje. Algunos de los factores que afectan al crecimiento fúngico y a la consiguiente producción de micotoxinas en productos almacenados: el contenido en agua, la temperatura, oxígeno y concentración de dióxido de carbono, el substrato, el grado de invasión fúngica y la presencia y actividad de ciertos insectos [9,20].

- **Actividad del agua (a_w).** Se refiere al contenido de humedad total o agua de un determinado producto que está libre y disponible para el crecimiento de microorganismos. Este es uno de los factores más importantes que se ha de controlar para prevenir la proliferación de hongos. El crecimiento de los hongos micotoxigénicos se produce cuando el contenido de a_w oscila entre 0,79 y 0,99 [21], siendo dicho contenido en agua libre mayor cuanto mayor es la temperatura.
- **Temperatura.** Es junto a la actividad del agua uno de los principales factores que influyen en la producción de micotoxinas. Por lo general, la proliferación de los hongos será menor cuanto menor sea la temperatura y la cantidad de agua disponible [21]. Los hongos presentes en productos almacenados requieren unas temperaturas comprendidas entre los 0 y 45°C para su desarrollo, siendo la temperatura óptima de 20-25°C.
- **pH y oxígeno.** La acidez del substrato es otro de los factores que ha tenerse en consideración. El desarrollo fúngico se produce a valores de pH entre 4 y 8, si bien es cierto, que algunos hongos pueden crecer a valores más altos o más bajos, modificando la acidez del medio durante su desarrollo [9]. La proliferación de los hongos también está regulada por la concentración de oxígeno presente en el medio. Por lo general, los hogos son organismos aeróbicos y como tal, se desarrollan en presencia de oxígeno. De modo general, el almacenamiento en condiciones anaeróbicas y ácidas (con bajos valores de pH) inhibiría el crecimiento fúngico evitando así la producción de micotoxinas
- **Insectos y ácaros:** se trata de factores biológicos que además de producir daños físicos y pérdida de nutrientes, pueden actuar como vectores de esporas fúngicas, favoreciendo así el ingreso de los hongos en vegetales. Además, su actividad metabólica contribuye al

aumento del contenido de agua y temperatura de los productos infectados [21]. Por otra parte, la presencia de insectos sirve para diferenciar entre especie de hongos: una especie de hongo concreta viene determinada por un insecto en particular.

3. MICOTOXINAS: QUÍMICA Y TOXICIDAD

Las micotoxinas son compuestos de bajo peso molecular, normalmente estables y con estructura química, actividad biológica y toxicologías muy diversas. Desde la década de los sesenta hasta la fecha, unos 400 tipos de micotoxinas han sido caracterizadas y agrupadas según su composición química. Se encuentran principalmente en productos agrícolas, como los cereales, pudiendo llegar a productos animales a través del consumo de alimentos o piensos contaminados [4].

Una misma micotoxina puede ser producida por distintas especies fúngicas. Mientras la presencia de un hongo no siempre implica la existencia de una micotoxina, una vez que ésta haya sido formada, permanecerá en el alimento a pesar de que el hongo haya desaparecido. Por otra parte, una misma especie fúngica puede producir más de una micotoxina lo que resultaría en la aparición simultanea de varias toxinas en un mismo alimento con posibles efectos sinérgicos en algunos casos.

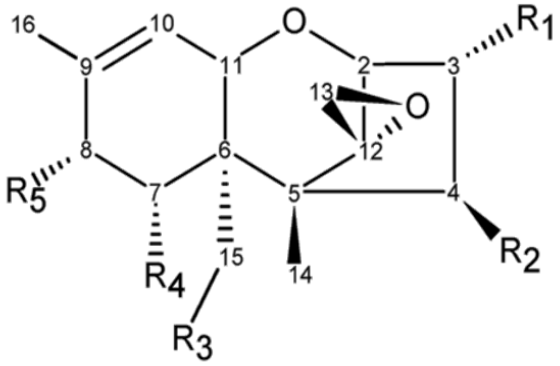
3.1. Especies productoras y estructura química

3.1.1. Tricotecenos

Los tricotecenos son una amplia familia de micotoxinas con estructura química de sesquiterpenos caracterizados por un doble enlace en los carbonos C_9 y C_{10} y por un grupo epóxido entre los C_{12} y C_{13} (tetracíclico, 12, 13-epoxitricotec-9-eno). En función de los grupos funcionales, están divididos en cuatro grupos (A, B, C y D) [22].

Los tricotecenos Tipo A están principalmente representados por la toxina T-2 (T-2) y la toxina HT-2 (HT-2), producidas por hongos de las especies *Fusarium poae, F. sporotrichioides y F. acuminatum* y tricotecenos Tipo B están representados por micotoxinas como el deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) y el nivalenol (NIV), producidos principalmente por *F. graminearum y F. culmorum* [23]. Desde el punto de vista químico, los tricotecenos Tipo B se distinguen de los del Tipo A, por la presencia de un grupo acetónico en el C_8 y por el mayor número de grupos hidroxílico en la molécula, lo que convierte a los tricotecenos Tipo A en compuesto menos polares [22]. Los tricotecenos aparecen a valores de temperatura entre los 2 y los 28 °C y cuando la actividad de agua está por encima de 0,92.

Debido a su elevada presencia en los cultivos cereales en Europa, se ha sugerido el uso del DON como indicador de contaminación de otras micotoxinas del *Fusarium* [24]. El DON tiene un punto de fusión comprendido entre los 151 y 153 °C y cristaliza en forma de agujas blanquecinas. Se solubiliza fácilmente en agua y también en disolventes polares como el metanol, acetato de etilo y acetonitrilo, donde es altamente estable [22].



Tricoteceno	R1	R2	R3	R4	R5
		Tipo A			
T-2	OH	OAc	OAc	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
HT-2	OH	OH	OAc	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
		Tipo B			
NIV	OH	OH	OH	OH	O
DON	OH	H	OH	OH	O
3-ADON	OAc	H	OH	OH	O
15-ADON	OH	H	OAc	OH	O

Figura I.A.2. Estructura química de los tricotecenos

3.1.2. Zearalenona

La zearalenona (ZEA) es uno metabolito estrogénico no esteroideo producido por distintas especies del *Fusarium* como *F. graminearum, F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. heterosporum* y es muy frecuente que aparezca simultáneamente con el DON. Es una de las micotoxinas más ampliamente distribuida y se encuentra a menudo en altas concentraciones, especialmente en el maíz [23]. Aunque suele ser producida en el campo, también aparecer durante el almacenaje de los productos viéndose favorecida en condiciones de alta humedad [24].

La ZEA es una lactona de ácido resorcílico [22], químicamente descrita como 3,4,5,6,9,10-hexahidro-14,16-dihidroxi-3-metil-2-2-benzoxaciclotetradecin,1,7-diona.

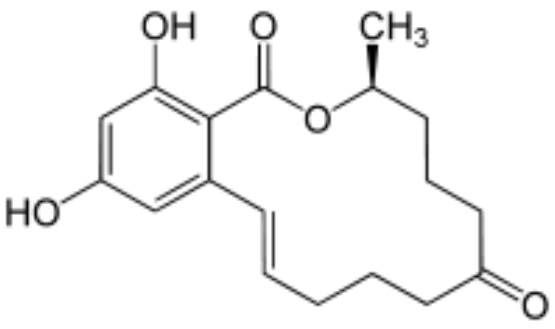


Figura I.A.3. Estructura química de la zearalenona

El grupo cetona del carbono C_8 puede ser reducido dando lugar a dos de sus más frecuentes metabolitos: α-zearalenol y β-zearalenol, estereoisómeros entre sí.

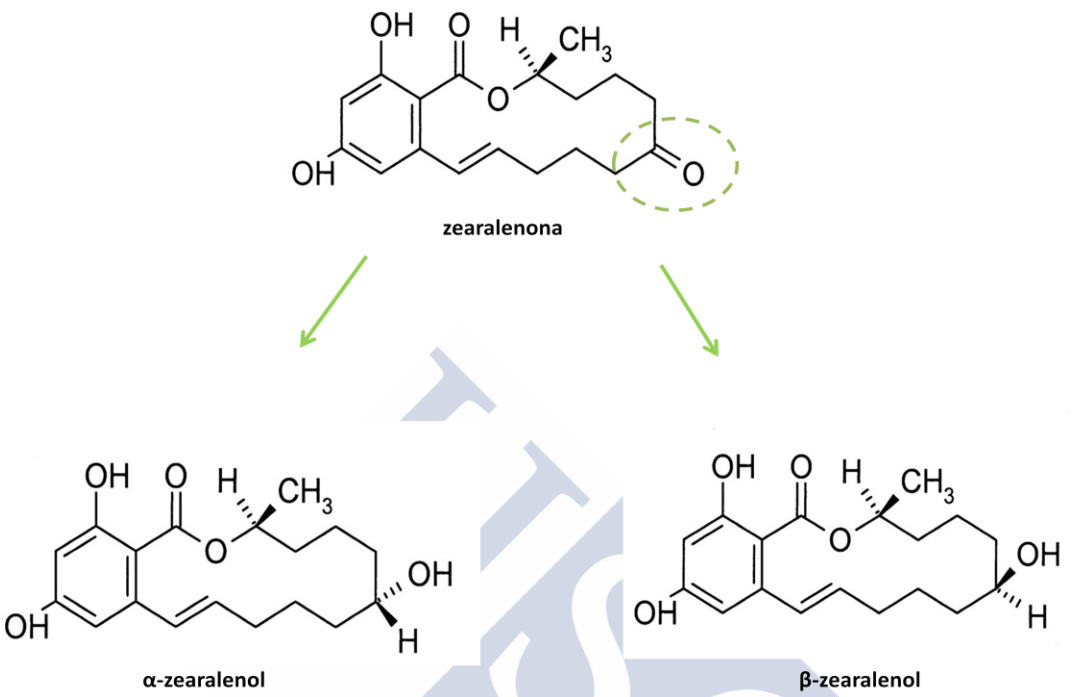
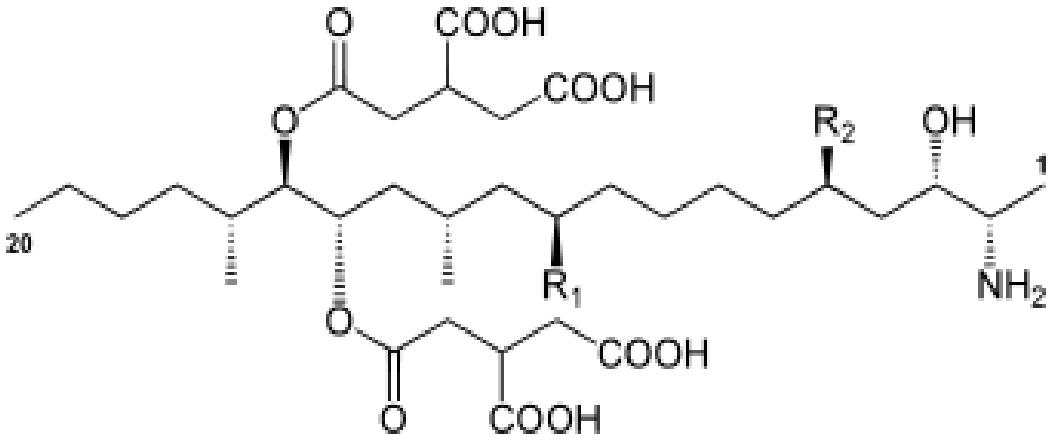


Figura I.A.4. Formación de los metabolitos α-zearalenol y β-zearalenol

Se trata de una sustancia cristalina de color blanquecino con un punto de fusión entre los 161 y 164 °C. Es prácticamente insoluble en agua pero sí se solubiliza en disolventes como éter dietílico, cloroformo, acetato de etilo, alcoholes, etc. La ZEA presenta fluorescencia azul-verde cuando es excitada por luz ultravioleta (UV) de longitud de onda larga y fluorescencia de color verde intenso cuando la longitud de onda es corta.

3.1.3. Fumonisinas y fumonisinas modificadas

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas principalmente producidas por *el F. verticilloides* y el *F. proliferatum*, que comúnmente infectan los cultivos de maíz. Aunque son varias las formas de fumonisinas identificadas hasta ahora, son las pertenecientes al Grupo B: Fumonisina B_1 (FB_1), Fumonisina B_2 (FB_2) y Fumonisina B_3 (FB_3) las más significativas [25]. Químicamente, se caracterizan por ser largas cadenas alquilaminas conteniendo varios grupos hidroxilo, dos de los cuales C_{14} y C_{15} son esterificados por el ácido propano-1,2,3-tricarboxílico. Al contrario de la FB_1, FB_2 y FB_3 no tienen grupos hidroxilo en el carbono C10. Las estructuras de FB_2 y FB_3 sólo difieren entre sí en la localización de uno de sus grupos hidroxilo [26].



Fumonisina	R1	R2
FB_1	OH	OH
FB_2	H	OH
FB_3	OH	H

Figura I.A.5. Estructura química de las fumonisinas

Las fumonisinas pueden sufrir modificaciones en su estructura química o interaccionar con distintos compuestos a lo largo de la cadena alimentaria. Tales modificaciones pueden ocurrir durante el metabolismo del hongo, durante las interacciones planta-patógeno (como protección contra xenobióticos) o durante la elaboración o procesamiento de alimentos (fermentación, calentamiento, extrusión) [27].

En tratamientos térmicos de procesamiento de alimentos, las modificaciones han sido atribuidas a la interacción, a través de enlaces covalentes, entre los grupos tricarboxílicos de las fumonisinas con el grupo hidroxilo de los hidratos de carbono o con los grupos amino o sulfhidrilo de las cadenas laterales de los aminoácidos [28]. Estos factores conducirían a la eliminación de los grupos tricarboxílicos de las moléculas de fumonisina, obteniéndose de este modo sus análogos hidrolizados, las fumonisinas hidrolizadas (HFB) [26, 29].

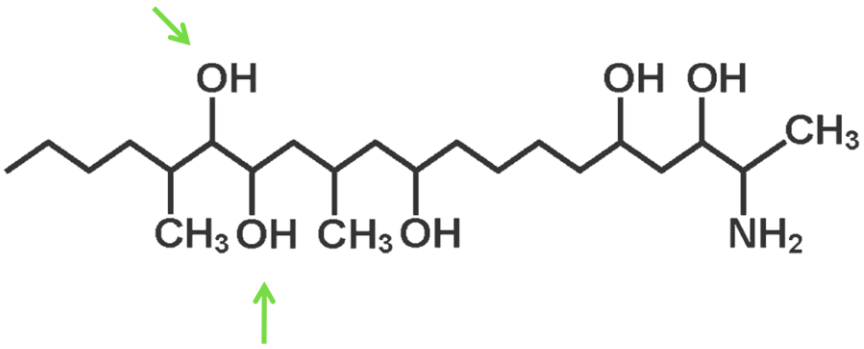


Figura I.A.6. Estructura química de la fumonisina B_1 hidrolizada

Sin embargo, investigaciones en maíz crudo sugirieron que dichas modificaciones también podían deberse a interacciones no covalentes [27]. Además, un reciente estudio en diferentes cepas de *Fusarium* informaba de una interacción física entre fumonisinas y los constituyentes de la matriz [30]. En las plantas, derivados de FB_1 obtenidos por esterificación con ácidos grasos han sido recientemente identificados, observándose una relación entre la cantidad de fumonisina esterificada y la proporción de ácido oleico y linoleico [31].

Así, ambas formas de fumonisinas, unidas covalente o no covalentemente a los componentes macromoleculares de la matriz, han sido recientemente denominadas fumonisinas modificadas [32].

Dado que estos derivados de las fumonisinas pueden también ser ingeridos con los alimentos y liberados durante la digestión, es importante el análisis de los mismos para evitar una posible subestimación del contenido total de fumonisinas.

3.1.4. Ocratoxina A

La ocratoxina A (OTA), es una micotoxina producida por algunas cepas de los hongos *Aspergillus ochraceus, A. carbonarius, A. niger y Penicillium verrucosum*; hongos que normalmente requieren altas temperaturas y elevada actividad de agua para su desarrollo.

Químicamente, la OTA es un derivado de la 3,4-dihidro metil isocumarina unida a través de un enlace amida a la *L*-β –fenilalanina: L-fenilalanina-N-[(5-8-hidroxi-dihidro-cloro-3.3-3-metil-1-oxo-1 h-2-benzopireno-7-il) carbonil]-(R)–isocumarina [33].

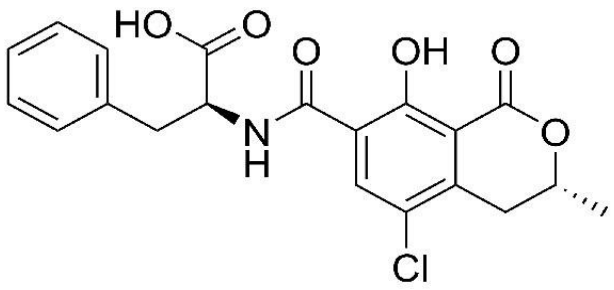


Figura I.A.7. Estructura química de la ocratoxina A

La ocratoxina es un ácido orgánico débil, con punto de fusión de 168 °C, muy estable y resistente altas temperaturas y acidez. Es un compuesto poco soluble en agua pero soluble en disolventes orgánicos como el acetato de etilo, metanol y acetonitrilo. Su punto de fusión es de 168 °C [34].

3.1.5. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas producidas por cepas de diferentes especies del género *Aspergillus*, principalmente por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las condiciones óptimas para el crecimiento de estos hongos son temperaturas suaves de entre 25 y 35 °C, una humedad ambiental de entre los 88 y 95% y una actividad de agua alta. Son micotoxinas

comunes en los productos agrícolas de los climas tropicales y subtropicales, pudiendo ocurrir antes y después de la cosecha [33, 34].

Desde el punto de vista químico, las aflatoxinas pertenecen al grupo de las difurano cumarinas, conteniendo anillos de bifurcación tipo lactona.

Son compuestos muy fluorescentes, térmicamente muy resistentes y sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C. Su solubilidad en agua es baja, teniendo que ser extraídas en disolventes moderadamente polares, como cloroformo o metanol.

Se han identificado varios tipos de aflatoxinas entre las cuales destacamos aflatoxinas del grupo B (B_1 y B_2) y aflatoxinas del grupo G (G_1, G_2). La designación G y B es debida a su capacidad para emitir fluorescencia bajo la luz ultravioleta: fluorescencia azul (*blue*) para las tipo G, y fluorescencia verde (*green*) para las tipo G.

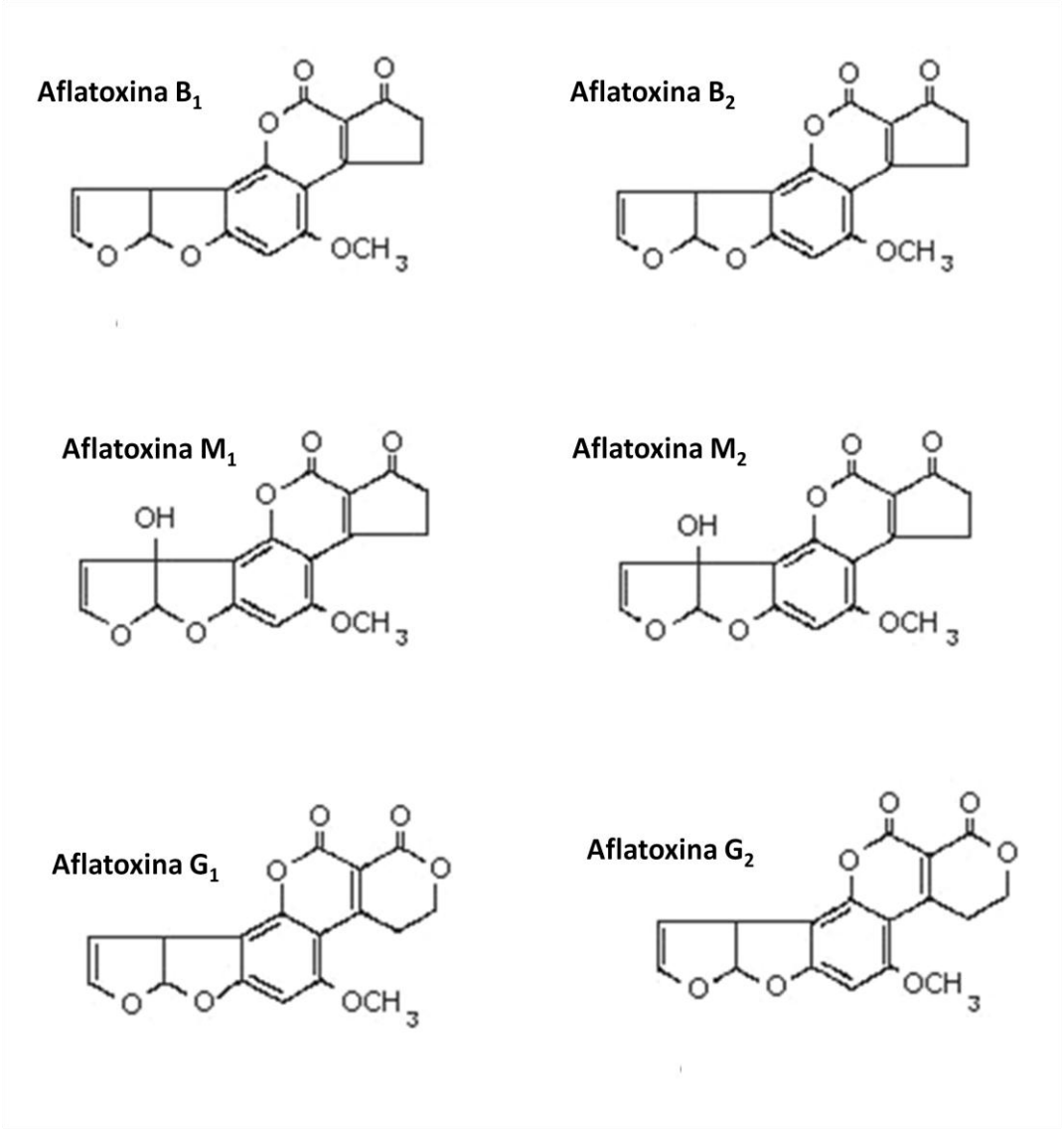


Figura I.A.8. Estructura química de las aflatoxinas de los grupos B, M, y G

Las aflatoxinas del grupo B se pueden metabolizar dando lugar a la aflatoxina M_1 y M_2, análogas de la aflatoxina B_1 y B_2 respectivamente. El metabolito M_1 aparece principalmente

en la leche y productos lácteos como consecuencia de la entrada de aflatoxina B_1 en la dieta animal. Para cada grupo, la designación 1 y 2 está relacionada con la movilidad cromatográfica relativa de los compuestos [34].

3.1.6. Micotoxinas del género *Penicillium*

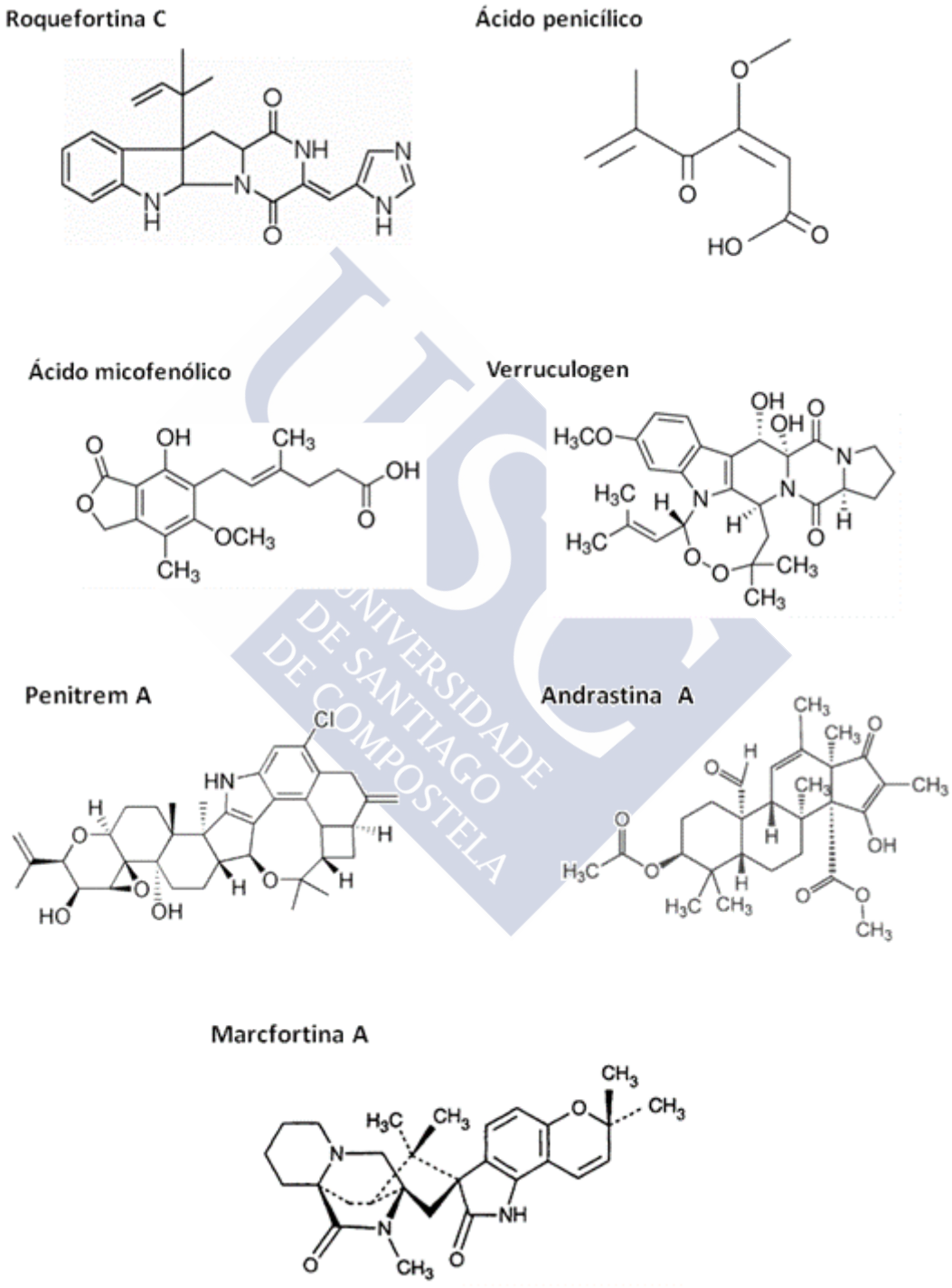


Figura I.A.9. Estructura química de las micotoxinas del *Penicillium*

Roquefortina C, ácido penicílico, ácido micofenólico y verruculogen son algunas de las micotoxinas producidas por distintas especies del género *Penicillium* [37]. La ROQ-C es producida principalmente por el hongo *Penicillium roqueforti,* el ácido micofenólico (MPA) del *P. stoloniferum* y el verruculogen (VERR) del *P. verruculosum*. El ácido penicílico (PA) se ha aislado de distintas especies del *Penicillium* como el *P. roqueforti, P. aurantiogriseum* y *P. janczewskii* [38].

Otras micotoxinas pertenecientes al género *Penicillium* son el penitrem A (PEN A), andrastina A (AND A) y la marcfortina A (MAC A), siendo esta última considerada como un biomarcador del *P. paneum* [39].

Todas estas micotoxinas pueden ser formadas rápidamente durante el transporte y almacenamiento.

3.1.7. Otras micotoxinas

Otras micotoxinas estudiadas en este trabajo son la esterigmatocistina, el alternariol y las eniantinas B y B_1.

La esterigmatocistina (STE) es producida principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus, A. versicolor* y *A. nidulans*. Está químicamente relacionada con la familia de las aflatoxina y es igual de estable que éstas [40].

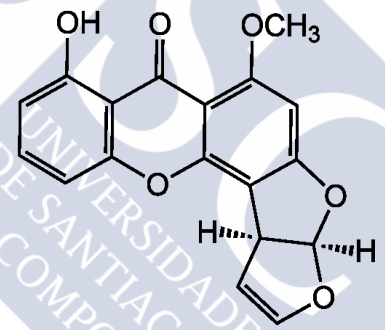


Figura I.A.10. Estructura química de la esterigmatocistina

Dentro del género *Alternaria*, *A. alternata* es considerada la especie productora de micotoxinas más habitual. Este tipo de hongos pueden dar lugar a una amplia variedad de compuesto, tales como el alternariol (AOH), cuya estructura química se muestra a continuación [39].

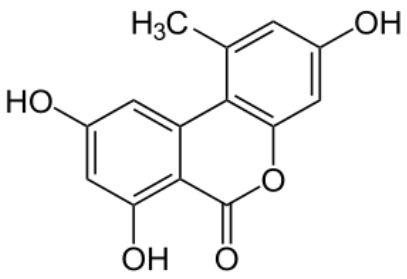


Figura I.A.11. Estructura química del alternariol

Por último, las eniantinas son producidas por diversas especies del género *Fusarium*, entre las que destacan *F. moniliforme*, *F. avenaceum*, *F. roseum*, *F. solani* y *F. nivale*, entre otras [23].

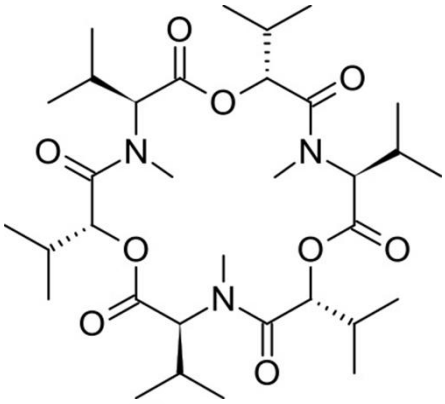


Figura I.A.12. Estructura química de la Eniantina B

3.2. Efectos de las micotoxinas sobre la salud y la productividad de las vacas de leche

Se conoce con el nombre de micotoxicosis a las intoxicaciones agudas o crónicas causadas por la exposición a micotoxinas que pueden afectar tanto al hombre como a los animales. Son consideradas enfermedades no transmisibles, con efectos teratogénicos, carcinogénicos y mutagénicos. Las micotoxicosis pueden ocurrir cuando se consumen directamente alimentos contaminados con micotoxinas (*micotoxicosis primaria*) o cuando se ingieren productos derivados de animales (leche, carne, huevos) que consumieron alimentos contaminado (*micotoxicosis secundaria*) [41].

Además del riesgo que suponen para la salud humana y animal, niveles elevados de micotoxinas también están asociados a pérdidas de la productividad de las explotaciones debidas a factores como la disminución de las ingesta, pérdida de peso vivo, disminución de la producción de leche e incremento de los costes veterinarios [3].

Los animales rumiantes, como las vacas de leche, son generalmente menos susceptibles a las micotoxicosis que los animales monogástricos, probablemente debido a la capacidad de la micoflora ruminal para desnaturalizar micotoxinas [3,42]. Sin embargo, esta metabolización parcial de las micotoxinas en el rumen también puede dar lugar a aparición de metabolitos nuevos y más tóxicos [43], causando la aparición de signos clínicos de intoxicación.

En el caso del ganado lechero, la presencia de varias micotoxinas en un mismo alimento, unido a la variedad composición de su dieta, aumentan los efectos negativos de la toxicidad debido a posibles efectos sinérgicos entre las distintas micotoxinas. En consecuencia, distinto síntomas clínicos como: desequilibrios hormonales y metabólicos, reacciones inflamatorias e inmunodepresión son observados, pudiendo desencadenar patologías como mamitis, desplazamiento del abomaso, laminitis o fiebre de la leche [43].

Algunas de las micotoxinas, que causan mayor preocupación por su toxicidad en rumiantes son los tricotocenos, ZEA, fumonisinas, aflatoxinas y la OTA.

3.2.1. Metabolismo y toxicidad de los tricotecenos

Durante el metabolismo ruminal, los tricotecenos son tranformados en distintos metabolitos no-tóxicos por medio de enzimas específicas (epoxidasas). La biotransformación implica la apertura de grupo epóxido característico de las moléculas del grupo de tricotecenos a través de una reacción de *de-epoxidación*.

Figura I.A.13. Reacción de *de-epoxidación* de tricotecenos

En el caso del DON, el metabolito es el 12, 13-de-epoxydeoxinivalenol o DOM-1 [44].

La toxina T-2 se metaboliza en un gran número de productos a través de diferentes biotransformaciones que incluyen hidrólisis, hidroxilación, de-epoxidación, acetilación y glucorinidación [45].

Por ejemplo, su carbono C_4 de la toxina T-2 puede ser acetilado dando lugar a su importante metabolito: toxina HT-2 [44].

De modo general, se considera que los animales rumiantes son menos susceptibles a los efectos de los tricotecenos, si bien es cierto que es el ganado lechero, el que debido al alto estrés al que está sometido, presenta una menor tolerancia [37]. Uno de los efectos más graves es la supresión del sistema inmunitario, ligada normalmente a la inhibición de las síntesis de macromoléculas [24].

Otros de los signos clínicos de toxicidad debidos la exposición a tricotecenos incluyen: reducción de la ingesta, disminución de la ganancia de peso y de la producción de leche, hemorragia intestinal, diarrea, gastroenteritis, daños en el hígado, etc. [9, 24].

Muy bajos niveles de DON y de su metabolito DOM-1 se han encontrado en la leche, lo que indica que la absorción de estas micotoxinas en el tracto digestivo es escasa y su transferencia a la leche es prácticamente insignificante [44]. DON no es considerado entonces un contaminante de la leche ni de sus derivados [46].

3.2.2. Metabolismo y toxicidad de la zearalenona

Los microorganismos del rumen, mediante una hidroxilación, transforman la ZEA en α-zearalenol (α-ZOL) y en menor proporción en β-zearalenol (β-ZOL). En rumiantes, esta biotransformación de la ZEA en sus metabolitos puede ocurrir tanto el rumen como en el hígado, debido a la presencia en ambos de los enzimas específicos. El α-ZOL es considerado cuatro veces más estrogénica que la micotoxina madre, mientras que el β-ZOL, a pesar de tener baja afinidad por los receptores del estrógeno, sí es tóxico para las células del

endometrio. A pesar de que ninguno de estos dos metabolitos han presentados efectos tóxicos sobre las bacterias ruminales, dada su actividad estrogénica, pueden provocar problemas reproductivos [44].

Principalmente, la ZEA presenta efectos negativos en la reproducción de los rumiantes, tales como: abortos, edema e hipertrofia genital en hembras pre-púberes, infertilidad e hipertrofia de la glándula mamaria en novillas vírgenes, vaginitis, secreciones vaginales, infertilidad en machos jóvenes, etc. [9]. En cambio, el nivel de transferencia de la ZEA y sus metabolitos a la leche es tan bajo, que no son considerados como micotoxinas de riesgo para los consumidores de leche o derivados lácteos [44]. Sin embargo, debida a la elevada toxicidad que presenta el metabolito α-zearalenol, su presencia en la leche debería ser tenida en cuenta [47].

3.2.3. Metabolismo y toxicidad de las fumonisinas

De entre todas las fumonisinas, es la FB_1 la que se presenta más frecuentemente. A diferencia de otras micotoxinas, la FB_1 apenas se ve afectada por la digestión ruminal siendo lenta y escasamente metabolizada en el rumen. Poco es conocido a cerca de los efectos de las fumonisinas en rumiantes [44]. Algunos de los signos clínicos de la toxicidad por FB_1 son: reducción en la producción de leche, aumento del índice de esfingosina, disminución de la ingesta de alimento, pérdida de peso del ganado, etc. [9].

Se estima que su tasa de transferencia a la leche es muy baja, aproximadamente un 0,05% [44] y como consecuencia poco es el riego de contaminación por FB_1 en leche y productos lácteos.

3.2.4. Metabolismo y toxicidad de la ocratoxina A

Durante el metabolismo ruminal, la molécula de OTA es sometida a la degradación microbiana por acción de enzimas (proteasas) capaces de hidrolizar péptidos. La OTA es entonces transformada en fenilalanina y en ocratoxina-α, presentando este último una toxicidad 500 veces menor que la OTA [44].

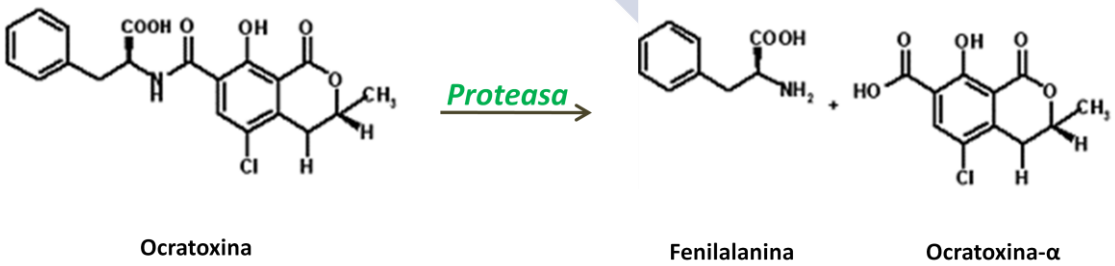


Figura I.A.14. Reacción de degradación de la ocratoxina

En la sangre, casi toda la OTA se encuentra ligada a proteínas, principalmente albúmina, afectando dicha interacción a la vida media de la toxina en el torrente sanguíneo [48]. En el caso de los rumiantes, la acumulación de OTA en sangre es baja comparada con otras especies [44]. La degradación de la OTA está estrechamente relaciona con la funcionalidad

del rumen, estando ésta relacionada con la cantidad de hidratos de carbono ingerido en la dieta. Se ha demostrado que la hidrólisis de la OTA en fenialanina y ocratoxina-α, es mayor cuando el silo de hierba y el heno son reemplazados por hierba y cuando se aumenta la cantidad de concentrado en la dieta animal [49].

La microflora del rumen parece ayudar a reducir la absorción de OTA, protegiendo de esta manera a los rumiantes contra los efectos tóxicos de esta micotoxina. Sin embargo, una ingesta crónica de alimentos contaminados con OTA podría suponer su acumulación en los tejidos animales con efectos perjudiciales en el ganado.

Algunos estudios sí han demostrado la existencia de OTA en leche de vaca [49,50]. En ellos la concentración encontrada era baja y no representaría riesgo para consumidores adulto, pero sí podría suponer un peligro en lactantes y niños, que son los que consumen leche con mayor frecuencia, además de ser más vulnerables [48].

Los efectos tóxicos más importantes en células animales incluyen inhibición de la síntesis de proteínas, daños en el ADN, efectos mutagénicos, peroxidación lipídica y estrés oxidativo [50]. Otros signos clínicos de la toxicidad por OTA son; edema pulmonar, nefrotoxicidad e incluso la muerte cuando la dosis ingerida es muy elevada (3 ppm) [9].

Una vez que la OTA es biotransformada en el rumen, sus metabolitos menos tóxicos son excretados en la orina y en las heces. Es por ello que la transferencia de la OTA a la carne y a la leche es poco frecuente en rumiantes. Sin embargo, algunos estudios sí han demostrado la existencia de OTA en leche de vaca [51,52]. En ellos, la concentración encontrada era baja y no representaría riesgo para consumidores adultos, pero sí podría suponer un peligro en lactantes y niños, que son los que consumen leche con mayor frecuencia, además de ser más vulnerables [48].

3.2.5. Metabolismo y toxicidad de las aflatoxinas

Dentro del grupo de las aflatoxinas, es la aflatoxina B_1 (AFB_1) la más relevante dada su elevada toxicidad y su potencial carcinogénico.

La AFB_1 es biodegradada en el rumen formándose su principal metabolito ruminal: aflatoxicol. Dado que este metabolito presenta mayor toxicidad que la toxina madre y que la degradación de la AFB_1 durante el metabolismo ruminal es menor, a diferencia de lo que ocurría con las micotoxinas estudiadas hasta ahora, los rumiantes no están protegidos contra los riesgos de la AFB_1 [44].

Por otro lado, la AFB_1 puede ser fácilmente absorbida en el tracto digestivo y posteriormente metabolizada a nivel hepático, resultando la formación de aflatoxina M_1 (AFM_1). Este metabolito puede ser excretado a través de la bilis o de los riñones o bien aparecer en la leche [2,33]. Al cabo de las 12 horas de la administración oral de AFB_1, la AFM_1 puede aparecer en leche, presentando un máximo de concentración a las 24 horas. La rápida absorción de AFB_1 en el tracto digestivo de los vacas, explica la rápida transferencia de AFM_1 a la leche [44].

Sin embargo, la tasa de transferencia varía de un animal a otro, de un día al día siguiente y entre ordeños, ya que se ve influenciada por factores fisiológicos y nutricionales, estado de salud, capacidad de transformación de cada individuo y de la producción real de leche [33].

Otros metabolitos, como el aflatoxicol, la aflatoxina M_4, la aflatoxina Q_1 y la forma hidroxilada de la aflatoxina B_2 (aflatoxina M_2), también han sido detectados en leche [44].

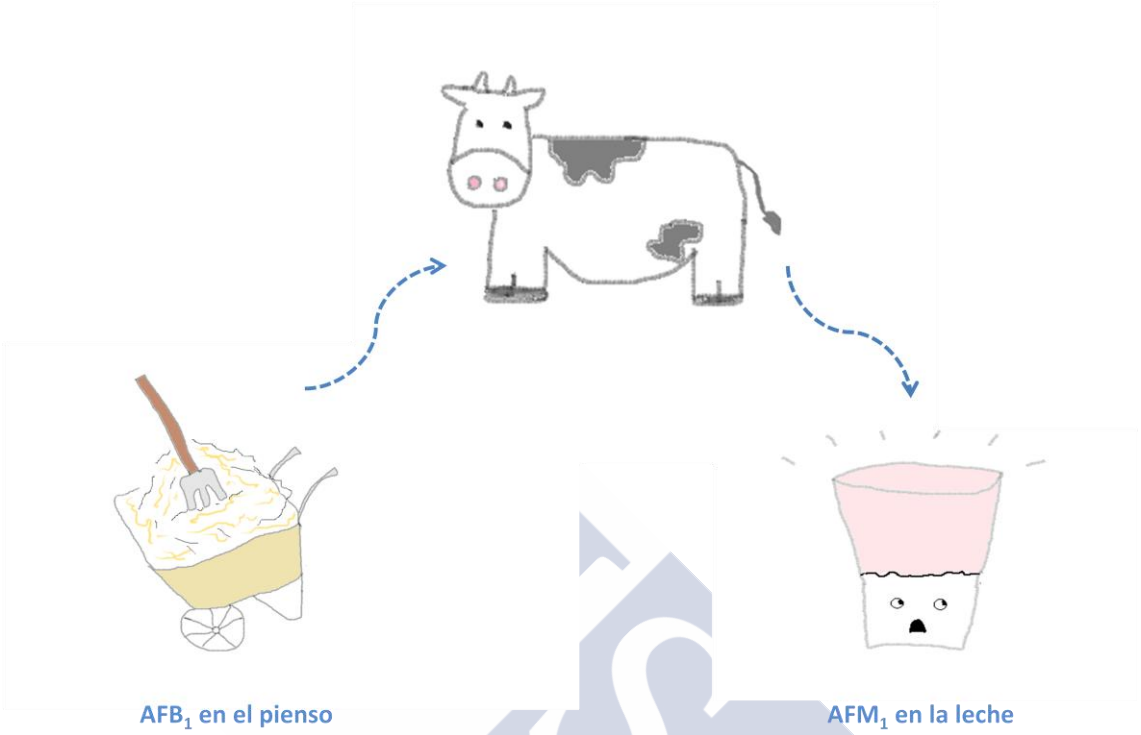


Figura I.A.15. Transformación de la AFB1 a AMB1

El nivel de toxicidad de las aflatoxinas depende de la cantidad de micotoxinas, del tiempo de consumo de alimentos contaminados y del grado de estrés al que el animal está sometido. Sin embargo, la presencia de aflatoxinas, cualquiera que sea la cantidad en la que se encuentren, nunca ha de considerarse seguro.

Altos niveles de aflatoxinas causan intoxicación aguda, caracterizada por producir lesiones en el hígado que llevan a la congestión sanguínea de los mismos y a hemorragias. Además, las aflatoxinas provocan acumulación de ácidos grasos en el hígado, corazón y riñones, responsables de encefalopatías y edemas. La AFB_1 tiene la capacidad de producir mutaciones a través de su unión covalente. El principal efecto tóxico crónico de las AFB_1 es la carcinogenicidad.

La intoxicación crónica, la más frecuente, viene dada por el continuo consumo de alimentos contaminados con bajas concentraciones de aflatoxinas. A largo plazo, la AFB_1 puede causar daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad [44,53]. El daño a nivel hepático, la disfunción gastrointestinal y de actividad reproductiva, la disminución del apetito, la reducción en la ganancia de peso, la disminución de la producción, son otros de los signos clínicos de la toxicidad crónica. Además, las aflatoxinas pueden causar la supresión del sistema inmunológico, lo que contribuye significativamente a reducir la resistencia a infecciones bacterianas y parasitarias [52].

La AFM_1, a pesar de presentar menor toxicidad y propiedades carcinogénicas que su precursora (AFB_1), tiene gran importancia toxicológica debido a su posible presencia en leche y productos lácteos, suponiendo un peligro para la salud pública. El aflatoxicol

presenta también cierta toxicidad. La reacción de formación de este metabolito a partir de AFB_1 es reversible, considerándose una reserva metabólica de la altamente tóxica AFB_1.

Para concluir, diferentes trabajos han demostrado la presencia de ciertos niveles de micotoxinas como AFM_1, AFM_2, AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, OTA, FB_1, ácido ciclopiazónico, ZEA y sus metabolitos y DOM en muestras de leche. Dicha contaminación está principalmente relacionada con la contaminación de los alimentos destinados al consumo de rumiantes. Dado el potencial riesgo que la presencia de micotoxinas en leche supone para la salud animal y humana, se hace necesario determinar la presencia simultánea de micotoxinas en la leche animal [48].

4. LEGISLACIÓN SOBRE MICOTOXINAS

4.1. Creación y desarrollo de legislación sobre micotoxinas

En enero del 2002, tras una serie de crisis alimentarias ocurridas a finales de los años 90, el Parlamento Europeo y el Consejo deciden crear la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), con vistas al desarrollo de una legislación en el ámbito alimentario. Se trata de una agencia comunitaria encargada del asesoramiento científico y comunicación sobre riesgos asociados a la seguridad de alimentos que pueden afectar a los estados miembros de la Unión Europea (UE). La EFSA garantiza la protección al consumidor y mantiene la confianza en el suministro de alimentos en la UE y entre algunos de sus cometidos se encuentran la seguridad de alimentos y piensos, la nutrición, sanidad y bienestar animal, y la protección y sanidad vegetal. Constituye un gran apoyo en el ámbito agroalimentaria contribuyendo a su innovación a partir de su labor evaluadora en la seguridad de productos y en las peticiones de autorización presentadas por la UE. A partir de la evaluación de riesgos de la EFSA, surgen una serie de dictámenes científicos y consejos que contribuyen a establecer una base sólida en lo relativo a políticas y legislación europea, así como ayudar a la Comisión Europea, al Parlamento Europeo y a los estados miembro de la UE a tomar decisiones de gestión de riesgo adecuadas [54, 55].

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha identificado como peligros químicos e importantes trasmisores de enfermedades a los alimentos, las toxinas producidas por hongos (micotoxinas), toxinas producidas por algas (ficotoxinas) y toxinas vegetales propias de ciertas especies de plantas, siendo las micotoxinas las que mayor atención han recibido hasta ahora en lo relacionado con la inocuidad de los alimentos [56].

La contaminación de productos alimenticios y agrícolas con micotoxinas supone un grave problema a nivel mundial. Estas sustancias pueden ocasionar efectos perjudiciales, agudos y crónicos sobre la salud animal y humana, además del fuerte impacto económico y social derivado de la reducción de la producción en las explotaciones.

El establecimiento de normas de regulación y de límites en materia de micotoxinas es una labor muy difícil ya que incluye aspectos científicos, socio-económicas y políticas [57]. Determinar el nivel de seguridad de una micotoxina dependen de factores como: la disponibilidad de los datos toxicológicos y sobre su presencia en distintas materias primas, conocer cómo se encuentran distribuidas las concentraciones de micotoxinas en un lote, disponibilidad de métodos analíticos, legislación de los países con los se mantienen relaciones comerciales y la necesidad del suministro de alimentos [58].

4.2. Regulaciones y recomendaciones de los niveles de micotoxinas

Con la intención de mantener los niveles de micotoxinas por debajo de los niveles de riesgo para la salud animal, se han establecido en el ámbito de la Unión Europea una serie de normas que regulan el contenido máximo de micotoxinas en productos destinados a la alimentación animal.

La directiva 2003/100/CE [59] (que modifica la Directiva 2002/32/CE) relativa a las sustancias y productos indeseable en la alimentación animal, fija los límites máximos para la AFB_1 en alimentos para animales, asignando límites diferentes en función del tipo de alimento y el tipo de animales al que vaya destinado. Los límites establecidos se detallan en la siguiente tabla:

Tabla I.A.2. Límites máximos para la aflatoxina B1 fijados en la directiva 2003/100/CE

Micotoxina	Productos destinados a la alimentación animal	Contenido máximo en mg/kg (ppm) referido a un contenido de humedad del 12%
Aflatoxina B_1	*Todas las materias primas para la alimentación animal*	0,02
	Piensos completos para bovinos, ovinos y caprinos, excepto:	0,02
	- piensos completos para ganado lechero	0,005
	- piensos completos para terneros y corderos	0,01
	Piensos completos para cerdos y aves de corral (excepto animales jóvenes)	0,02
	Otros piensos completos	0,01
	Piensos complementarios para bovinos, ovinos y caprinos (excepto piensos complementarios para ganado lechero, terneros y corderos)	0,02
	Piensos complementarios para cerdos y aves de corral (excepto animales jóvenes)	0,02
	Otros piensos complementarios	0,005

Teniendo en cuenta el riesgo de que sea metabolizada y excretada en la leche en forma de AFM_1, se han establecido niveles específicos para AFB_1 en alimentos destinados para animales productores de leche. El contenido de AFM_1 ha sido también regulado para leche y productos lácteos (CE/2174/2003 [60]), siendo su nivel máximo de 0,05 µg/kg de AFM_1 en leche.

La Comisión Europea aconseja intensificar el seguimiento de la presencia de micotoxinas producidas por *Fusarium* en cereales y en productos a base de cereales en su Recomendación 2006/576/CE [61] sobre la presencia de DON, ZEA, OTA, fumonisinas, T-2 y HT-2 en alimentación animal. Así mismo, establece niveles recomendados para DON, ZEA, OTA y fumonisinas (suma de FB_1 y de FB_2) en productos destinados para animales, que aparecen recogidos en la siguiente tabla:

Tabla I.A.3. Niveles recomendados para micotoxinas en la recomendación 2006/576/CE

Micotoxina	Productos destinados a la alimentación animal	Valor orinetativo en mg/kg (ppm) referido a un contenido de humedad del 12%
Deoxinivalenol	*Cereales y productos a base de cereales, excepto:*	8
	- Subproductos de maíz	12
	Piensos complementarios y completos, excepto:	5
	- piensos complementarios y completos para cerdos	0,9
	- piensos complementarios y completos para terneros (menores de cuatro meses), corderos y cabritos	2
Zearalenona	*Cereales y productos a base de cereales, excepto:*	2
	- Subproductos de maíz	3
	Piensos complementarios y completos para lechones y cerdas nulíparas	0,1
	Piensos complementarios y completos para cerdas y cerdos de engorde	0,25
	Piensos complementarios y completos para terneros, ganado lechero, ovejas y cabras	0,5
Ocratoxina A	*Cereales y productos a base de cereales, excepto:*	0,25
	Piensos complementarios y completos para cerdos	0,05
	Piensos complementarios y completos para aves de corral	0,1
Fumonisinas $B_1 + B_2$	*Maíz y productos a base de maíz*	60
	Piensos complementarios y completos para cerdos, caballos, conejos y animales de compañía	5
	Piensos complementarios y completos para peces	10
	Piensos complementarios y completos para aves de corral, terneros (menores de cuatro meses), corderos y cabritos	20
	Piensos complementarios y completos para rumiantes mayores de cuatro meses	50

Más recientemente, de acuerdo con la Recomendación 2013/165/UE [62] se establecieron los límites máximos orientativos para la suma T-2 y HT-2 en cereales y productos a base de cereales para alimentos y para piensos. Los niveles indicativos establecidos para la suma de las toxina T-2 y HT-2 para productos a base de cereales en los piensos y los piensos compuestos, a partir de los cuales deberían realizarse investigaciones, aparecen recogidos en la siguiente tabla:

Tabla I.A.4. Niveles indicativos para las suma de T2 y HT-2 en la recomendación 2013/165/UE

Micotoxina	Productos a base de cereales en los piensos y los piensos compuestos	Niveles indicativos en µg/kg (ppb) por encima de los cuales deben realizarse investigaciones
T-2 + HT-2	*Productos a base de la molienda de avena (cáscaras)*	2000
	Otros productos a base de cereales	500
	Otros compuestos, excepto los piensos para gatos	250

Dado que las micotoxinas evolucionan, la EFSA ha evaluado recientemente las llamadas *micotoxinas modificadas* [32], metabolitos de las micotoxinas originales producidas por los hongos o las plantas contaminadas como mecanismo de defensa.

Estas micotoxinas, cuya estructura química básica se ha visto alterada, pueden ser hidrolizadas, biotransformadas y absorbidas por el tracto gastrointestinal de un modo similar al de las micotoxinas originales. Es por ello que estas formas modificadas también deberían ser consideradas a la hora de medir los niveles totales de contaminación.

Los organismos regulatorios europeos reconocen la necesidad de analizar y regular las micotoxinas modificadas, y así, en Julio del 2013, la Comisión Europea solicitó a la EFSA la emisión de un dictamen científico sobre los riesgos para la salud humana y animal relacionados con la presencia de formas modificadas de micotoxinas en alimentos y en productos de alimentación animal [32,63].

Este dictamen comprende la evaluación de las micotoxinas modificadas de fumonisinas, zearalenona, toxinas T-2 y HT-2 y nivalenol en alimentos y piensos. En el dictamen, se realiza una comparativa de la toxicidad de las formas modificadas con las micotoxinas originales además de estimar la prevalencia y la exposición conjuntas.

Los datos científicos publicados hasta la fecha, a pesar de ser muy escasos, revelan que la presencia de micotoxinas modificadas puede incrementar los contenidos en zearalenona, fumonisinas, nivalenol y toxinas T-2 y HT-2 en un 100%, 60%, 30% y 10%, respectivamente [32].

Aunque ningún riesgo derivado del consumo de piensos haya sido observado en animales, los datos toxicológicos y de exposición no son todavía completos para todas las especies.

4.3. Metodologías analíticas y materiales de referencia para el cumplimiento de la legislación

La legislación alimentaria requiere de metodologías analíticas fiables y sencillas para la adecuada aplicación de las regulaciones [57]. La fiabilidad de los datos analíticos se ve favorecida mediante el uso de métodos que cumplan con ciertos criterios durante la realización de sus ensayos [56].

Dentro del marco del reglamento Europeo CE/882/2004 [64] sobre los controles oficiales para garantizar el cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos, el Comité Europeo de Normalización (CEN) ha elaborado una serie de normas Europeas

referentes al funcionamiento y acreditación de laboratorios de ensayo y de los órganos de control.

En el campo de las micotoxinas, la influencia de las organizaciones europeas y los programas sobre los desarrollos normativos de micotoxinas de la UE han cobrado gran importancia. De este modo, en el reglamento CE/401/2006 [65], inscrito dentro del marco de CE/882/2004[64], aparecen establecidos los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en productos alimenticios.

La CEN y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (AOAC) cuentan con una serie de métodos analíticos normalizados y validados para las micotoxinas que pueden utilizarse con fines oficiales [56].

Además de la aplicación de una metodología analítica fiable, el uso de procedimientos de garantía analítico de calidad como son los materiales de referencia certificados (MRC), también es requerido. La guía ISO 30 [66], define un material de referencia como "*material o sustancia que tiene una o varias de sus propiedades suficientemente bien establecidas para calibrar un aparato o instrumento, validar un método analítico, o asignar valores a un material o sistema*"; y define CMR como "*material de referencia que tiene certificados uno o varios de sus valores de una o más de sus propiedades por procedimientos técnicamente válidos llevados a cabo por un organismo competente*".

A través de una serie de proyectos financiados por el Programa de la Comisión Europea para Normas, Medidas y Ensayos, se han elaborado y siguen elaborándose MRCs para micotoxinas, estando estos disponibles a nivel mundial [56].

En resumen, una buena metodología analítica y el uso de MRCs son algunos de los elementos indispensables para el adecuado cumplimiento de las disposiciones legales y para garantizar un alto nivel de seguridad en los alimentos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] Scudamore, K.A.; Livesey, C.T.; Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review; *J. Sci. Food Agric.*; 77, **1998**, 1–17.

[2] Whitlow, L.W.; Hagler, W.M.Jr.; Mycotoxin Contamination of Feedstuffs. An Additional Stress Factor for Dairy Cattle; North Carolina State University; **2002**, En: http://www.cals.ncsu.edu/an_sci/extension/dairy/mycoto~1.pdf (Consulta: 13-10-14).

[**3]** Whitlow, L.W.; Hagler, W.M.Jr.; Diaz, D.E.; Mycotoxins in feed; *Feedstuffs*; 15, **2010**, 74–84.

[4] Bhat, R.; Rai, R.V.; Karim, A.A.; Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns; *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*; 9, **2010**, 57–81.

[5] Cheli, F.; Campagnoli, A.; Dell´Orto V.; Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis; *Anim. Feed .Sci. Tech.*; 183, **2013**, 1-16.

[6] El cornezuelo y el camino de Santiago: **2011**; En: http://jralonso.es/2012/11/11/el-cornezuelo-y-el-camino-de-santiago/ (Consulta: 13-10-14).

[7] Martínez-Larrañaga, M.R.; Anadón, A.; Micotoxinas. En: "Toxicología alimentaria"; Cameán, A.M.; Repetto, M.; Ed. Díaz de Santos; **2012**, 289-298.

[8] Peraica, M.; Lucić, A.; Pavlović, M.; Toxic effects of mycotoxins in humans; *Bull. World Health Organ.*; 77, **1999**, 754-766.

[9] Crecimiento de los hongos. En: http://www.knowmycotoxins.com/ (Consulta: 15-10-14).

[10] Carrillo, L.; Mohos y micotoxinas. En: "Los hongos de los alimentos y forrajes"; Ed. Universidad Nacional de Salta; **2003**, 1-24.

[11] Frisvad, J.C.; Rationale for the polyphasic approach in the identification of mycotoxigenic fungi. En: "Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed"; De Saeger, S.; Ed. Woodhead Publishing Limited; **2011**, 279-297.

[12] Newman, K.E.; Raymond, S.L; Effects of micotoxins in horses. En: "The mycotoxin blue book"; Díaz, D.E.; Ed. Nottingham University Press; **2005**, 57-76.

[13] Jouany, J.P.; Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds; *Anim. Feed Sci. Tech*.; 137, **2007**, 342-362.

[14] Munkvold, G.P.; Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears; *Eur. J. Plant pathol.;* 109, **2003**, 705-713.

[15] Mansfield, M.A.; De Wolf, E.D.; Kuldau, G.A.; Relationships between weather conditions, agronomic practices, and fermentation characteristics with deoxynivalenol content in fresh and ensiled maize; *Plant Dis.;* 89, **2005**, 1151-1157.

[16] Mansfield, M.A.; Archibald, D.D.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A.; Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices; *Phytopathology;* 93, **2007**, 504-510.

[17] Bush, B.J.; Carson, M.L.; Cubeta, M.A.; Hangler, W.M.; Payne, G.A.; Infection and fumonisin production by *Fusarium verticilloides* in developing maize kernels; *Phytopathology;* 94, **2004**, 88-93.

[18] Borreani, G.; Tabacco, E.; Antoniazzii, S.; Cavallarin, L.; Zearalenone contamination in farm maize silage; *Ita. J. Anim. Sci.;* 4, **2005**, 162-165.

[19] Marín, S.; Magan, N.; Bellí, N.; Ramos, A.J.; Canela, R.; Sanchís, V.; Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* in relation

to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maiz grain; *Int. J. Food Microb.;* 51, **1999**, 159-167.

[20] Carrillo, L.; Micotoxinas. En: "Microbiología agrícola"; Ed. Universidad Nacional de Salta; **2003**, 1-7.

[21] Manual sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas; FAO (Roma); 73, **2003**.

[22] Krska,R.; Welzig,E.; Boudra,H; Analysis of *Fusarium* toxins in feed**;** *Anim. Feed .Sci. Tech*.; 137, **2007**, 241-264.

[23] Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mulé, C.; Moretti, A.; Perrone, G.; Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops; *Eur. J. Plant Pathol.***;** 109, **2003**, 645-667.

[24] Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on undesirable substances in feed; European Commission; Adopted on 20 February **2003**.

[25] Shephard, G.S.; Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins; *J. of Chromatogr. A*, 815, **1998**, 31-39.

[26] Bryła, M.; Roszko, M.; Szymczyk ,K.; Jędrzejczak, R.; Obiedziński , M.W.; Sękul, J.; Fumonisins in plant-origin food and fodder – a review; *Food Addit. Contam*.: *Part A*; 30, **2013**, 1626-1640.

[27] Mangia, M.; Free and hidden fumonisins in maize and gluten-free products; Tesis doctoral; Facultad de Agricultura; Universidad de Parma; **2009**.

[28] Berthiller, F.; Crews, C.; Dall'Asta, C.; Saeger, S.D.; Haesaert, G.; Karlovsky, P.; Oswald, I.P.; Seefelder ,W.; Speijers, G.; Stroka, J.; Masked mycotoxins: a review; *Mol. Nutr. Food. Res*.; 57, **2013**, 165-186.

[29] Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Mangia, M.; Sforza, S.; Dossena, A.; Marchelli, R.; Free and bound fumonisins in gluten-free food products. *Mol. Nutr. Food Res*.; 53, **2009**, 492-499.

[30] Lazzaro, I.; Falavigna, C.; Galaverna, G.; Dall'Asta, C.; Battilani, P.; Cornmeal and starch influence the dynamic of fumonisin B, A and C production and masking in *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*; *Int J. Food Microbiol*.; 166, **2013**, 21-27.

[31] Dall'Asta ,C.; Falavigna, C.; Galaverna, G.; Battilani, P.; Role of maize hybrids and their chemical composition in Fusarium infection and fumonisin production; *J.Agric. Food Chem*.; 60, **2012**, 3800-3808.

[32] Scientific Opinion on the risk for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed; *The EFSA Journal;* 12(12):3916, **2014**, 1-107.

[33] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B_1 as undesirable substance in animal feed; *The EFSA Journal;* 39, **2004**, 1-27.

[34] Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSA); Aflatoxinas del grupo B y G; Generalitat de Catalunya; En: http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3577/edt_micotoxinas4aflatoxinas.pdf (Consulta: 29-10-14).

[35] Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSA); Ocratoxina A; Generalitat Generalitat de Catalunya; En: http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3577/edt_micotoxinas7ocratoxina_a.pdf (Consulta: 29-10-14).

[36] Motta, E.L.; Estimación de la exposición a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz; Tesis doctoral; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; Universidad de Buenos Aires; **2009**.

[37] Rundberget, T.; Wilkins, A. L.; Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 964, **2002**, 189-197.

[38] Soriano del Castillo, J.M.; Micotoxinas del género *Penicillium*. En: "Micotoxinas en alimentos"; Ed. Díaz de Santos; **2007**, 374-384.

[39] Gallo, A.; Giuberti, G.; Frisvad, J.C.; Bertuzzi, T.; Nielsen, K.F.; Review on mycotoxins issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects; *Toxins*; 7, **2015**, 3057–3111.

[40] Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed; *The EFSA Journal;* 11(6):3254, **2013**, 1-81

[41] Romagnoli, M.S.; Silva, P.S.; Las micotoxinas. ¿Qué sabemos sobre esta problemática?; Revista Agromensajes de la facultad; 27, **2009**; En: http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/27/2AM27.htm (Consulta: 03-11-14).

[42] Chi, F.; Broomhead, J.; Micotoxinas y vacas lecheras. Una revisión para productores de leche; Amlan International; En: http://amlan.com/spanish/downloads/WP_Dairy_SP.pdf (Consulta: 03-11-14).

[43] Fink-Gremmels, J.; The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows; *Vet. J.;* 176, **2008**, 84-92.

[44] Jouany, J-P.; Díaz, D.E; Effects of micotoxins in ruminants. En: "The mycotoxin blue book"; Díaz, D.E.; Ed. Nottingham University Press; **2005**, 295-321.

[45] Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria (ELIKA) Sustancias indeseables I Alimentacion animal. Toxinas T-2 y HT-2; **2013**; En: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento108/T2%20y%20HT2%202013%20cast.pdf (Consulta: 03-11-14).

[46] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed; *The EFSA Journal;* 73, **2004**, 1-41.

[47] Flores-Flores, M.E.; Lizarraga, E.; López de Cerain, A.; González-Peñas, E.; Presence of mycotoxins in animal milk: A review; *Food Control;* 53, **2015**, 163-176.

[48] Battacone, G.; Nudda, A.; Pulina, G.; Effects of Ochratoxin A on livestock production; *Toxins*; 2, **2010**, 1796-1824.

[49] Müller, H.M.; Lerch, C.; Müller, K.; Eggert, W.; Kinetic profiles of ochratoxin A and ochratoxin α during *in vitro* incubation in buffered forestomach and abomasal contents from cows; *Nat. Toxins.*; 6, **1998**, 251–258.

[50] Ringot, D.; Chango, A.; Schneider, Y.J.; Larondelle, Y.; Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an uptade; *Chem. Biol. Interact.;*159, **2006**, 18–46.

[51] Skaug, M.A.; Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A; *Food Addit. Contam*.; 16, **1999,** 75–78.

[52] Boudra, H.; Barnouin, J.; Dragacci, S.; Morgavi, D. P.; Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds; *J. Dairy Sci*.; 90, **2007**, 3197–3201.

[53] Grace, D.; Animals and Aflatoxins. En: "Aflatoxins: Finding solutions for improved food safety"; Unnevehr, L.; Grace, D.; International Food Policy Research Institute; **2013**; En: http://www.ifpri.org/sites/default/files/publications/focus20_05.pdf (Consulta:20-10-14).

[54] European Food Safety Authority (EFSA); En: http://www.efsa.europa.eu/ (Consulta: 05-11-14).

[55] Unión Europea (UE); En: http://europa.eu/index_es.htm (Consulta: 05-11-14).

[56] Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en alimentos y en las raciones en el año 2003; FAO (Roma); 81, **2003**.

[57] Binder, E.M.; Managing the risk of mycotoxins in modern feed production; *Anim. Feed Sci. Tech*.; 133, **2007**, 149–166.

[58] Egmond, H.P.; Jonger, M.A.; Current regulations governing mycotoxin limits in food. En: "Mycotoxins in food. Detection and Control"; Magan, N.; Olsen, M.; Ed. CRC Press, Woodhead Publishin Limited; **2004**, 49-68.

[59] Directiva 2003/100/CE de la Comisión de 31 de octubre de 2003 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal; DO L 285, **2003**, 33-37.

[60] Reglamento CE/2174/2003 de la Comisión de 12 de diciembre de 2003 que modifica el Reglamento CE/466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas ; DO L 326, **2003**, 12-15.

[61] Recomendación de la Comisión del 17 de agosto de 2006 (2006/576/CE), sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal; DO L 229, **2006**, 7-9.

[62] Recomendación de la Comisión del 27 de marzo de 2013 (2013/165/UE), sobre la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en los cereales y productos a base de cereales animal; DO L 91, **2013**, 12-15.

[63] Rychlik, M.; Humpf H-U.; Marko, D.; Dänicke, S.; Mally, A.; Berthiller, F.; Klaffke, H.; Lorenz, N.; Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins; *Mycotoxins Rech.;* 30, **2014**, 197–205.

[64] Reglamento CE/882/2004 de 29 de abril de 2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales; DO L 191, **2004**, 1-64.

[65] Reglamento CE/401/2006 de 23 de febrero de 2006 por lo que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios; DO L 70, **2006**, 12-34.

[66] ISO Guide 30: 1992; Terms and definitions used in connection with the reference materials; ISO (Ginebra); **1992**.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I.B. ENSILADOS DE MAÍZ Y PRESENCIA DE MICOTOXINAS

1. ENSILADOS. PRINCIPIOS GENERALES

Se define ensilado como un método de conservación de los forrajes basado en la fermentación espontánea del ácido láctico bajo condiciones anaeróbicas, que tiene como resultado una disminución del pH [1] a niveles para los cuales el crecimiento de hongos está prácticamente inhibido [2].

El objetivo principal de los ensilados es preservar al máximo los nutrientes originales de los forrajes, permitiendo su disponibilidad como fuente de alimentación para los rumiantes todos los días de año. Diferentes materiales se pueden conservar como ensilados: hierba, trébol, alfalfa, cebada, maíz, trigo, sorgo, etc., siendo los silos de hierba, alfalfa y maíz, dado su alto valor nutricional, los más utilizados en la alimentación de vacas de leche [3].

1.1. Proceso de ensilaje

Los microorganismos más abundantes de los forrajes frescos son bacterias, como las ácido-lácticas, y los hongos aeróbicos. Estas bacterias son capaces de fermentar los carbohidratos solubles de los forrajes formando ácido láctico y, en menor proporción, ácido acético [4].

Una vez que el forraje fresco es recogido, picado, bien compactado y cubierto herméticamente, asegurando la total expulsión del aire y la creación de un medio anaeróbico, comienza el proceso de ensilaje, que se dividirá en las siguientes fases [5,6]:

1) Fase aeróbica

En esta fase, el oxígeno atmosférico está todavía presente lo que permite la respiración de las plantas y de los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos, como hongos, levaduras o enterobacterias. Al mismo tiempo, debido a que el pH se mantiene entre 6,0 - 6,5, existe una alta actividad enzimática por parte de enzimas vegetales, tales como proteasas o carbohidrasas.

2) Fase fermentativa

La respiración de las plantas y de los microorganismos durante la fase anterior generan un ambiente anaeróbico, comenzando de esta forma la fase fermentativa. Dependiendo del tipo de material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje, esta fase puede durar días o varias semanas. La formación de ácido láctico y de otros ácidos procedentes de la fermentación de los carbohidratos solubles por las baterías ácido-lácticas, baja el pH del ensilado a valores entre 3,8 a 5,0, condiciones ácidas en las cuales cesa la actividad microbiana. Si la fermentación transcurre adecuadamente, las bacterias ácido-lácticas se convertirán en la población predominante.

3) Fase estable

Durante esta fase ocurren pocos cambios, siempre y cuando se asegure un ambiente sin presencia de aire. Poco a poco, los microorganismos de la fase anterior ven reducido su

número. En estado casi inactivo sobreviven microorganismos acidófilos, mientras que otros como los clostridios y bacilos lo hacen como esporas. Sólo algunas proteasas y carbohidrasas, y microorganimos que toleren condiciones ácidas, como el *Lactobacillus Buchneri* se mantienen activos.

4) *Fase de deterioro aeróbico*

Comienza una vez que el silo es abierto y expuesto al aire, situación inevitable cuando su uso como alimento para el ganado es requerido. Sin embargo, este deterioro puede ser provocado antes de su apertura debido a daños en la cubierta del silo por la acción de roedores o pájaros. El deterioro está dividido en dos etapas:

i) Degradación primaria: debida a la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el silo por acción de levaduras y, en ocasiones, por bacterias del ácido acético. Se produce entonces un aumento en el valor del pH que da lugar a la segunda fase del deterioro.

ii) Degradación secundaria: viene producida por el aumento de la temperatura y por la acción de microorganismos, como los bacilos, y microorganismo aeróbicos y aeróbicos facultativos, como mohos y enterobacterias, cuya actividad fue previamente inhibida por el bajo pH y que ahora pueden contribuir al deterioro del ensilado.

La tasa de deterioro viene determinada por el número y la actividad de estos organismos que pueden degradar el silo. En las zonas más afectadas y deterioradas, las pérdidas de materia seca por día pueden ser de entre 1,5 y 4,5%, siendo dichas pérdidas similares en silos herméticamente cerrados y almacenados durante meses.

1.2. Uso de aditivos en ensilados: *Lactobacillus Buchneri*

El uso de aditivos a lo largo del proceso de ensilado tiene como objetivo la inhibición de la actividad y del crecimiento de organismos responsable del deterioro de los silos, como levaduras y las bacterias responsables de una fermentación acética [5]. De este modo la conservación y la calidad nutritiva del ensilado se ven mejoradas.

Estos aditivos pueden ser químicos o biológicos y entre ellos se pueden encontrar [7]: los *conservantes* (ácidos fórmico, acético, benzoico, láctico, propiónico), *enzimas* (amilasas, pectinasas, celulasas), *sustratos* (glucosa, sacarosa, pulpa de remolacha, granos de cereales, melazas), *nutrientes o activadores* (amonio, urea, carbonato cálcico) y los *inoculantes* (bacterias del ácido láctico: *Lactobacillus*, *pediococcus*).

Los inoculantes tienen la capacidad de elevar rápidamente la acidez del material a ensilar favoreciendo de este modo la estabilidad del silo. Los inoculante microbiales usados para el ensilaje contienen bacterias ácido-lácticas seleccionadas para controlar la fermentación natural de los cultivos durante el proceso de ensilado. En función de cómo realicen la fermentación de los azúcares, estos inoculantes están divididos en dos grupos: bacterias ácido láctica homofermentativas, como las especies *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Pediococcus spp., y Enterococcus*s pp., que sólo producen ácido láctico y las bacterias ácido láctica heterofermentativas, productoras de ácido láctico, ácido acético, etanol y bióxido de carbono. La *Lactobacillus Buchneri* es la más representativa de este último grupo [7,8].

La *Lactobacillus Buchneri* es una bactéria heterofermentativa capaz de convertir, bajo condiciones anaeróbicas, el ácido láctico en ácido acético y 1,2-propanodiol [9]. El ácido

acético es un potente inhibidor de levaduras y de mohos y presenta una mayor estabilidad aeróbica que el ácido láctico.

En comparación con las bacterias homofermentativas, usando *Lactobacillus Buchneri* como inoculante, las pérdidas de materia seca son prácticamente similares, la digestibilidad a penas se ve afectada, pero la estabilidad aeróbica, debido a la producción de ácido acético, mejora significativamente para ensilados y maíces con gran porcentaje de humedad [8].

1.3. Caracterización del ensilado

La evaluación de la calidad de un ensilado implicaría un análisis de su estabilidad aeróbica así como un estudio de su valor nutritivo y de sus parámetros fermentativos.

1.3.1. Estabilidad aeróbica

La estabilidad aeróbica es un término utilizado para describir la resistencia que un forraje presenta al deterioro, sin alterar sus propiedades físicas y químicas, una vez que el silo es abierto y entra en contacto con el aire [10].

También podría ser definida como el tiempo (en horas) durante el cual la temperatura del ensilaje permanece por debajo de la temperatura ambiente más de 2°C.

El deterioro aeróbico vendrá entonces definido a partir de la temperatura máxima y/o la integral de temperaturas por encima de la temperatura ambiente más 2°C [11]. Los principales factores que determinan la velocidad de deterioro del material vegetal son: el aire, el sustrato y la temperatura, y están estrechamente relacionados entre sí [12].

Durante el proceso de ensilado se produce un aumento de temperatura que puede significar pérdidas en materia seca, disminución de la digestibilidad de la proteína y una elevación en los valores de pH, indicativos de la inestabilidad alcanzada. Una vez que el silo es abierto, su estabilidad es determinada por la oxidación del sustrato, esto es, la cantidad de material vegetal ensilado determina la porosidad del ensilaje y, por tanto, la cantidad de oxígeno que ingresa en el mismo tras su apertura [7].

Las principales causas de la inestabilidad aeróbica son: bajo contenido en materia seca del material vegetal que se ensila, poca compactación o mal sellado del silo, escasa homogeneidad de los nutrientes en el silo, bajo contenido en azúcares del forraje fresco, aireación del silo una vez abierto para su consumo debido al mal sellado [13].

1.3.2. Indicadores de la calidad nutritiva

Algunos de los parámetros que son necesarios calcular para valorar la calidad nutricional y la estabilidad de un ensilado son [14]:

- El pH de su jugo: su valor nos indica qué tipo de fermentación tuvo lugar y si disponemos o no de un material estable.
- La materia seca (MS): es el porcentaje de forraje que no es agua. Todos los demás componentes (excepto la digestibilidad) están referidos a ellas, por lo que es un parámetro importante de determinar. Conocer el contenido en MS que se

ha conservado de un silo, nos ayuda a conocer las cualificaciones nutritivas que se han mantenido.

- La proteína bruta (PB): tiene una influencia directa en la producción animal. Dependiendo del tipo de ensilado, el rango de normal de este contenido de oscila entre 70 g kg^{-1} MS (para ensilados de maíz) y 220 g kg^{-1}[4]. Sin embargo, este parámetro no nos indica la cantidad de proteína degrada a lo largo del proceso de ensilado, ni la que se puede degradar en el rumen.
- La fibra neutro detergente (FND): representa el material insoluble en una solución detergente neutra y está compuesta, principalmente, por compuestos de las paredes celulares como celulosa, hemicelulosa y lignina [15]. Es la parte del material que más lentamente es digerido en el rumen. Está asociado negativamente con la proporción de MS ingerida [14].
- La fibra detergente ácida: representa el material insoluble en una solución detergente ácida y está compuesta, principalmente, por compuestos como celulosa, hemicelulosa y lignina [15]. Está estrechamente relacionada con la digestibilidad, por lo que puede ser un buen indicador del valor energético [4].
- La digestibilidad: es la proporción de alimento consumido y digerido por el animal, y que, por tanto, no es excretado en las heces.

1.3.3. Indicadores de la calidad fermentativa

Además de su contenido en nutrientes y de la digestibilidad de los mismos, es necesario evaluar si la fermentación ha sido correcta a través de los siguientes parámetros:

- Nitrógeno soluble y nitrógeno amoniacal: es una medida de la cantidad de proteína degradada durante la fermentación del silo.
- Carbohidratos solubles residuales: un porcentaje bajo en el contenido de azúcares solubles indica que la fermentación láctica ha transcurrido correctamente.
- Ácidos de la fermentación: el principal es el ácido láctico, que sirve cómo indicativo de la transformación de los carbohidratos en este ácido y que provoca una bajada de pH y una mejora en la estabilidad del silo. Otros ácidos propios de la fermentación son el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Se trata de ácidos grasos volátiles resultante de una inadecuada fermentación o de fermentaciones secundarias que transforman el ácido láctico en butírico y aminoácidos en amoníaco, con la correspondiente formación de ácido acético. Su contenido ha de ser mínimo y no representar más de un 0,20 del total de los ácidos de la fermentación [4].

Según aparece recogido en el trabajo presentado por Zea y Díaz (2008) [4], un ensilado podría ser considerado de gran calidad cuando indicadores comentados anteriormente poseen valores como los que se recogen la tabla siguiente:

Tabla I.B.1. Valores de los indicadores de calidad para un silo ideal

Materia seca (MS)	> 300 g kg^{-1}
pH	4 - 4,5
Proteína bruta (PB)	150-175 g kg^{-1} MS
Fibra neutro detergente (FND)	500-550 g kg^{-1} MS
Nitrógeno amoniacal	< 50 g kg^{-1} MS
Carbohidratos solubles residuales	> 100 g kg^{-1} MS
Ácidos de la fermentación	100-150 g kg^{-1} MS
Ácido láctico	80-120g kg^{-1}MS
Ácido grasos volátiles	< 0,2 de los ácidos totales

2. ENSILADOS DE MAÍZ

El proceso de ensilado del maíz comprende el uso completo de la planta, por lo que los ensilajes contienen una mezcla de sus componentes (mazorca, hojas, tallo), encontrándose éstos en distintas proporciones.

La facilidad de la mecanización de las cosecha de maíz, su prolongada conservación, y su posible uso durante todo el año, son algunos de los factores por los que el maíz es una de las cosechas más aptas para ensilar [16,17].

Figura I.B.1. Foto de la cosecha de maíz para ensilaje

A nivel mundial, este producto, tan apetecible para el ganado, es una de las principales fuentes de alimentación para rumiantes, llegando a constituir el 50-75% de la dieta para una vaca lechera que consuma aproximadamente 26 kg de MS al día [18].

Para que el ensilado de maíz sea rico en energía, la cosecha para ensilar debe realizarse en el idóneo estado de madurez del granos, esto es, cuando los granos contengan entre un 62-65% de MS. Este adecuado estado de desarrollo del grano se alcanza a las 6-8 semanas de después de la floración [4]. Es del grano de donde procede la mitad de la MS de la planta, siendo por tanto el componente que ofrece el mayor valor nutritivo y está constituido principalmente por almidón.

Figura I.B.2. Llenado y compactación de un silo de maíz tipo trinchera

La planta de maíz presenta una composición relativamente estable y durante su fermentación el pH, la digestibilidad así como su contenido en fibra, almidón y energético se mantienen prácticamente constantes.

El proceso de ensilado se ve claramente influido por la cantidad de MS procedente de la cosecha, de modo que cuando el contenido en MS es escaso el proceso de fermentación será menos efectivo. Es recomendable pues ensilar cuando el contenido en MS está comprendido entre el 30-35%.

Es necesaria una buena compactación del silo para evitar la posible entrada de aire que traería como consecuencia pérdidas en materia seca de hasta el 20%. Las pérdidas en materia seca están estrechamente relacionadas con la pérdida de valor nutritivo del silo, pues afectan a los componentes más digestibles, como el almidón o ácido orgánicos. Además, la exposición al aire del silo conllevaría a un deterioro aeróbico con el correspondiente indeseable crecimiento de bacterias aeróbicas y hongos [4].

Según Phipps y Wilkinson (1985) [19], algunos de los cambios que se producen durante el proceso de ensilado del maíz aparecen reflejados en la tabla:

Tabla I.B.2. Variaciones producidas durante el ensilado de maíz

	Maiz fresco	*Maiz ensilado*
Materia seca (MS) (%)	27	26
pH	4	6
Composición de MS (%):		
ácidos orgánicos	1	10
almidón	19	18
carbohidratos	14	3
cenizas	6	6
fibras	46	46
proteína bruta (PB)	8	9

3. HONGOS MICOTOXIGÉNICOS Y MICOTOXINAS EN MAÍZ Y EN ENSILADOS DE MAÍZ

Como ya se ha descrito previamente (Sección I.A., Apartado 2), las especies fúngicas pueden invadir la planta forrajera durante su crecimiento, antes de ser cosechadas (*pre-cosecha*), o bien contaminarla, una vez haya sido cosechada, a lo largo de su almacenamiento (*post-cosecha*). La alta adaptación de los hongos micotoxigénicos permitiría su desarrollo y la consecuente contaminación con micotoxinas, que van desde el campo y la cosecha de los cultivos, hasta su almacenaje y al ser ofrecidas como alimento, pueden alcanzar los animales [20].

El maíz forrajero es más susceptible que la hierba a la contaminación con hongos micotoxigénicos tanto en el campo [21], como cuando es ensilado [22], lo que convierte a los ensilados de maíz en los componente de la ración en la dieta de las vacas de leche que aporta un mayor número de micotoxinas [23].

A continuación, se detallarán los principales hongos micotoxigénicos y las micotoxinas que contaminan a los cultivos (pre-cosecha) y a los ensilados de maíz (post-cosecha).

3.1. Pre-cosecha

Condiciones ambientales como la humedad, sequía y temperaturas extremas, los daños provocados por algunos insectos, algunas prácticas agronómicas y las cosechas tardías son algunos de los factores que pueden predisponer a los cultivos a ser infectados por hongos micotoxigénicos, resultando en la contaminación con micotoxinas [24].

Figura I.B.3. Mazorca de maíz infectada por gusano

Los hongos productores de micotoxinas son también causantes de ciertas enfermedades en el maíz que pueden llegar a producir importantes pérdidas en la producción [25]. Algunas de las especies patógenas que pueden infectar a los cultivos de maíz pertenecen al género *Fusarium* y *Aspergillus*.

En climas templados son los hongos del *Fusarium* los causantes de enfermedades como la podredumbre roja y rosa de la mazorca y la podredumbre del tallo [25].

La podredumbre roja de la mazorca, también conocida como la fusariosis roja, está distribuida por todo el mundo, siendo más común en zonas con climas fríos y húmedos. Los

principales hongos causantes de esta enfermedad son *Fusarium graminearum, F. culmorum, F. cerealis* y *F. avenaceum.* El hongo infecta la mazorca a través de la sedas provocando la aparición de un moho rojizo en la punta de la mazorca que crece hacia la base y, excepcionalmente, cuando la infección es temprana, puede llegar a cubrirla completamente. Los ataques de podredumbre roja en el maíz resultan normalmente en contaminación de las mazorcas con micotoxinas como DON, ZEA y, en ocasiones, T-2 [25].

Figura I.B.4. Mazorca de maíz infectada por *F. graminearum*

La podredumbre rosa de la mazorca o fusariosis rosa, es más común en áreas con tiempo cálido y seco, y suele ocurrir durante y después de la floración [26], siendo máxima la susceptibilidad del maíz en los dos siete días posteriores a la floración. Las especies frecuentemente aisladas en las mazorcas infectadas son principales hongos causantes de esta enfermedad como *F. verticilloides, F. proliferatum y F. subglutinans.* Los granos son normalmente infectados a través de las sedas, pero también existe evidencia de invasión desde el tallo a través del pedúnculo de la mazorca. Normalmente, los granos infectados aparecen distribuidos aleatoriamente a lo largo de toda la mazorca, con un moho de tonalidad rosa blancuzca. El estrés hídrico y los daños del taladro están asociados con altos niveles de infección, lo que tiene como consecuencia la producción y acumulación de fumonisinas [27], lo que hace que esta enfermedad en el maíz no deba subestimarse.

La mayoría de los estudios sobre la contaminación de las plantas de maíz con micotoxinas pertenecientes al género *Fusarium*, se han centrado en el grano y en la mazorca. Sin embargo, la infección con micotoxinas también puede producirse en el tallo, y, al igual que cuando se trata de mazorca y grano, pasar a los ensilados [28]. Cuando esto ocurre, se habla de la podredumbre del tallo, enfermedad causada por *F. verticilloides, F. proliferatum, F. subglutinans, F. graminearum* y *F. culmorum*, siendo el *F. verticilloides* el más habitual [25]. La infección puede producirse a través de las semillas, de las sedas o las heridas, extendiéndose de forma sistémica por toda la planta. El hongo sobrevive en los residuos de cultivo en el suelo o sobre la semilla infectada y puede estar presente en todo el ciclo de vida de la planta [25, 26]. Plantas con tallo afectados con esta enfermedad pueden presentar contaminación con micotoxinas como ZEA y DON [25].

Figura I.B.5. Mazorca de maíz infectada por *F. verticilloides*

Otros hongos que pueden también contaminar el maíz son los pertenecientes al género *Aspergillus*, como por ejemplo el *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y A. ochraceus, caracterizados por un comportamiento esencialmente oportunista o saprófito. Son capaces de infectar el maíz antes y después de su cosecha, provocando la podredumbre de la mazorca. Esta enfermedad provocada por el *Aspergillus* causa por lo general pocos daños, siendo más graves en zonas cálidas y secas. Los hongos generalmente aislados en mazorcas afectadas son el *A. flavus* y *A. parasiticus* [25].

3.2. Post-cosecha

Los hongos derivados del campo son reemplazados por hongos de almacenamiento cuando el contenido en humedad es superior al 15%. En los ensilajes, el contenido de humedad es entre 3-5 veces mayor, aumentando de este modo el riesgo de ataque fúngico [24].

Como ya se ha descrito anteriormente, el ensilado se basa en la conservación del forraje bajo condiciones de anaerobiosis y de bajo pH, no favorables para el crecimiento de la mayoría de los hongos [29]. Sin embargo, existen hongos como *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssochjamys nívea* y varias especies del género *Fusarium*, capaces de resistir a la baja disponibilidad de oxígeno y a las condiciones ácidas propias en los ensilados [30].

Un inadecuado manejo del silo durante su período de conservación, puede implicar la entrada de aire, promoviendo condiciones de micoraerobiosis que favorecen el crecimiento de hongos menos tolerantes a condiciones ácidas o anaeróbicas como el *Aspergillus flavus*. Además, una vez que los silos son abiertos, la aerobiosis y el aumento del pH asociado a la exposición al aire, contribuyen al crecimiento activo de hongos toxigénicos [20].El *Aspergillus* y el *Penicilum*, ya que pueden crecer a baja actividad de agua (a_w), son considerados los hongos más abundantes durante el almacenamiento, siendo el *Aspergillus* más prevalente en áreas cálidas y el *Penicililum* en áreas más frías [24].

Las variaciones del tipo de hongos y nivel de infección en los silos y dentro de los silos pueden ser atribuidas a la época de muestreo, la temperatura, el lugar el silo, el aspecto de la muestra o el estado de deterioro aeróbico. Otros aspectos que también pueden influir son los relativos al método de cultivo usado, como las condiciones de aerobiosis, la temperatura y la composición del medio [31]. A pesar de que la microflora en los silos de hierba es más variada [31], es en los ensilados de maíz donde el recuento de hongos [22] y de micotoxinas [16,23] es mayor.

Figura I.B.6. Silo de maíz abierto y expuesto al aire

Es importante mencionar que un ensilaje con un alto grado de infestación con hongos no implica necesariamente la existencia de micotoxinas a concentraciones elevadas, del mismo modo que la ausencia de hongos no asegura que el ensilado esté totalmente libre de contaminación con micotoxinas [6].

3.2.1. Incidencia de hongos micotoxigénicos y micotoxinas en los ensilados de maíz

Aunque las especies frecuentemente aisladas en los ensilados pertenecen a los géneros *Penicililum* (70%), *Fusarium* (47%) *y Aspergillus* (34%) [18], otros géneros como *Mucor*, *Byssochlamys*, *Absidia, Geotrichum*, *Monascus, Alternaria, Scopulariopsis* y *Thrichoderma*, también se han aislado regularmente de los ensilados [32-35].

En un estudio realizado en 1230 ensilados de maíz de Francia y de Italia, el *Penicillium roqueforti* fue el hongo predominante estando presente en un 56% de las muestras analizadas [36]. Otros trabajos similares realizados en la República Checa, Alemania, Austria y en Canadá confirmaron que el *P. roqueforti* era la especie más abundante en ensilados de maíz [31, 37]. Del mismo modo, en un estudio realizado en Dinamarca, *P. roqueforti* y *P. paneum* fueron aislados de un 96% de silos de maíz [38].

Existen evidencias de que la infección con *P. roqueforti* y la formación las micotoxinas como patulina, ácido micofenólico y ROQ C, puede ocurrir también sobre la planta de maíz en el campo [36].

La peligrosa especie fúngica *Aspergullis fumigatus* también fue encontrada en ensilados de Francia [39], EEUU [40], y Portugal [41]. Además, *Aspergullis fumigatus* y *A. flavus* fueron los hongos predominantes en algunos estudios en ensilados de maíz realizados en EEUU y Argentina [24].

A pesar de las condiciones de microanaerobiosis y ácidas propias de los ensilados que pueden inhibir el crecimiento de algunas *Fusarium* spp, hongos pertenecientes a dicha especie han sido encontrados en ensilajes de maíz maduro [17, 42-44]. Los más frecuentemente aislados en silos de maíz fueron: *Fusarium verticilloides*, *F. graminearum*, *F.proliferatum*, *F. avenaceum* y *F. sporotrichioides* [24].

Tras la apertura de un silo se restablecen condiciones de aerobiosis que hacen posible el crecimiento de hongos como el *Fusarium verticilloides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *A. flavus* y *A. parasiticus*, tal y como ha sido comprobado en ciertos trabajos sobre silos comerciales de maíz [17,29]. El hecho de que un mismo silo pueda estar colonizado por más de una especie de hongos, resulta en la contaminación simultánea con diferentes micotoxinas [6].

La incidencia y la concentración de una toxina dada bajo las condiciones de ensilado en el período de almacenamiento dependen de su sensibilidad al pH [24].

Alrededor de unas 300 micotoxinas diferentes han sido aisladas de ensilajes del maíz. Los hongos del género *Fusarium* son capaces de producir más de 20 micotoxinas, entre las que destacaría el deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) y las fumonisinas [18]. La aparición simultanea de DON y ZEA en silos de maíz se ha destacado como la más prevalente [45].

La más abundante de las micotoxinas del género *Fusarium* en el maíz ensilado es el DON [24].En un resumen sobre varios controles realizados en EEUU [40], destacó la gran incidencia del DON en ensilados con niveles que alcanzaban los 3mg/kg. En ensilados de maíz (n=480) en explotaciones de Carolina del Norte [40], se detectaron aflatoxinas, DON, ZEA, toxina T-2 y fumonisinas en el 8, 66, 30 ,7 y 37 % de las muestras, respectivamente. En Pensilvania, se encontraron fumonisinas B_1 y B_2 (FB_1 y FB_2) en el 92% y el 55% de las muestras de 60 silos de maíz, con concentraciones medias de 2000 y 980 μg kg^{-1}, respectivamente [46]. Todas estas concentraciones superan los límites legales europeos. En estados del medio oeste, FB_1, FB_2 y FB_3 se encontraron incluso con mayor frecuencia (97%, 72% y 57%) [47].

En Normandía, se detectaron la aflatoxina B1 (AFB_1), DON y ZEA en muestras de un silo muestreado durante nueve meses, llegando a valores máximos de 10, 200 y 41 μg kg^{-1}, respectivamente, siendo la cantidad de AFB_1 superior al límite legal permitido [29].

Estudios realizados en Alemania en ensilados de planta entera de maíz y mazorca, revelaron la presencia de DON, ZEA y ocratoxina A (OTA) a concentraciones máximas de 4300, 50 y 40 μg kg^{-1}, respectivamente [31]. Otro trabajo en silos de maíz encontró que para cinco de las muestras analizadas DON, ZEA, toxina HT-2 y nivalenol alcanzaban valores de 3900, 1800, 26 y 2800 μg kg^{-1}, respectivamente, y las concentraciones de DON y ZEA eran ligeramente superiores a los niveles recomendados [48]. En Italia se detectaron AFB_1, ZEA y FB_1 en el 95, 60, 97% de las 186 muestras analizadas procedentes de 50 silos. Todos los niveles alcanzados por las micotoxinas detectadas suponían una ingesta diaria de micotoxinas superior a la de los límites permitidos y recomendados [49].

En Holanda la presencia de 15 micotoxinas fue evaluada en 140 muestras de ensilado de maíz [16]. DON y ZEA fueron, una vez más, las micotoxinas más frecuentes, detectándose en un 72 y 49% de las muestras, a concentraciones máximas de 3000 y 900 μg kg^{-1}, respectivamente, ambas ligeramente superiores a los límites recomendados. Más recientemente, en un estudio llevado a cabo en Dinamarca sobre la incidencia de micotoxinas durante la pre y post-cosecha en 82 muestras de ensilado de maíz, los metabolitos del *Fusarium* más comunes resultaron ser la ZEA (28%) ,la eniantina B (24%) y el nivalenol (13%), con unas concentraciones medias de 66, 53 y 266 μg kg^{-1}, respectivamente [50].

A pesar de que las condiciones ácidas del ensilado no son las óptimas para el desarrollo del *Aspergillus flavus*, se ha informado de la contaminación con aflatoxinas en ensilados de maíz [33,40] a altas concentraciones, llegando a alcanzar hasta los 5000 μg kg^{-1}. En Argentina se encontró AFB_1 en el 17% de 35 muestras de ensilados de maíz analizadas, con valores oscilando entre los 1,43 y 156 μg kg^{-1}, destacando la gran variación entre muestras pertenecientes al mismo silo [43]. DON, ZEA y FB_1 también fueron detectadas simultáneamente en el 83% de estas muestras, pero a niveles por debajo de los límites europeos. En ensilajes de maíz analizados en Francia [17,29] y en Egipto [51] también fueron detectadas aflatoxinas.

La incidencia de las micotoxinas del género *Penicillium*, que incluyen la ROQ-C, ácido micofenólico, ácido penicilico y patulina, entre otras, también ha sido estudiada en ensilajes [24]. En una encuesta realizada en los Países Bajos, la incidencia de micotoxinas producidas por el *P.roqueforti*, tales como la ROQ-C y el ácido micofenólico, resultó ser del 50% en el total de muestras de ensilado de maíz estudiadas [23]. Así, un 28% de muestras de ensilados de maíz en Alemania [52], y un 8% de silos en Italia [53], presentaron contaminación con ácido micofenólico a unos valores de concentración que superaban los 20.000 μg kg^{-1}.

En Pensilvania, un 75 % de las muestras de silo de maíz procedentes de 30 explotaciones mostraron contaminación con al menos una de las micotoxinas del género *Penicillium y* un 10%, contaminación simultánea con cuatro de ellas: ROQ-C, patulina, ácido micofenólico y ácido ciclopiazónico [54]. En dicho estudio, la micotoxina detectada más frecuentemente fue la ROQ-C (60%) seguido del ácido micofenólico (42%), ácido ciclopiazónico (37%) y patulina (23%), siendo los valores de las concentraciones medias de 380 μg/kg para ROQ-C, 160 μg kg^{-1}para el ácido micofenólico, 120 μg kg^{-1}para el ácido ciclopiazónico y 80 μg kg^{-1} para la patulina.

Además, en las capas más superficiales de ensilados de maíz en Holanda la ROQ-C Y el ácido micofenólico, llegaron a alcanzar concentraciones de hasta 45.000 μg kg^{-1} y 25.000 μg kg^{-1}, respectivamente [23].

Otras toxinas del *Penicillum,* tales como la Andrastin A y la Marcfortina A, fueron también detectadas en ensilados de maíz muestreados en Dinamarca, si bien su incidencia resultó ser de tan sólo un 18 y 7%, respectivamente [38, 50].

En estas mismas muestras también se detectaron alternariol y alternariol monometil, toxinas producidas por hongos de la familia *Alternaria*, pero con una incidencia de tan sólo un 2% y a concentraciones muy bajas.

En general, con los datos anteriormente presentados, se hace evidente que los niveles de micotoxinas en ensilados de maíz pueden llegar a exceder los límites reglamentarios y que la aparición simultanea de dichas toxinas en el mismo ensilado es habitual.

3.2.2. Efecto del ensilado sobre la concentración de micotoxinas: estudio de la estabilidad

El aumento del tiempo de almacenamiento podría ayudar a la reducción en el contenido de las micotoxinas en los ensilados debido a que la fermentación en condiciones anaeróbicas y ácidas podría metabolizar algunas de las micotoxinas procedentes de la cosecha [32].

Según demuestran ciertos trabajos realizados en maíz ensilado en condiciones de laboratorio (*silos de laboratorio*) [38, 55], el proceso de ensilado parece presentar un efecto

"descontaminante" sobre las micotoxinas. Sin embargo, esta "descontaminación" no es todavía bien comprendida [34] y se ha especulado sobre la posibilidad de un efecto de elución y pérdida de efluente [39] o la más probable biotransformación [56, 57] por parte de ciertas cepas de bacterias lácticas y levaduras [31].

En un trabajo sobre la estabilidad de las micotoxinas del género *Fusarium* en silos de laboratorios almacenados en distintas condiciones [39], los resultados obtenidos revelaron una disminución parcial para DON, FB_1, FB_2 y ZEA a los 3 y 6 meses. La estabilidad de estas micotoxinas, además de depender del tiempo de conservación, también se veía afectada por la cantidad de MS en los ensilados. Así, según dicho estudio, poca cantidad de MS y tiempos de almacenamiento prolongados, dieron lugar a una mayor degradación del índice de micotoxinas. Sin embargo, en la práctica muchas explotaciones ensilan maíz con alto contenido en MS y la apertura de los silos se realiza con anterioridad.

En silos de granjas comerciales, los resultados sobre el comportamiento y la estabilidad de las micotoxinas son contradictorios. Mientras ciertos autores encontraron variación en el contenido de fumonisinas [28], DON [29, 31] o ZEA [29, 33, 43] a lo largo del proceso de ensilado, los hay que sugieren un aumento de AFB1, fumonisinas [43], DON y ZEA [31, 43]. En otra investigación sobre la presencia de micotoxinas , antes y después de la fermentación, las concentraciones de DON y FB_1 en muestras de silo de maíz fueron superiores en las plantas antes de ensilar, mientras que los niveles de ZEA permanecían prácticamente constantes [43]. Estudios de estabilidad de toxinas del *Aspergillus* mostraron que la AFB_1 mostraba una degradación durante el tiempo de ensilaje [17, 29, 31].

Estas discrepancias podrían ser debidas a diferencias en el contenido de MS del forraje, el uso de aditivos, la temperatura o el tiempo de conservación [39].

Varios trabajos también han evaluados la incidencia en la cosecha y la estabilidad a lo largo del ensilado de micotoxinas del género *Penicillium*, demostrando que la producción de forma natural de toxinas del *P. roqueforti* como es ROQ C, patulina, ácido micofenólico y ácido penicílico, es dependiente del tiempo [24]. Además, también se ha constatado que las micotoxinas del *Penicillium*, considerado normalmente como un hongo de almacenamiento, pueden ser producidas tanto en el campo como en el proceso de ensilado [28, 29].

3.2.3. Distribución de los hongos y micotoxinas en un silo y efectos de las técnicas de ensilado

La distribución de los hongos micotoxigénicos y de las micotoxinas en un silo, viene determinada por las distintas propiedades físicas y condiciones ambientales que existen dentro de un silo. También hay que tener en cuenta el papel del agricultor que se encarga de elaborar el silo sobre dicha distribución. Durante el almacenamiento, el crecimiento fúngico se produce por lo general en las capas más superficiales del ensilaje, pero durante el deterioro aeróbico, todo el silo puede llegar a enmohecerse [24].

El factor más determinante del contenido de hongos en los ensilados es el lugar que ocupa la muestra en el silo. Los recuentos de colonias de hongos totales son superiores en las capas superiores de los silos menos compactados y más expuestas a las posibles infiltraciones del aire y, en consecuencia, el riesgo de contaminación con micotoxinas es presumiblemente mayor. Esta hipótesis fue confirmada por para el contenido de ZEA en un amplia muestra de silos comerciales [58].

También, a través de un estudio sobre la distribución de micotoxinas del género *Fusarium* en ensilados de maíz, se observó que las concentraciones de DON en la parte superior del silo eran significativamente mayores [17]. Sin embargo, estos mismos autores en un trabajo posterior, encontraron que la cantidad de DON era más elevada en la parte inferior de los silos [42]. Para ambos estudios [17], el comportamiento de la aflatoxina B_1 fue el mismo y ésta apareció en mayor cantidad en el nivel más inferior del silo de maíz. A la vista de estos datos, se puede decir que no siempre las muestras de las capas superiores del silo presentan mayores niveles de micotoxinas.

Otros autores en cambio, no encontraron diferencias en las concentraciones de DON y ZEA en las distintas partes del silo., pero sí mayores cantidades de micotoxinas ROQ C y ácido micofenólico en la zona más superficial [16]. El *Aspergillus flavus* detectado en los niveles medios y superior, no estuvo presente en la capa más baja en un estudio llevado a cabo en ensilajes de maíz [43].

Otros factores correlacionados con el contenido de hongos son la duración del proceso de ensilado y el mes de muestreo [22]. En un estudio de 232 silos de Galicia, los ensilados con mayor contenido en hongos fueron los que se taparon más rápidamente, probablemente debido a una menor compactación. Además, los muestreos realizados en verano, presentaron mayor contaminación con hongos, siendo probable que esto se deba al efecto de las altas temperaturas [22]. En Italia, se detectaron mayores contenidos de ZEA en los ensilados muestreados en verano que en los de invierno [58].

Las máquinas desensiladoras también juegan un papel importante en el contenido de hongos en un silo. Así, la extracción de un ensilado con desensiladoras de corte de tacos reduce la penetración del aire frente al silo, en comparación con otras máquinas, como las de tipo fresa o pinzas, lo que explicaría por qué con las primeras se observó un menor contenido de hongos [22, 43].

4. MÉTODOS DE LUCHA

La mayoría de las estrategias para prevenir la contaminación con micotoxinas tienen objetivo reducir la infección de la planta o el grano. Como ya se ha explicado anteriormente (Sección IA, Apartado 2), prácticas culturales como la rotación de cultivos, el laboreo, la elección de la fecha de siembre y cosecha, la fertilización, la elección de variedades resistentes y el control de plagas y malas hierbas puede reducir la infección y consecuente la producción de micotoxinas pero no erradicarlas [59].

Para desarrollar modelos propicios de predicción del riesgo de contaminación con micotoxinas, es necesario obtener información en la que se integren los datos de niveles de contaminación con la información meteorológica y las prácticas culturales en las condiciones locales [59].

La prevención de la contaminación con hongos y sus micotoxinas se podría dividir en tres fases [60]:

1) La prevención primaria consiste en un conjunto de estrategias a adoptar antes y después de la cosecha. Las condiciones climáticas están estrechamente relacionadas con el desarrollo fúngico. Es por ello que el conocimiento de los factores ambientales que contribuyen a la infección por hongos y a la producción de micotoxinas es la primera de las etapas para reducir al mínimo la contaminación. Las más recientes estrategias de prevención

en la pre-cosecha, implican el uso de las nuevas biotecnologías que diseñan y producen maíz con buena resistencia genética a la contaminación con hongos y micotoxinas. El uso de controles biológicos a base de agentes biocompetitivos no toxigénicos es una otra estrategia útil para restringir el crecimientos de hongos micotoxigénicos e impedir la acumulación de micotoxinas en cultivos de maíz [61].

Además, algunas de las prácticas recomendadas para evitar el indeseable crecimiento fúngico también incluyen [60, 62]:

- Uso de variedades de maíz resistentes a enfermedades de la putrefacción de las hojas, de la mazorca y del tallo, así como resistentes al ataque de insectos.
- Control de la infección por hongos en el campo.
- Establecer un cronograma adecuado para la pre-cosecha, cosecha y post-cosecha.
- Reducción del contenido de humedad del grano (secado del grano), después de la post-cosecha y durante el almacenamiento.
- Mantener las temperaturas bajas siempre que sea posible.
- Controlar la proliferación de los hongos con el uso de fungicidas y conservantes y la infestación de insectos en los granos con el uso de insecticidas.
- Cosechar y ensilar el maíz cuando el contenido hídrico es óptimo para su almacenamiento también evitará el desarrollo de hongos toxigénicos.
- Controlar factores tales como la actividad de agua, la temperatura y el pH durante el tiempo de almacenamiento [63].
- El uso de inoculantes a base de *Lactobacillus Buchneri* en el ensilado, que debido a la elevada producción de ácido propiónico retrasa e inhibe el desarrollo de hongos una vez abierto el silo [64], reduciendo, consecuentemente, la producción de micotoxinas [65].
- Asegurarse de que el silo está correctamente sellado para evitar la posible entrada de oxígeno.
- Como las micotoxinas son solubles en agua, es importante no permitir que la lluvia lave las capas superiores de un silo en mal estado, evitando de este modo el posible arrastre y difusión de las micotoxinas por la masa del ensilado.

2) La prevención secundaria tiene lugar cuando los hongos toxigénicos han llegado a invadir la materia prima (maíz). Estos deben ser eliminados para evitar en la medida lo posible la producción de micotoxinas. [60].

Para que los procedimientos empleados en la descontaminación de micotoxinas sean adecuados, deben respetar los siguientes criterios [53,66]:

- Ser capaces de destruir, inactivar o eliminar las micotoxinas.
- No producir residuos tóxicos o carcinogénicos, sustancias mutágenas, metabolitos o subproductos en los alimentos y piensos.
- Mantener el valor nutritivo y respetar la aceptabilidad del producto.
- No alterar significativamente las propiedades tecnológicas del producto.
- Conseguir la destrucción de todas las esporas fúngicas para evitar una posible contaminación con nuevas micotoxinas.
- Ser económico y no alterar el coste del producto final.

Los métodos de inactivación o detoxificación de las micotoxinas se clasifican en métodos biológicos, físicos y químicos [67].

Los métodos biológicos consisten en el uso de de microorganismos que podrían metabolizar y reducir las micotoxinas presentes en el medio [20], o bien, microorganismos no toxigénicos que se desarrollen mejor en el sustrato y que pueden reducir el desarrollo de hongos micotoxigénicos por exclusión o inhibición competitiva [67]. Algunos ejemplos son el uso de cepas atoxigénicas de *Aspegillus flavus* y A*. parasiticus* y bacterias antagonistas como el *Bacillus subtilis*.

Dentro de los métodos físicos se incluyen la separación y eliminación de los granos dañados y contaminados, las radiaciones como los rayos X y el tratamiento con calor.

Los métodos químicos engloban desde tratamientos con amoníaco y ozono, hasta el uso de disolventes orgánicos (combinaciones de hexano/acetona/agua o isopropanol(agua) y agentes químicos reactivos ácidos (ácido clorhídrico, sulfúrico) y álcalis (cloruro cálcico, carbonato sódico, hidróxido sódico, etc) [67].

La amoniación ha resultado ser eficaz en productos contaminados con aflatoxinas. En cambio, se debe tener en cuenta que el tratamiento con amonio en forrajes contaminados no resulta tan efectivo como la amoniación de los granos a altas presiones y elevadas temperaturas. [20].

El uso de un agente oxidante como el ozono también ha destacado como uno de los métodos químico de descontaminación. Así, han sido varios los estudios en muestra de maíz contaminado donde la degradación de micotoxinas (aflatoxinas, DON, OTA, ZEA, entre otras) a través de la ozeonolisis fue demostrada [20].

Pero dentro de los métodos químicos, la estrategia más utilizada para disminuir la contaminación con micotoxinas consiste en la reducción de su biodisponibilidad a través del uso de secuestrantes o adsorbentes de micotoxinas [63]. En particular, estos secuestrantes son capaces de unirse a las micotoxinas que se encuentran en el alimento contaminado evitando que el complejo toxina-adsorbente se disocie a lo largo del tracto digestivo del animal, siendo eliminada la toxina a través de las heces [53].

Los adsorbentes de micotoxinas son compuestos de alto peso molecular que complejan las micotoxinas a través de una *adsorción física* (enlaces relativamente débiles: de van der Waals o enlaces de hidrógeno) o mediante *adsorción química* o quimioadsorción (interacciones fuertes como enlaces iónico o covalente).

Estos adsorbentes de micotoxinas están clasificados en dos grupos [68]:

a. Adsorbentes minerales

a.1) Arcillas: sustancias terrosas formadas principalmente por silicatos aluminios, formados por grupos silicatos: SiO4. Algunos ejemplos son: bentoinas, zeolitas, caolinita, etc.,

Los aluminosilicatos de sodio calcio hidratado (HSCAS) se pueden obtener a través del tratamiento térmico de arcillar de calcio o bien encontrarse de forma natural. Este tipo de secuestrantes, al ser productos refinados, poseen una mayor capacidad de adsorción de micotoxinas [67] y son frecuentemente utilizados en alimentos contaminados para animales.

a.2) Carbón activo: se trata de un compuesto en polvo con una estructura de carbono altamente porosa. Su capacidad de absorción viene determinada por el tamaño del poro, área de la superficie, estructura de la micotoxina y la dosis.

a.3) Tierra de diatomeas: mineral de origen vegetal procedente de esqueletos de algas unicelulares. Su contenido en sílice varía entre un 65-90%.

b. Adsorbentes orgánicos

b.1) Extractos de las paredes celulares de levaduras: como polisacáridos, proteínas o lípidos con capacidad de adsorción a través de interacciones iónica, hidrofóbicas o puentes de hidrógeno. La levadura más utilizada para la extracción de estos secuestrantes es la de cerveza *Saccharomyces cerevisiae.*

b.2) Fibras micronizadas: formadas principalmente por celulosa, hemicelulosa y ligninina, se obtienen a partir de distintos vegetales como el trigo, la cebada, avena, alfalfa, cascarilla de chícharo, manzana, bambú.

b.3) Bacterias: secuestran micotoxinas a través de enlaces hidrofóbicos. Las más utilizadas pertenecen al género *Lactobacillus* y *Streptococcus.*

b.4) Polímeros: como la colestestiramina, un tipo de resina insoluble, y la polivinilpirrolidona, polímero muy polar que se une a las micotoxinas a través de la formación de puentes e hidrógeno y oxígeno.

Sin embargo, teniendo en cuenta la gran variabilidad de estructuras química de las micotoxinas, se hace evidente que el uso de un solo agente secuestrante no resulta del todo eficaz. Por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar un producto de desactivación de micotoxinas capaz de combinar las siguientes estrategias [53]:

ADSORCIÓN: reduce significativamente la biodisponibilidad de micotoxinas adsorbibles tales como las aflatoxinas.

BIOTRANSFORMACIÓN: componentes biológicos como enzimas específicas pueden eliminar la toxicidad de aquellas micotoxinas que no son capaces de ser adsorbidas, tales como los tricotecenos, ZEA, OTA y fumonisinas, mediante un cambio en su estructura molecular.

BIOPROTECCIÓN: contrarresta los efectos nocivos de las micotoxinas a través de una mezcla de algas y extractos vegetales.

3) La prevención terciaria se hace necesaria cuando las dos fases de prevención anteriormente mencionadas dejan de ser factibles dado el alto grado de contaminación por hongos toxigénicos y micotoxinas. La medida recomendada implicaría por lo tanto la suspensión inmediata de la alimentación con el producto contaminado y su destrucción completa [60].

El reglamento CE 183/2005, sobre la higiene en la alimentación animal [69] establece como objetivo la divulgación de Guías de Buenas Prácticas Higiénicas y la implantación de Planes de Calidad basado es en los principios del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).

Una buena herramienta para minimizar los efectos negativos de las micotoxinas consistiría en la creación de una base de datos con los hongos micotoxigénicos y micotoxinas

que pueden estar presentes en los ensilajes en distintas condiciones climáticas a través de un monitoreo continuo [24].

La solución completa al reto de la eliminación de las micotoxinas en ensilados sería a través de un control basado en el desarrollo de técnicas analíticas rápidas y fiables en la identificación de micotoxinas.

Además, debido a la frecuente aparición simultánea de varias micotoxinas en ensilados de maíz, cobra un gran interés el desarrollo de una metodología analítica multi-micotoxinas que permita la determinación de varias micotoxinas en una misma muestra de silo.

En la siguiente sección, se describirá de manera detallada los métodos de análisis de micotoxinas en muestras de maíz y de ensilado de maíz.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] Gollop, N.; Zakin, V.; Weinberg, Z.G.; Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants; *J. Appl. Food Microbiol.*; 98, **2005**, 662–666.

[2] Weinberg, Z.G.; Ashbell, G.; Engineering aspects of ensiling; *Biochem. Eng.*; 13, **2003**, 181–188.

[3] Dunière, L. ; Sindou, J. ; Chaucheyras-Durand, F. ; Chevallier, I. ; Thévenot-Sergentet, D. ; Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim. Feed .Sci. Tech*.; 182, **2013**, 1-15.

[4] Zea, J.; Díaz, M.D.; Os ensilados de forraxes. En: "Producción de carne con forraxes ensiladas"; Ed. Consellería do Medio Rural; **2008**, 21-54.

[5] Oude Elferink, S.J.W.H.; Driehuis, F.; Gottschai, J.C.; Spoelstra, S.F.; Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. En: "Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos"; *Estudio de la FAO Producción y protección vegetal*; Ed. L. 't Mannetje; 161, **2001**, 17-30.

[6] Tangni, E.K.; Pussemier, L.; Van Hove, F.; Mycotoxin contaminating maize grass silages for dairy cattle feeding: current state and challenges; *J. Anim. Sci. Adv.*; 3, **2013**, 492–511.

[7] Mier, M.A.; Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero; Trabajo de Fin de Master; Departamento de producción animal; Universidad de Córdoba; **2009**.

[8] Contreras-Gevea, F.; Muck, R.; Inoculantes microbiales para ensilaje; *Focus on Forage.*; 8, **2006**, 1–4.

[9] Driehuis, F.; Oude Elferink, S.J.W.H.; Spoelstra, S.F.; Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus Buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability; *J.Appl. Microbiol.* ; 87, **1999**, 583-594.

[10] Jobim, C.C.; Nussio, L.; Reis, R.; Schmidt,P.; Avanços metodológicos na avaliaçao da qualidade da forragem canservada; *Revista brasileña de zootecnia* ; 36, **2007**, 101-119.

[11] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Pereira, S.; Cardelle, M.; Efecto de la fecha de cosecha y el uso de inoculantes sobre la calidad fermentativa, la estabilidad aeróbica y la calidad higiénica en ensilados de maíz ; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba;36, **2008**, 337-346.

[12] Argamentería, G.A.; De la Roza-Delgado, B; Martínez, A.; Sánchez, L.; Martínez, A.; El ensilado en Asturias; Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (CIATA); **1997**, 1-127.

[13] Boletín informativo; Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (CIATA), Consejería de Agricultura, Principado de Asturias; 4, **1998**; En: http://www.serida.org/pdfs/1829.pdf (Consulta: 15-12-14).

[14] De la Roza-Delgado, B.; El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad; *IV Jornadas de Alimentación Animal;* Lalín (Pontevedra); **2005**, 1-20.

[15] Calsamiglia, S.; Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes; *XIII Curso de especialización FEDNA;* Madrid , **1997**, 1-20.

[16] Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; Te Giffel, M.C.; Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands; *Food Addit. Contam. Part B*; 1, **2008**, 41-50.

[17] Richard, E.; Heutte, N.; Bouchart, V.; Garon, D.; Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage; *Anim. Feed Sci. Technol.*; 148, **2009**, 309-320.

[18] Dunière, L. ; Sindou, J. ; Chaucheyras-Durand, F. ; Chevallier, I. ;Thévenot-Sergentet, D.; Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms; *Anim. Feed .Sci. Tech*., 182, **2013**, 1-15.

[19] Phipps, R.H.; Wilkinson, M.; Maize silage: Production, Conversation, Utilisation; Ed. Chalcombe Publications; **1985**.

[20] Queiroz, O.; Rabaglino, M.B.; Adesogan, A. ; Mycotoxins in silage. Departament of Animal Sciences, University of Florida ; **2013**; En: http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mycotoxins-silage-t2796/p0.htm (Consulta: 15-12-14).

[21] Jouany, J.P.; Methods for preventing, descontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed .Sci. Tech*., 137, **2007**, 342-362.

[22] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Castro, P.; Pereira, S.; Calidad higiénica de piensos, leche y ensilados de hierba y maíz en explotaciones lecheras de Galicia; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba; **2008**, 329-335.

[23] Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; Te Giffel, M.C.; Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes; *J. Dairy Sci.;* 91, **2008**, 4261-4271.

[24] Cheli, F.; Campagnoli, A.; Dell´Orto V.; Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis; *Anim. Feed .Sci. Tech.*; 183, **2013**, 1-16.

[25] Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mulé, C.; Moretti, A.; Perrone, G.; Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops; *Eur. J. Plant Pathol.*; 109, **2003**, 645-667.

[26] White, D.G.; Plagas y enfermedades del maíz. The American Phytopathological Society; Ed. Mundi-Prensa; **2004**

[27] Miller, J.D.; Factors that affect the occurrence of fumonisin; *Environ. Health Persp.*; 109, **2001**, 321-324.

[28] Mansfield, M.A.; Archibald, D.D.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A.; Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices; *Phytopathology;* 93, **2007**, 504-510.

[29] Garon, D.; Richard, D.; Sage, I.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P.;Mycoflora and multimycotoxina detection in corn silage: experimental study; *J.Agric. Food Chem.;* 54, **2006**, 3479-3484.

[30] Pahlow, G.; Muck, R.E.; Driehuis, F.; Oude Elferink S.J.W.H.; Spoelstra, S.F.; Microbiology of ensiling. En: "Silage Science and Technology"; Buxton, D.R.; Ed. American Society of Agronomy-Crop Science Society of America-Soil Science Society of America; **2003**, 31-94.

[31] Auerbach, H.; Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions; **2006;** En: http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mould-growth-mycotoxin-contamination-t219/p0.htm (Consulta: 15-12-14).

[32] Fink-Gremmels, J.; Mycotoxins in forages. En: "The Mycotoxin Blue Book"; Diaz, D.E.; Ed. Nottingham University Press, **2005**, 249–268.

[33] Scudamore, K.A.; Livesey, C.T.; Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review; *J. Sci. Food Agric.*; 77, **1998**, 1–17.

[34] Storm, I.M.L.D.; Sørensen, J.L.; Rasmussen, R.R.; Nielsen, K.F.; Thrane, U.; Mycotoxins in silage; *Stewart Postharvest Rev*.; 4, **2008**, 1–12.

[35] McDonald, P.; Henderson A.R.; Heron, S. J. E.; The Biochemistry of Silage (2nd edn); Chalcombe Publications (Reino Unido); **1991**, pp 340.

[36] Pelhate, J.; Maize silage: Incidence of moulds during conservation; *Folia Vet. Lat.*; 7, **1977**, 1-16.

[37] Sumarah, M.W.; Miller, J.D.; Blackwell, B.A.; Isolation and metabolites production by Penicillium roqueforti, P. paneum and P. crustosum isolated in Canada; *Mycopathol.*; 159, **2005**, 571–577.

[38] Storm, I.M.L.D.; Kristensen, N.K.; Raun, B.M.L.; Smedsgaard, J.; Thrane, U.; Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage; *J. Appl.Microbiol*; 109, **2010**, 1017–1026.

[39] Boudra, H.; Barnouin, J.; Dragacci, S.; Morgavi, D. P.; Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds; *J. Dairy Sci*.; 90, **2007**, 3197–3201.

[40] Whitlow, L.W.; Hagler, W.M.Jr.; Mycotoxins in feed; *Feedstuffs*; 38, **2005**, 69-79.

[41] Melo dos Santos, V.; Dorner, J.W.; Carreira, F.; Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage; *Mycopathol.*; 156, **2002**, 133-138.

[42] Richard, E.; Heutte, N.; Bouchart, V.; Garon, D.; Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage; *Anim. Feed Sci. Technol*.148, **2009**, 309–320.

[43] Gonzales Pereyra, M.L.;Alonso, V.A., Sager, R.; Morlaco, M.B.; Magnoli, C.E.; Astoreca, A.L.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R.;.Fungal and selected mycotoxins from pre- and postfermented maize silage; *J. Appl. Microbiol.*;104, **2008**, 1034–1041.

[44] Eckard, S.; Wettstein, F.E.; Forrer, H.; Vogelgsang, S.; Incidence of Fusarium species and mycotoxins in silage maize; *Toxins;* 3, **2011**, 949–967.

[45] Signorini, M.L.; Gaggiotti, M.; Molineri, A.; , C.A.; Zapata de Basílico, M.L.; Basílico, J.C.; Pisani, M.; Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina; *Food Chem. Toxicol*.; 50, **2012**, 250-257.

[46] Mansfield, M.A.; Archibald, D.D.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A.; Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices; *Phytopathology;* 93, **2007**, 504-510.

[47] Kim, E.K.; Maragos, C.M.; Kendra, D.F.; Liquid chromatographic determination of Fumonisins B1, B2 and B3 in corn silage; *J. Agric. Food Chem.*; 52, **2004**, 196-200.

[48] Schollenberger, M.; Muller, H.M.; Rüfle, M.; Suchy, S.; Plank, S.; Drochener, W.; Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany; *Mycopathol.*; 161, **2006**, 43-52

[49] Cavallarin, L.; Borreani, G.; Tabacco, E.; Mycotoxin occurrence in farm maize silages in Northern Italy; Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation.; **2004**, 1023-1025.

[50] Storm, I.M.L.D.; Rasmussen, R.R.; Rasmussen, P.H.; Occurrence of pre- and post-harvest mycotoxins and other metabolites Danish maize silage; *Toxins*; 6, **2014**, 2256–2269.

[51] El-Shanawany, A.A.; Mostafa, M.E.; Barakat, A.; Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic Aspergilli toxins; *Mycopathol.,* 159, **2005** , 281-289.

[52] Schneweis, I.; Meyer, K.; Hormansdorfer, S.; Bauer, J.; Mycophenolic acid in silage; *Appl. Environ. Microbiol.;* 66, **2000**, 3639–3641.

[53] Gallo, A.; Giuberti, G.; Frisvad, J.C.; Bertuzzi, T.; Nielsen, K.F.; Review on mycotoxins issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects; *Toxins*; 7, **2015**, 3057–3111.

[54] Mansfield, M.; Jones, A.; Kuldau, A.D.G.A.; Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins; *Phytopathol.;* 98, **2008**, 330–336.

[55] Gonzalez Pereyra, M.L.; Alonso, V.A.; Sager, R.; Morlaco, M.B.; Magnoli, C.E.; Astoreca, A.L.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R.; Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage; *J. Appl. Microbiol.*; 104, **2008**, 1034-1041.

[56] Styriak, M.L.; Alonso, V.A.; Sager, R.; Morlaco, M.B.; Magnoli, C.E.; Astoreca, A.L.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R.; Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage; *J. Appl. Microbiol.*; 104, **2007**, 1034-1041.

[57] Niderkorn, V.; Morgavi, D.P.; Pujos, E.; Tissandier, A.; Boudra, H.; Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenona and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model; *Food Addit. Contam*.; 24, **2007**, 406-415.

[58] Borreani, G.; Tabacco, E.; Antoniazzi, S.; Cavallarin, L.; Boudra, H.; Zearalenone contamination in farm maize silage; *Ital. J. Anim.;* 4, **2005**, 162-165.

[59] Jouany, J.P; Methods for preventing, descontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds; *Anim. Feed. Sci. Tech..;* 137, **2007**, 342-362.

[60] Abdel-Wahhab, M.A.; Kholif, A.M.; Mycotoxins in animal feeds and prevention strategies: a review; *Asian Journal of Animal Sciences..;* 2, **2008**, 7-25.

[61] Riley, R.T; Norred, W.P; Prevención y descontaminación de micotoxinas. Estudio monográfico: el maíz; *Tercera Conferencia Internacional Mixta; FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas*, Túnez; **1999**

[62] Crecimiento de los hongos. En: http://www.knowmycotoxins.com/es/ndairy.htm (Consulta: 15-10-14).

[63] Binder, E.M.; Managing the risk of mycotoxins in modern feed production; *Anim. Feed Sci. Tech*.; 133, **2007**, 149–166.

[64] Kung, L. Jr.; Stokes, M.R..; Lin, C.J.; Silage additives.En:"Silage Science and Technology"; Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Madison, J.H.; WI, USA; **2003**, 305–360.

[65] Selwet, M.; Raczkowska-Werwinska, K.; Potkanski, A.; Grajewski, J.; Twarozek, M.; Miklaszewska, B.; Lukomska, V.; Gubala, A.; Chemical composition and microflora of silage from maize ensilage with bacterial and chemical additives; *Medycyna Weterynaryjna*; 64, **2007**, 477–479.

[66] Commission Regulation (EU) 2015/786 of 19 May 2015 defining acceptability criteria for detoxification processes applied to products intended for animal feed as provided

for in Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council; *Off. J. Eur. Union*; DO L 125, **2015**, 10-14.

[67] León, A. M.; Estudio de la capacidad de los microorganismos de kéfir, para inhibir el desarrollo fúngico y para secuestrar micotoxinas; Tesis doctoral; Facultad de Ciencias Exactas; Univerdidad de la Plata; **2013**.

[68] Tapia-Salazar, M.; García-Pérez, O.D.; Nieto-López, M.; Ricque-Marie, D.; Villarreal-Cavazos, D.; Cruz-Suárez, L.E.; Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura; Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola; **2010**, 514-542.

[69] Reglamento CE 183/2005 del Parlamento Europeo y el Consejo de 12 de enero de 2005, estableciendo los requerimientos de higiene de los piensos; DO L 35, **2005**, 1-22.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I.C. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS

Como se ha venido explicando hasta ahora, la presencia de micotoxinas en alimentos destinados para el ganado supone un gran riesgo para la salud animal, y grandes pérdidas económicas para las explotaciones. Por ello, se han aprobado normas por parte de la Unión Europea estableciendo contenidos máximos de micotoxinas en alimentación animal.

A fin de cumplir con estas regulaciones establecidas, la disponibilidad de métodos analíticos robustos y fiables se hace claramente necesario [1].

Como en cualquier método analítico, en el análisis de micotoxinas, la etapa de muestreo viene seguida de una extracción de los analitos de interés de la matriz. En ocasiones, la necesidad de eliminar sustancias que pueden interferir con el compuesto o compuestos a estudiar hace necesaria una etapa de purificación o limpieza antes del análisis [1].

La presencia de micotoxinas ha sido determinada por varios métodos analíticos incluyendo: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alto resolución (HPLC) con detección ultravioleta (UV), detección de fluorescencia (FLD), matriz de fotodiodos (PDA) o espectrómetría de masas, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) o la detección de captura de electrones (GC-ECD), ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y una combinación de técnicas de columna inmuno-afinidad [1,2]. Entre todos ellos, es la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) uno de los métodos más sensibles, selectivos y robustos para el análisis de múltiples residuos de contaminantes orgánicos, en particular micotoxinas [3,4].

Se han descrito métodos de análisis en una gran variedad de matrices que cuantificaban las micotoxinas de modo individual. Sin embargo, debido a que la regulación europea contempla varias micotoxinas y debido a su común aparición simultánea en un mismo alimento, la Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda que se desarrollen métodos multi-micotoxinas.

La gran diversidad de las propiedades físicas y químicas de las micotoxinas significa que la búsqueda de una preparación de la muestra adecuada y un buen método de detección para el análisis simultáneo de un gran número de micotoxinas es un gran desafío [5]. Si a esto le añadimos, la gran complejidad del silo como matriz, resulta fácil entender que son pocos los métodos multi-micotoxinas desarrollados y validados en ensilaje de maíz.

De modo general, un análisis completo de micotoxinas consta de las siguientes etapas [6]:

1) *Toma de muestra*: varias muestras son tomadas (muestra elemental) y combinadas formando una única (muestra total)

2) *Preparación de la muestra*: una submuestra de la muestra total es triturada o molida y nuevamente submuestreada para obtener una muestra representativa con tamaño fino de partícula (muestra analítica)

3) *Extracción y Análisis:* en el laboratorio, las micotoxinas son extraídas de la muestra y posteriormente analizadas y cuantificadas.

Figura I.C.1. Esquema de las etapas de un análisis completo de micotoxinas

1. MICOTOXINAS ESTUDIADAS EN ESTA TESIS

Los estudios realizados a lo largo del desarrollo de esta Tesis se centraron en dos ejes básicos: por una parte se ha evaluado el contenido y la estabilidad de micotoxinas del género *Fusarium* en muestras de maíz antes de ser ensilado y durante el proceso de conservación. Este estudio fue planteado para silos de laboratorio (maíz ensilado en condiciones de laboratorio) y para silos convencionales. La segunda área de estudio fue la relativa al desarrollo y validación de un método multi-micotoxinas para ensilados de maíz y su aplicación en muestras reales. Se muestra a continuación una tabla (Tabla I.C.1) con las micotoxinas estudiadas, indicando las técnicas analíticas utilizadas para su detección.

En los siguientes apartados se explican de modo general los procedimientos de muestreo, preparación la muestra, extracción y las técnicas analíticas (cromatográficas e inmunoquímicas) para el análisis de micotoxinas.

2. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El establecimiento de un protocolo adecuado en la toma de muestra juega un papel primordial en la correcta determinación de la concentración de micotoxinas en el material de estudio [7].

El desarrollo de hongo y el crecimiento fúngico está significativamente relacionado con el tipo y la variedad de los cultivos, con las prácticas agronómicas, condiciones climatológicas

y con la toxicidad asociada a cada especie fúngica. El diseño de un buen plan de muestreo debe tener en cuenta esta variabilidad de las micotoxinas [6].

Tabla I.C.1. Micotoxinas estudiadas y técnicas analíticas empleadas

técnica analítica	*micotoxina*
ELISA	**fumonisinas totales** **deoxinivalenol**
HPLC-PDA-FLD	**deoxinivalenol** **zearalenona**
LC-MS/MS	**3 + 15-acetildeoxinivalenol** **ácido penicílico** **aflatoxina B_1** **aflatoxina G_1** **deoxinivalenol** **fumonisina B_1** **fumonisina B_2** **toxina HT-2** **ocratoxina A** **roquefortina C** **toxina T-2** **verruculogen** **zearalenona** **ácido micofenólico** **eniantina B** **eniantina B_1** **andrastina A** **alternariol** **α-zearalenol** **β-zearalenol** **esterigmatocistina** **marcfortina A** **penitrem A**

Debido a la distribución tan heterogénea de las micotoxinas en los productos, la toma de muestra es una tarea compleja y una de las etapas más críticas en la determinación analítica [8].

El comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios, recomienda el establecimiento de protocolos de muestreo eficaces y validados que contemplen la selección de la muestra dentro de la cadena alimentaria además de las condiciones agro-climáticas [9].

Un plan de muestreo de micotoxinas puede definirse como un proceso de medición aleatoria para determinar si el lote de un producto se acepta o se rechaza, relacionándolo con un límite de aceptación y rechazo definido (por lo general el límite reglamentario) [10].

2.1. Incertidumbre y variabilidad asociada al muestreo

La fase de muestreo especifica cómo ha de tomarse la muestra y cuál ha de de ser su tamaño e intenta conseguir al máximo que la concentración en las muestra reflejen con exactitud y precisión la concentración de micotoxinas en todo un lote. Sin embargo, incluso con planes de muestreo bien diseñados, la verdadera concentración de micotoxinas no puede ser determinada con certeza absoluta, presentando siempre un cierto grado de incertidumbre [6].

Dos tipos de incertidumbres asociadas a muestreo son la exactitud y la precisión [11].

La exactitud (E) es la proximidad entre los valores medidos y el valor "verdadero". Matemáticamente es la diferencia entre el valor verdadero (X) y el valor medio de n valores medidos (X_i):

$$E = X - (X_i / n)$$

Se define "*bias*" como la influencia que hace que la medida de los valores se desvíe del valor aceptado como "verdadero". Los bias están estrechamente relacionado con la exactitud y pueden ser producidos tanto en el proceso de muestreo, como en la preparación de las muestras o durante su cuantificación. Debido a la dificultad para conocer la "verdadera" concentración de micotoxinas en un lote, los métodos para reducir los "bias" son complicados [11].

La precisión o variabilidad (V), viene definida como la proximidad entre los valores medidos en mediciones sucesivas (x_i), bajo determinadas condiciones. La precisión depende únicamente de la distribución de los resultados y no está relacionada con el valor "verdadero" de la medición. La precisión o variabilidad de una medida se puede expresar numérica y estadísticamente mediante medidas de dispersión como la varianza (V), desviación estándar (S) o coeficiente de variación (CV), cuyas ecuaciones son:

$$V = [\Sigma (x_i - m)^2 / (n-1)]$$

$$S = \sqrt{V}$$

$$CV = S/m$$

donde x_i es el valor medido, n es el número de valores medidos y m es la media de los valores medidos [11].

En resumen, la incertidumbre de un proceso viene determinada por la exactitud y por la precisión, pudiendo ambas ocurrir en el muestro, preparación de la muestra o en el análisis.

En la Figura I.C.3., se observa que el error o la variabilidad total de un procedimiento de análisis de micotoxinas es la suma de los errores que ocurren durante las fases de muestreo, la preparación de la muestra y el análisis.

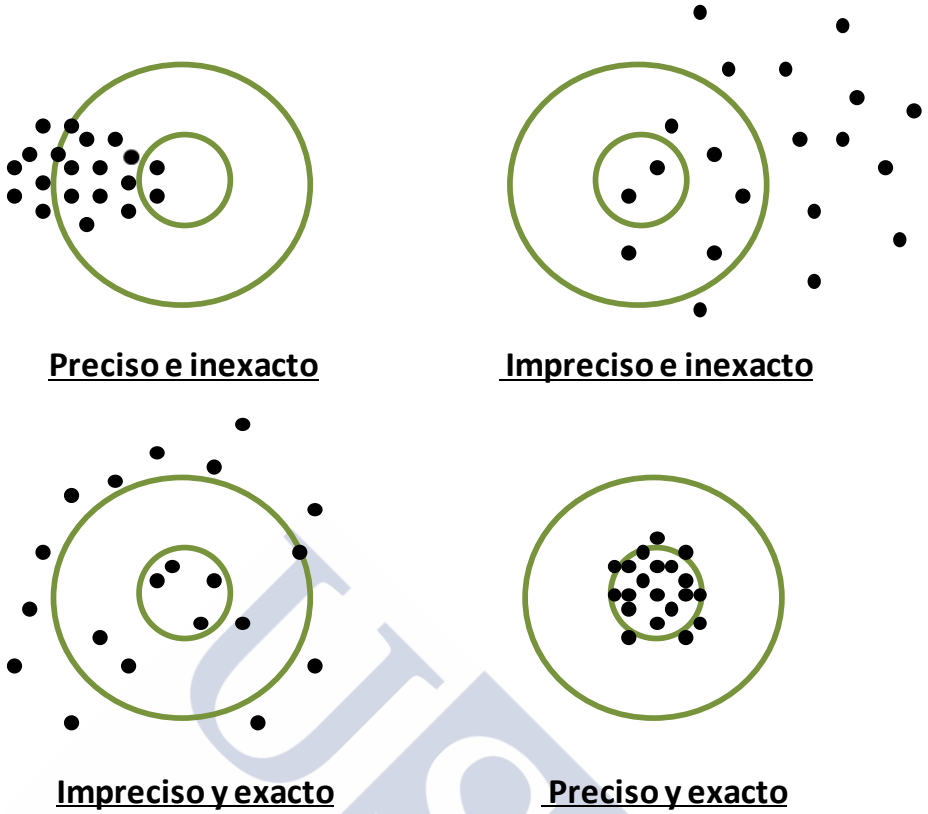


Figura I.C.2. Posibles combinaciones de exactitud y precisión durante el muestreo

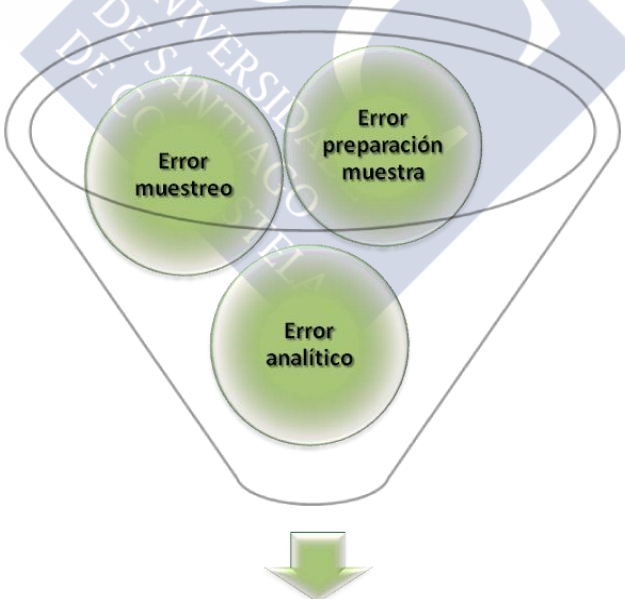


Figura I.C.3. Contribución del error del muestreo, preparación de muestra y analítico en el error total de un análisis de micotoxinas

Es la etapa muestreo la mayor fuente de variabilidad pudiendo representar hasta un 90% del error total en un análisis determinado [8].

Hay dos tipos de de errores asociados al muestreo de micotoxinas [11]:

- Falsos positivos: son los lotes cuya concentración de micotoxinas es menor o igual al límite legal máximo (lotes aceptables) pero que son rechazados en el plan de muestreo.
- Falsos negativos: lotes cuya concentración de micotoxinas supera el igual al límite legal máximo y que son aceptados en el plan de muestreo.

La evaluación de estos dos riesgos derivados de la toma de muestra es de vital importancia a la hora de asegurar la calidad óptima de los programas de control.

Teniendo esto en cuenta, se define Curva característica de operación (CO) como el "gráfico de la probabilidad de aceptar un lote respecto a la concentración del lote cuando se utiliza una estructura específica de plan de muestreo" [12].

La CO ofrece una estimación de los lotes que se rechazan (*falsos positivos*) y de los lotes malos que se aceptan (*falsos negativos*), mediante una estructura de plan de muestreo que es específica para cada análisis de micotoxinas. Como se observa en la Figura I.C.4., la CO representan la relación entre el porcentaje de aceptación de un lote con la concentración de una determinada micotoxina en el lote.

Incrementando el tamaño de la muestra, la pendiente de la CO aumenta, lo que llevaría a una disminución de las dos áreas asociadas con cada riesgo (falso positivo y falso negativo) [11].

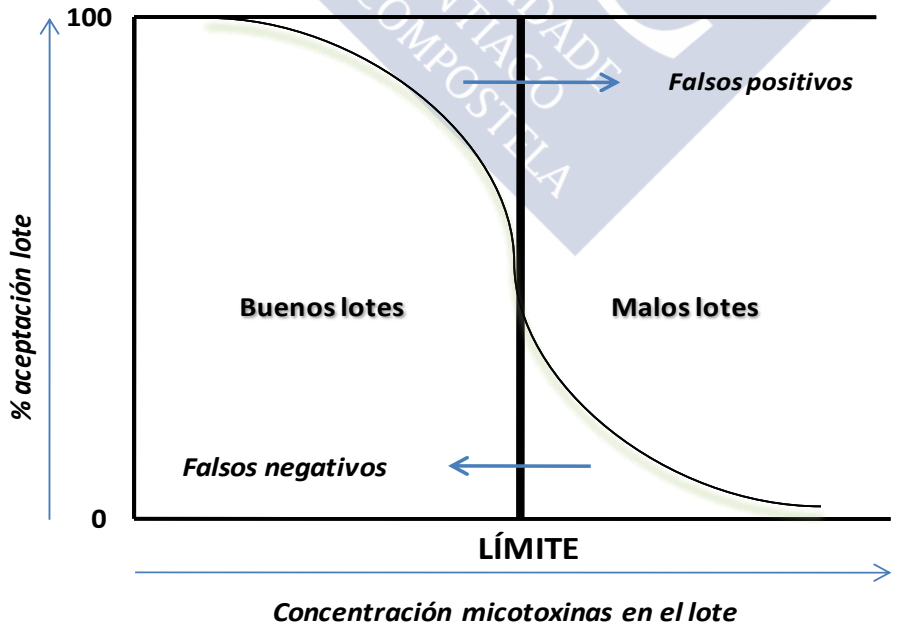


Figura I.C.4. Forma general de una curva característica de operación (CO), según Whitaker [11]

Como conclusión, en la determinación de micotoxinas, el muestreo es la etapa más crucial a la hora de obtener resultados analíticos precisos. Una toma de muestra inadecuada está acompañada de un alto grado de variabilidad y consecuentemente de un análisis de micotoxinas de baja calidad. Un aumento en el tamaño de las muestras, así como una mejor homogenización de las mismas podría contribuir a ver esta variabilidad reducida [8] y contribuir en la representatividad de la muestra.

2.2. Selección de la muestra

La selección de la muestra tomada de un lote es muy importante. Debido a la distribución tan heterogénea de las micotoxinas en los alimentos, la selección de la muestra de un lote tienen gran importancia y debe consistir en una acumulación de pequeñas porciones obtenidas de manera aleatoria y procedentes de distintas posiciones del lote [6]. Cada porción de material tomado al azar de un mismo lugar del lote es conocido como muestra elemental [12]. La FAO/OMS recomienda que cada una de estas porciones sea aproximadamente 200 g y que sean tomadas cada 200 kg de producto [13].

Se distingue entre dos métodos de selección de la muestra dependiendo de si el lote es estático (productos almacenados en camiones, contenedores, silos) o si es dinámico (secuencia en movimiento del producto, como una cinta transportadora). Por lo general, la obtención de una muestra que sea representativa es más compleja en un lote en reposo que en un lote que se encuentra en movimiento [11].

El conjunto de todas las muestras elementales constituye la muestra total [12].

2.3. Preparación de la muestra

Cuando la muestra total es mayor que la requerida, debería ser mezclada y subdividida hasta lograr el tamaño adecuado: proceso de submuestreo [11]. El submuestreo es también una etapa crítica en la que se debe asegurar que la muestra seleccionada sea lo suficientemente representativa del lote [6]. Una vez que la muestra es reducida se puede proceder a la etapa de preparación de muestra.

La preparación de la muestra es el proceso de trituración, homogenización y submuestreo a través del cual se obtiene la porción de muestra extraída y analizada en el laboratorio, comúnmente llamada muestra analítica [6]. Aunque en menor proporción que para el muestreo, también existe variabilidad asociada a la etapa de preparación de la muestra. Ésta se podría ver reducida, ya sea aumentando el tamaño de la submuestra y/o incrementando el grado de molienda o trituración, lo que se traduciría en un mayor número de partículas por unidad de masa para la submuestra [11].

3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

Una vez que la muestra analítica llega al laboratorio se lleva a cabo el proceso de extracción mediante el uso de disolventes orgánicos o de mezclas de estos con agua, seguido de un proceso de limpieza o purificación para eliminar las posibles impurezas que puedan interferir en la cuantificación de las micotoxinas [3]. Ambas etapas, estrechamente relacionadas entre sí, son cruciales en el análisis de micotoxinas tanto en alimentos como en matrices biológicas y suponen alrededor del 61% del tiempo y del coste del análisis [14].

La selección de un método de extracción y/o purificación depende de varios factores, tales como las propiedades físicoquímicas de la micotoxina(s) a analizar, su nivel de concentración en la muestra, el tipo de matriz y la técnica instrumental que se utilizará en la detección [2].

3.1. Factores que afectan al proceso de extracción

En general, se considera una técnica de extracción idónea aquella que es rápida, eficaz, económica y que además tenga en cuenta aspectos relacionados con la contaminación ambiental [14].

A pesar de que los métodos oficiales para el análisis de micotoxinas en diversos productos recomiendan la extracción de micotoxinas en muestras con un tamaño comprendido entre los 10 y 50 g [15-17], en varios estudios publicados en los últimos años en materia de micotoxinas en distintas matrices, el tamaño de la muestra se ha visto reducido incluso a valores de 2 y 5 g [18].

En general, las micotoxinas son extraídas mediante agitación usando disolventes orgánicos o combinaciones de estos con agua [14]. Se trata de seleccionar el disolvente o la mezcla de disolventes que extraigan la mayor cantidad de micotoxina(s) posible. Además, es importante disminuir, en la medida de lo posible la cantidad de disolvente utilizado, en especial aquellos que puedan resultar peligrosos para el medioambiente y para la salud, como es el caso de los disolventes clorados [2]. Entre los disolventes orgánicos más utilizados en la extracción de micotoxinas destacan el metanol y el acetonitrilo, y en menor medida, la acetona. Pero son las combinaciones de estos disolventes con agua las que resultan más eficaces en la liberación de micotoxinas de la matriz alimentaria [19]. La mayoría de micotoxinas son solubles en estos disolventes, que además son estables y volátiles lo que permite su posterior análisis por cromatografía líquida [18, 19].

Dependiendo de la micotoxina(s) que se pretenda extraer, existe un disolvente o mezclas de disolventes más adecuadas que otros. Así, por ejemplo, para la extracción de una toxina tan polar como es el deoxinivalenol (DON), el uso de agua como único extractante resulta muy común. En el caso particular de las fumonisinas, mezclas de disolventes orgánicos (metanol o acetonitrilo) con cierto porcentaje de ácido pueden mejorar la extracción como se ha observado en varios estudios sobre muestras de maíz [14].

En el análisis simultaneo de varias micotoxinas (análisis multi-micotoxinas), la extracción se convierte en el paso más complejo debido a la variedad de propiedades físico-químicas de compuestos [20]. Esto dificulta el desarrollo de un único procedimiento de extracción adecuado para todas las micotoxinas que se pretende analizar, lo que implica llegar a una situación de "compromiso" en la elección del método de extracción [21]. Una amplia variedad de mezclas de disolventes de extracción tales como el acetonitrilo, metanol, acetona, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo se han utilizado; siendo la mezcla acetonitrilo / agua la más comúnmente empleada en extracciones multi-micotoxinas [2]. La mejor eficacia de la utilización de acetonitrilo en comparación con metanol ha sido demostrada por varios autores [21,22], aun cuando ambos presentan polaridades similares. Por otra parte, la acidificación del disolvente de extracción mejora la liberación de micotoxinas ácidas como las fumonisinas, ocratoxina (OTA) y ácido micofenólico [21,23]. Generalmente, la adición de agua o de soluciones ácidas acuosas mejora la calidad de la

extracción, ya que el agua ayuda a la penetración del disolvente en el material, mientras que el ácido contribuye a romper de posibles interacciones entre las micotoxinas y elementos de la matriz como proteínas y azúcares [24].

Además, la extracción en condiciones ácidas es especialmente importante en matrices tan sensibles al pH como son los ensilajes [25, 26].

En general, es importante disminuir, en la medida de lo posible, la cantidad de disolvente utilizado, en especial aquellos que puedan resultar peligrosos para el medioambiente y para la salud, como es el caso de los disolventes clorados [2]. Una relación entre el volumen de disolvente y cantidad de muestra que se considera apropiadas en la extracción de micotoxinas es aquella en las que por cada 1 g de material se utilizan aproximadamente unos 4- 5 ml de disolvente [14].

Otros aspectos a tener en cuenta son la temperatura y el tiempo de extracción. Se considera que para que una extracción y liberación de las micotoxinas de la matriz sea completa, el tiempo de agitación ha de ser una hora, excepto si se trabaja con agitadores a alta velocidad para la cual unos minutos de agitación serían suficientes [14].

Además de la agitación con métodos convencionales (agitador orbital) o con métodos más sofisticados (agitación ultrasónica), en los últimos años los métodos de extracción se han visto mejorados con el uso de nuevas técnicas como la extracción asistida por microondas (MAE), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción por fluidos presurizados (PLE) [27].

Una vez que las micotoxinas son extraídas con el disolvente, unas etapas de centrifugación y/o filtración del extracto son empleadas antes de proceder a la concentración y/o limpieza del mimo [2].

3.2. Extracción de fumonisinas modificadas

Como ya se ha descrito previamente (Sección I.A., Apartado 3.1.3), las fumonisinas modificadas pueden estar unidas a componentes de la matriz (hidratos de carbono, proteínas) lo que provocaría que no puedan ser extraídas por tratamientos convencionales.

De modo general, la extracción de estas fumonisinas modificadas se basa en el tratamiento alcalino (con bases fuertes como el hidóxido sódico o potásico) de la muestra llevando a la eliminación de las cadenas laterales de ácidos tricarboxólicos de las fumonisinas y liberando sus derivados hidrolizados: las fumonisinas hidrolizadas. [28].

Ha sido confirmada la presencia de fumoninas unidas a proteínas en muestras de copos de maíz utilizando una solución detergente de dodecilsulfato sódico (SDS), antes de la hidrólisis alcalina [29].

El SDS es un tensioactivo aniónico que actúa desnaturalizando proteínas a través de la ruptura de enlaces en las moléculas proteicas. Sin embargo, la presencia de SDS en los extractos dificulta las siguientes etapas de separación cromatográfica y detección por espectrometría de masas. Esto se vio mejorado en trabajos posteriores [30-32] donde el SDS fue eliminado de los hidrolizados alcalinos a través de etapa de limpieza, tras la extracción de la muestra hidrolizada con diferentes disolventes (disoluciones de ácido etilendiaminotetraacético o combinaciones de metanol, acetonitrilo y agua).

Recientemente, se han optimizado métodos para la determinación de las fumonisinas y de sus derivados hidrolizados, en los que tras la hidrólisis alcalina, las fumonisinas en su

forma hidrolizada son extraídas mediante el uso de disolventes como el acetonitrilo [33, 34] o el acetato de etilo [35], sin la necesidad de ninguna etapa de limpieza.

3.3. Técnicas de limpieza o purificación

Una de las principales dificultades relacionadas con la determinación de micotoxinas en los ensilados es la alta complejidad de esta matriz, que contiene no sólo componentes característicos de la planta, como clorofila o carotenoides, sino también productos derivados del proceso de fermentación [35]. Estos componentes pueden ser coextraídos con las micotoxinas y, por tanto, interferir en la determinación analítica.

Por todo ello, el proceso de extracción de micotoxinas en silo, como ocurre en el caso de otras matrices, podría requerir etapas de limpieza para eliminar el posible material coextraído de la matriz junto con los analitos.

Los procedimientos de limpieza de micotoxinas incluyen desde la clásica partición líquido-líquido (LLE), hasta diferentes tipos de extracción en fase sólida (SPE), uso de columnas de inmunoafinidad (IAC) y de polímeros molecularmente impresos (MIP), entre otras [2, 19].

Se hará a continuación una breve presentación centrada en los aspectos más importantes de alguna de las técnicas de limpieza o purificación, algunas de las cuales se han desarrollado a lo largo de esta Tesis.

3.3.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

De modo general, la LLE es un tipo de técnica de extracción basada en la partición entre dos disolventes inmiscibles, o parcialmente inmiscibles, en la que los compuestos son separados a través de su migración a aquel disolvente en el que sean solubles. Puede ser utilizada como técnica de limpieza en el análisis de micotoxinas, ya que dependiendo de las solubilidades, la(s) micotoxina(s) de interés migrarían hacia uno de los disolventes mientras que los compuestos interferentes lo harían hacia el otro [36].

Disolventes de tipo apolar, como el hexano o ciclohexano, son algunos de los más utilizados para eliminar interferencias apolares como lípidos y colesterol [37].

A pesar de que es eficaz para la limpieza de varias micotoxinas, el uso de esta técnica es dependiente del tipo de matriz que se quiera analizar [36] y su automatización no es posible.

3.3.2. Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica que puede ser utilizada para la purificación de analitos presentes en un determinado extracto orgánico, a través de la eliminación de posibles compuestos inteferentes que hayan sido coextraídos anteriormente. La disolución que contiene los analitos de interés se hace pasar a través de un material adsorbente (empaquetado en cartucho o columna) de modo que o bien los analitos o bien los compuestos indeseables queden retenidos en él.

Este procedimiento requiere las siguientes etapas [37]:

1) Acondicionamiento del cartucho

Este paso se lleva a cabo primero con metanol (para eliminar la posible humedad del material adsorbente), seguido del disolvente que se utilizará para la elución de los analitos (arrastraría posibles partículas que puedan estar presentes en el cartucho y que posteriormente pueden suponer una interferencia).

2) Carga de la muestra

La disolución que contiene los analitos de interés se hace pasar a través del cartucho de SPE, produciéndose una distribución de los compuestos entre el adsorbente y la disolución.

3) Lavado de las interferencias

A continuación, se procede a la limpieza del material adsorbente con disolvente que no arrastre los analitos de interés, pero sí las interferencias.

4) Elución de los analitos

Los analitos son eluidos con un disolvente cuya polaridad permita su arrastre, después de ser retenidos en el cartucho, obteniéndose finalmente un extracto adecuado para su posterior análisis.

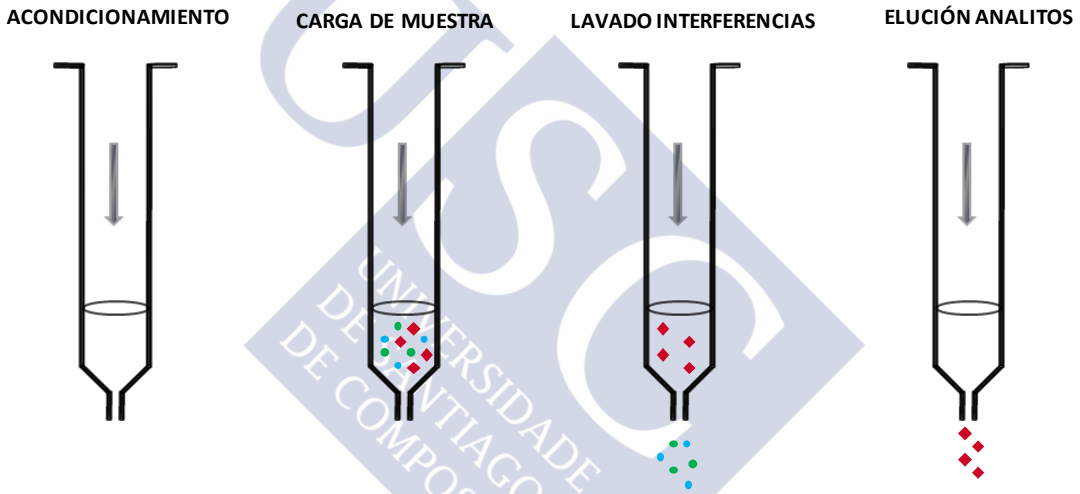


Figura I.C.5. Esquema del procedimiento de SPE

Existe una amplia variedad de materiales adsorbentes con distintas características físicas como el tamaño del poro, área superficial, volumen de poro y tamaño de partículas. La elección del cartucho adecuado viene condicionada por el tipo matriz alimentaria, los analitos e interferencias presentes y en el tipo de disolvente en la elución de los analitos [2].

Entre los materiales adsorbentes más frecuentemente utilizados en la limpieza de micotoxinas destacan los cartuchos C_8 y C_{18} (resistente a la presión y con alta reproducibilidad), los cartuchos de intercambio aniónico (SAX) (adecuados para compuestos aniónicos como la ocratoxina o las fumonisinas) [39] y los cartuchos además de otro tipo de adsorbentes copoliméricos como son los cartuchos HLB [2]. Este último tipo consiste en un adsorbente copolimérico que tiene la ventaja de presentar en su estructura distintos centros químicos, capaces de retener micotoxinas con distintas polaridades. Este tipo de cartuchos ha sido utilizado para eliminar los restos de SDS de los hidrolizados alcalinos en el análisis de fumonisinas modificadas [30-32], como ha sido explicado en el apartado anterior.

Por lo general, la SPE es una técnica robusta, eficiente y reproducible [36]. Sin embargo, el hecho de que en ocasiones el análisis de varias micotoxinas no sea posible con un único

cartucho, o la gran influencia de factores como el tipo de disolvente, la fuerza iónica de la muestra o el pH, son algunos de los principales inconvenientes de esta técnica [36].

En los últimos años, la extracción en fase sólida se ha visto mejorada con el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC), que, debido a su alta selectividad y su facilidad de uso, han ganado terrero en el análisis de micotoxinas [2]. Las IAC se basan en el principio de la unión específica analito-anticuerpo. Estas columnas contienen anticuerpos específicos para una micotoxina determinada [40]. El procedimiento consiste en hacer pasar el extracto objeto de análisis a través de la columna, de modo que las micotoxinas son "atrapadas" selectivamente por los anticuerpos y las impurezas, por tanto eliminadas. Tras una fase de lavado, las micotoxinas son eluidas de las columnas haciendo pasar un disolvente en el que sean miscibles [2, 40].

A pesar de la alta especificidad, rapidez y limpieza de los extractos obtenidos con esta técnica, existen una serie de desventajas, tales como la necesidad de trabajar con extractos en solución acuosa sin contener disolventes orgánicos, ya que estos podrían desnaturalizar los anticuerpos contenidos en las columnas. Además, debido a reactividades cruzadas con otras micotoxinas, existe la posibilidad de interacciones que no sean específicas. El alto coste de estas columnas y el hecho de que sólo puedan ser usadas una única vez, son otros de sus inconvenientes [2].

Actualmente, están disponibles en el mercado IAC para tricotecenos (DON y las toxinas T-2 y HT-2), aflatoxinas de los grupos B, G y M, OTA, fumonisinas, zearalenona (ZEA) y citrina [40, 41]. Además también han sido desarrolladas IAC multifuncionales para la detección simultánea de diferentes grupos de micotoxinas, como por ejemplo ocratoxina y las aflatoxinas [41].

Otra técnica de limpieza recientemente desarrollada, corresponde al uso de columnas MycoSep y MultiSep (de Romer Labs) caracterizadas por contener una mezcla de adsorbentes, tales como celita, resinas de intercambio iónico, carbón, polímeros [2], que son específicos para las principales micotoxinas. Estas columnas permiten la purificación en un solo paso, sin la necesidad del acondicionamiento previo, mediante la retención de sustancias interferentes, como proteínas, lípidos, pigmentos, etc en el material adsorbente. Existen columnas con adsorbentes de distinta composición, cuya elección viene determinada por la micotoxina o grupo de micotoxinas que se vayan a analizar [40]. Se trata de un procedimiento de limpieza sencillo y rápido, pero que cuenta con algunas desventajas, tales como que son de un solo uso y la purificación, dependiendo de la matriz, no es siempre eficaz [2].

Más recientemente, la misma compañía (Romer Labs) desarrolló una nueva columna destinada a la purificación de extractos procedentes de matrices complejas, tales como piensos y silos: columna MycoSpin. Dicha columna posee también una combinación de adsorbentes, pudiendo ser utilizada para el análisis simultaneo de una gran variedad de micotoxinas legisladas: ZEA, tricotecenos (DON, nivalenol, acetildeoxinivalenol, T-2, HT-2, fusarenona X, diacetoxifenol, neosolaniol), la familia de las aflatoxinas y la OTA [40].

3.4. QuEChERS

El procedimiento QuEChERS, que atiende a las siglas de las palabras: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* y *Safe* (acrónimo del inglés de: rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y

seguro), ha sido desarrollado por Anastassiades et al. [42], con el objetivo de alcanzar un análisis multiresiduo rápido y barato que proporcione unos datos satisfactorios. Inicialmente, esta metodología fue propuesta para la determinación de pesticidas, pero recientemente ha sido también empleada para la extracción y purificación de micotoxinas en matrices como cereales, piensos y silos [18].

De manera genérica, el método QuEChERS consta de dos etapas como se presentan a continuación:

1) Etapa de extracción: basada en el reparto de los analitos de interés entre una fase acuosa y un disolvente. Los disolventes orgánicos más comúnmente utilizados son el acetonitrilo, acetato de etilo y la acetona. Con el objetivo de eliminar la posible humedad presente en la muestra y ayudar al reparto de los analitos hacia la fase orgánica, se trata posteriormente con sales como el sulfato de magnesio o el sulfato de sodio [43].

2) Etapa de purificación: a través de un proceso de dispersión en fase sólida (dSPE) del extracto orgánico con diferentes adsorbentes tales como amina primaria y secundaria (PSA), C_{18} y carbón grafitizado, que consiguen eliminar posibles interferentes (pigmentos, lípidos, esteroles, etc.) presentes en la matriz.

Un procedimiento QuEChERS modificado con exclusión de la etapa de purificación por dSPE, ha sido desarrollado en varios estudios para el análisis de múltiples micotoxinas en alimentos, piensos y ensilados [45-50]. Además, las micotoxinas eran extraídas de la matriz con acetonitrilo acidificado, asegurando de este modo la extracción de las fumoninas. Para compensar la posible variación de pH, el acetonitrilo fue tamponado con acetato de sodio en un estudio multi-micotoxinas en ensilados de maíz [45]. Debido a la amplia gama de polaridades de las micotoxinas, la etapa de limpieza dSPE ha sido omitida en estos métodos, ya que la PSA puede eliminar compuesto polares [42], con lo que se podrían perder alguna de las micotoxinas de interés. Por otro lado, la amina PSA se pude unir a micotoxinas de carácter ácido tales como las fumonisinas [46, 47], ácido micofenólico, OTA [45], dificultando su extracción.

Más recientemente, para el análisis multi-micotoxina en matrices complejas como piensos y ensilados de maíz, se ha descrito un método QuEChERS que sí incluía una etapa de limpieza del extracto con adsorbente de sílice C_{18} [51, 52].

3.5. Inyección directa sin purificación

En el caso del desarrollo de métodos multi-micotoxinas, la gran diversidad de polaridades y de propiedades físicas de los analitos, dificulta en gran medida el poder encontrar un método de extracción y de purificación que sea compatible para todas ellas. Teniendo en cuenta todo esto, reducir al mínimo el tratamiento de la muestra podría suponer una gran ventaja [53].

Así, han sido desarrolladas metodologías de análisis multi-micotoxinas rápidas y sencillas, que consistían en la inyección directa del extracto de la muestra sin previa etapa de limpieza [54-56]. Estos métodos simples de extracción han sido posibles gracias a la utilización de la cromatografía líquida con detección de masas, que han permitido la determinación de extractos sin la aplicación de ninguna etapa de purificación [53].

Las desventajas que puede presentar una técnica como esta son aparición del indeseable efecto matriz (debido a la gran cantidad de interferencias) y la contaminación de

los instrumentos al trabajar con gran cantidad de matriz [54]. Sin embargo, la dilución del extracto antes de su inyección ha demostrado ser una estrategia adecuada para eliminar en cierta medida dichas interferencias [54, 57-62]. Es el llamado método *"dilute and shoot"* ("diluir y disparar").

Para concluir, se puede decir que uno de los objetivos en los análisis multi-micotoxinas es la simplicidad de los métodos. Esta técnica de inyección directa sin etapa de purificación, además de proporcionar la sencillez de análisis requerida, permite incluir en un solo análisis una amplia variedad de micotoxinas, así como nuevos metabolitos [18].

4. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El análisis propiamente dicho, que incluye la separación y la detección de las micotoxinas de interés, se consigue normalmente por técnicas cromatográficas seguidas de distintos métodos de detección.

La cromatografía de gases (CG) es considerada como una potente técnica de separación. Sin embargo, debido a la necesidad de la etapa de derivatización previa al análisis que esta técnica requiere, su uso en la determinación de micotoxinas se ha visto limitado [63].

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha destacado como la técnica de separación mayormente utilizada, pudiendo ser acoplada a diversos detectores: UV, FLD, PDA, espectrómetro de masas. Mientras que detectores como el de FLD han sido optimizados para un solo analito o un grupo químico de analitos [2], la combinación de varios sistemas de detección, como por ejemplo UV-FLD o PDA-FLD, permitiría detecciones de múltiples compuestos a partir de uno sola muestra [36]. Sin embargo, es la cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas en modo tándem (LC-MS/MS) la más desarrollada en los últimos años y la que se presenta como la alternativa más eficaz para el análisis multi-micotoxinas [64]. A partir de una misma muestra y de un tratamiento común, esta técnica hace posible la detección simultánea de todo un conjunto de moléculas de interés. Además, permite alcanzar límites de detección y de cuantificación muy bajos en matrices complejas, así como excelentes valores de repetibilidad y de reproducibilidad.

Con el objetivo de analizar micotoxinas en muestras de maíz y de silo de maíz, a lo largo del desarrollo de esta Tesis se han utilizado dos equipos HPLC, uno provisto de un detector UV/VIS por array de diodos en serie con un detector de fluorescencia (HPLC-PDA-FLD) y otro acoplado a un detector de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS).

En los siguientes apartados se describirá la técnica de separación HPLC y se explicará brevemente el funcionamiento de los detectores de FLD y PDA. Sin embargo, dado que este trabajo se ha centrado principalmente en el desarollo de métodos de análisis de micotoxinas, bien por familias o bien multi-micotoxinas, utilizando la LC-MS/MS, una descripción más detallada de la espectrometría de masas será presentada.

4.1. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación de componentes de una mezcla basada en la diferente afinidad que dichos componentes presentan entre una fase móvil y una fase estacionaria.

La fase móvil es un líquido o mezcla de varios líquidos que fluyen permanentemente a través de una columna (columna cromatográfica) que contiene la fase estacionaria. Esta fase móvil arrastra con ella a los componentes de la muestra que en función de su interacción con la fase estacionaria, son retenidos en mayor o menor medida y eluidos secuencialmente a través del cambio de polaridad de la fase móvil. Se consigue de este modo la separación cromatográfica de los analitos de interés.

El conocimiento de la estructura molecular de los compuestos a separar es crucial para la selección de la composición y la naturaleza adecuada de la fase estacionaria y de la fase móvil.

El tipo de cromatografía líquida más ampliamente utilizado es la HPLC en fase reversa. En ella, los analitos son distribuidos entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar, en la que los compuestos más polares de la mezcla quedan menos retenidos en la fase estacionaria, siendo los primeros en eluir de la columna cromatográfica.

La fase estacionaria utilizada con más frecuencia en este tipo de cromatografía, es la silica, que gracias a su estructura rígida y a su alta resistencia es capaz de resistir altas presiones. Se trata de un sólido poroso que, a través de los grupos silanol (SiOH) presentes en su superficie, reacciona químicamente con compuestos orgánicos mediante interacciones de carácter polar. A su vez, en este tipo de columnas, la sílica está modificada con distintos grupos funcionales hidrofóbicos, siendo el octadecilo (C_{18}) el más empleado En general, una disminución en el tamaño de las partículas de silica provoca un aumento en la presión en el sistema cromatográfico y una mejora en la separación cromatográfica (resolución de la columna). Además proporciona otra serie de ventajas como son reducciones en los tiempos de análisis, menor consumos de disolvente y reducción de la longitud de la columna [2].

Por lo general, la HPLC en fase reversa es una técnica de separación adecuada para muestras que contengan compuestos iónicos y neutros de bajo peso molecular y soluble en mezclas de disolventes orgánicos con agua [18].

Teniendo en cuenta que la mayor parte de las micotoxinas de interés se caracterizan por su pequeño tamaño y su relativo carácter polar, la separación por HPLC en fase reversa utilizando como posibles fases móviles mezclas de agua con solventes polares tales como el metanol o el acetonitrilo, es comúnmente empleada en el análisis de micotoxinas [63]. Generalmente, las columnas más utilizadas en el análisis de micotoxinas son columnas C_{18} en las cuales las partículas esféricas de silica cuentan con un diametro que oscila entre las 3 y las 5 μm [18].

Una fase móvil idonea es aquella que proporciona un adecuado rendimiento cromatográfico (buenos picos cromatográficos, buena separación entre picos) y es normalmente seleccionada en base a las propiedades físico-químicas de los analitos y a los tiempos de retención deseados. Generalmente, en análisis multi-micotoxinas, mezclas de agua con disolventes como el acetonitrilo o el metanol son las más utilizadas, siendo el metanol el más comunmente elegido en la separación de varias micotoxinas [18].

Otra variable importante en la cromatografía en fase reversa es el pH de la fase móvil que debe ser ajustado en función de los pKa de los analitos y asegurar que los compuestos están en su forma neutra. Así por ejemplo, para micotoxinas como las ocratoxinas o las fumonisinas, debio a la existencia de grupos carboxílicos que ambas presentan en su estructura molecular, trabajar en condiciones ácidas resulta ventajoso [63, 65]. Ácidos orgánicos, tales como el ácido acético o ácido fórmico, pueden ser utilizados en la

acidificación de las fases móviles [18]. Además, tampones como el formiato de amonio o acetato de amonio pueden también ser añadidos, ayudando a controlar el valor del pH de la fase móvil a lo largo del análisis cromatográfico.

4.2. Detección por ultravioleta y por fluorescencia

Los detectores son dispositivos capaces de reconocer sustancias que están siendo eluidas de la columna cromatográfica al producirse alguna propiedad específica del analito, como la absorbancia o la fluorescencia. Algunos de los detectores comúnmente utilizados para el análisis HPLC son los detectores UV, el PDA y los detectores de FLD.

Los detectores UV y PDA son considerados como detectores de absorbancia. Ambos detectores se basan en la medición de la absorción de radiación de UV por determinados compuestos y que es capaz de producir transiciones electrónicas a longitudes de ondas características de la estructura molecular de cada compuesto. La absorbancia de un compuesto es función de la concentración molar de la sustancia y de la longitud de onda. Para los dectores de UV, una longitud de onda entre 195-370 nm debe ser elegida en función del analito objeto de estudio [66]. Mediante el uso de un monocromador, estos detectores de UV seleccionan la longitud de onda deseada (luz monocromática). Es posible la obtención de un espectro completo desde 190 hasta 370 nm y, en algunos casos, la longitud de onda puede variar a lo largo de la separación cromatográfica.

Un tipo diferente de detector es el de fotodiodos en array (PDA), uno de los detectores que ha sido empleado para la realización de esta Memoria. Este detector, a diferencia del presentado anteriormente, no presenta monocromador antes de la celda de flujo, esto es, no existe selección de longitud de onda por lo que la muestra recibe la radiación lumínica total. Una vez que esta radiación haya atravesado la muetra, es dispersada mediante una red de difracción y se hace incidir sobre un total de 200 a 1000 diodos. De este modo, se obtiene simultáneamente, cada 1-2 nm, el espectro completo de muestra que atraviese la celda. Entre algunas de las ventajas que presenta este tipo de detectores, detacan:

- Información cualitativa para identificar los compuesto separados a través de sus espectros. A partir de estos detectores, es posible la obtención de cromatogramas tridimensionales (Absorbancia- longitud de onda- tiempo).
- Permite, en un sólo análisis, la detección simultánea de diferentes componentes de la muestra a varias longitudes de onda.
- Determimación de la longitud de onda más adecuada sin necesidad de repetir los análisis.

Otro tipo de detector también utilizado en este trabajo, es el detector de fluorescencia (FLD), que ha sido utilizado conjuntamente (en serie) con el detector expuesto anteriormente.

Los detectores de FLD utilizan la capacidad que ciertas moléculas orgánicas, gracias a contener grupos funcionales específicos, poseen para ser excitadas por absorción de radiación, por lo general ultravioleta, y de reemitir parte de la energía a longitudes de onda superiores. Existen compuestos que presentan fluorescescencia natural y otros que se pueden convertir en fluorescentes mediante una conveniente derivatización. Esto es, compuestos que no poseen fluorescencia de manera natural, se unen a determinadas

moléculas fluorescentes, conviertiéndose en nuevos compuestos que sí prensentan fluorescencia.

Se trata de detectores muy sensibles (unas 1000 veces más que los detectores de UV) y altamente selectivos, al ser pocas las moléculas que exhiben fluorescencia [67].

De modo general, el funcionamiento de estos intrumentos responde al siguiente esquema. La radiación, procedente de una fuente de excitación, pasa a través de un filtro o de un monocromador (selector de longitud de onda de excitación), donde la longitud de onda de excitación es seleccionada, incidiendo a continuación sobre la muestra. Parte de esa radiación es absorbida por la muestra y alguno de sus componentes producen luz fluorescente que es emitida en todas las direcciones. Parte de esta radiación fluorescente pasa a través de un segundo filtro o monocromador, donde se seleccionará la longitud de onda de emisión. Este selector de longitud de onda de emisión se encuentra en perpendicular con el selector de onda de excitación para minimizar el riesgo de que la radiación de excitación entre en el detector (fotomultiplicador).

Dada a su alta especificidad, los detectores FLD, pueden ser utilizados en la determinación de compuestos fluorescentes presentes en muestras complejas. La posibilidad de obtenión de espectros tanto de emisión como de excitación que presentan estos detectores, supone una gran ventaja a la hora de identificar compuestos que son eluidos de la columna [67].

La HPLC con detección UV o por FLD pueden ser utilizados en la cuantificación de micotoxinas en una gran variedad de matrices [63]. A pesar de que la mayoría de los tricotecenos presenten una débil absorción UV, DON y sus derivados acetilados pueden ser analizados a través de HPLC-UV con buena precisión y exactitud tal y como ha sido demostrado en matrices como cereales [68]. El DON presenta una longitud de onda corta de 220 nm [1].

Además, varios métodos para la determinación de tricotecenos en productos destinados a alimentación animal, en los que la técnica empleada era HPLC-UV o HPLC-PDA han sido también publicados [1, 69].

Por otra parte, exiten micotoxinas, que debido a la presencia de grupos fluoróforos en su estructura química, presentan fluorescencia de manera natural. Ejemplo de ellos son las aflatoxinas, OTA y ZEA, pudiendo por tanto ser analizadas mediante HPLC-FLD [36].

En esta Memoria se ha procedido al análisis de DON y ZEA en muestras de maiz y de silo de maiz utilizando la ténica de separación HPLC con dos detectores en serie : PDA (para la deteccion de DON) y FLD (para la detección de la ZEA). Dado las propiedades de estas dos micotoxinas, como ha sido explicado anteriormente, ninguna etapa de derivatización ha sido requerida.

Figura I.C.6. Cromatógrafo de líquidos HPLC con detector PDA y de fluorescencia en serie empleado en el análisis de DON y ZEA

4.3. Detección por espectrometría de masas

4.3.1. Fundamentos de la técnica

La espectrometría de masas es una poderosa técnica analítica, altamente sensible, que permite la identificación inequívoca de compuestos.

Está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, siendo posteriormente separados en función de su masa y de su carga para finalmente ser detectados.

Como resultado de ello, se obtiene los espectros de masas, que representan la abundancia relativa de los distintos iones en función de su relación masa/carga (m/z). Esto es dependiente de la estructura química del compuesto, por lo que la espectrometría de masas es una técnica que ofrece una enorme cantidad de información sobre un determinado compuesto, pudiendo ser usada tanto para a la identificación de analitos desconocidos como para la cuantificación de compuestos conocidos en muestras complejas. La detección puede llevarse a cabo cuando el analito está presente en cantidades relativamente pequeñas.

El proceso de espectrometría de masas desempeña básicamente cuatro funciones:

1) Vaporización de los analitos procedentes de la fase móvil
2) Generación de de iones a partir de los analitos en fase gaseosa
3) Separación de los iones en función de su masa/carga
4) Detección de los iones y producción de la señal eléctrica correspondiente

Figura I.C.7. Cromatógrafo de líquidos acoplado a detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum utilizado.

4.3.2. Instrumentación

La instrumentación de un espectrómetro de masas es compleja. El detector de masas que se ha utilizado en este trabajo consta las siguientes partes, relativamente independientes entre sí: fuente de ionización a presión atmosférica, zona de óptica iónica, el analizador (formado por tres cuadrupolos) y el sistema de detección (formado por un dinodo y un fotomultiplicador).

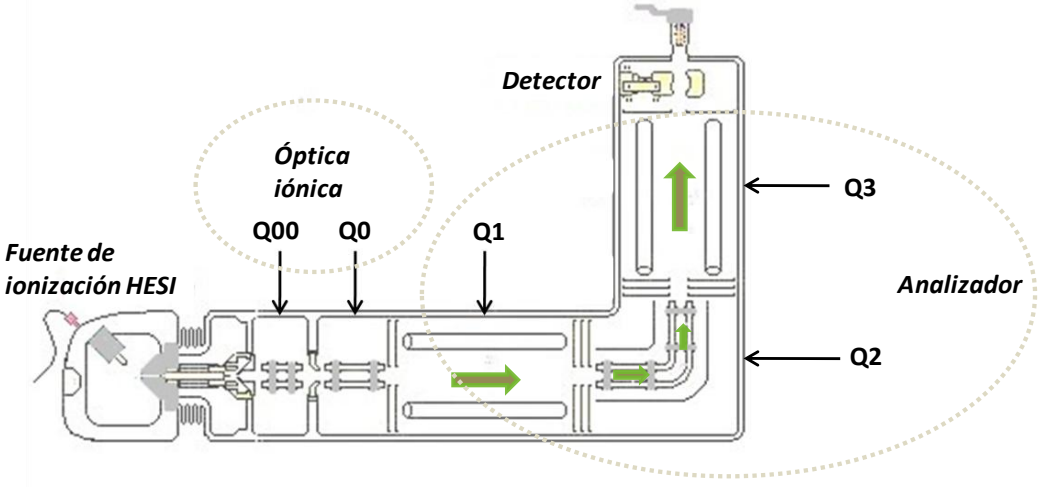


Figura I.C.8. Esquema del detector TSQ Quantum utilizado

Los analitos que viajan con la fase móvil, llegan a la fuente de ionización, donde a partir de una serie de procesos se ionizan y pasan a fase gaseosa, para seguir avanzando a lo largo de las distintas partes del espectrómetro de masas. Al llegar al analizador, son separados en

función de su masa/carga mediante la aplicación de diferentes voltajes, para posteriormente alcanzar la zona de detección, donde la señal se amplifica y se registra. Todo el sistema está sometido a un gradiente de presión que va desde la fuente (a presión atmosférica) hasta la zona del analizador y del detector ,con un vacío del orden de 10^{-5} Torr, que es generado con la ayuda de dos bombas: bomba turbomolecular y bomba rotatoria mecánica de alto vacío.

A continuación, se procederá explicar brevemente las distintas partes del espectrómetro utilizado.

1) Fuente de ionización a presión atmosférica (HESI)

En este trabajo se ha utilizado una fuente de ionización por el electrospray ESI (*Electrospray Ionization*), que trabaja en condiciones de presión atmosférica y que permite la aplicación del calor. Se habla entonces de la ionización por electrospray calentado HESI (del inglés *Heated Electrospray Ionization*).

El electrospray es una forma de ionización suave en la que los iones en solución son transformados en iones en fase gaseosa, a través de un proceso llevado a cabo en varias etapas [70]. Los analitos disueltos en la fase móvil (siempre más volatil) pasan a través de una aguja capilar metálica sobre la cual se aplica un voltaje, consiguiendo que los analitos ionicen. Dependiendo de la polaridad del voltaje aplicado, hablamos de modo de ionización positivo o negativo. Debido a la repulsión entre las cargas eléctricas, el líquido a su salida del capilar forma un aerosol (nube de finas gotas cargadas). A continuación, una vez que el disolvente es evaporado y eliminado, las gotas ven reducido su tamaño, aumentando de este modo la densidad de carga y produciéndose la dersorción de los iones en la fase gaseosa.

Figura I.C.9. Fuente de ionización HESI

En el cuerpo de la sonda existe la entrada para los gases envolvente y auxiliar. Ambos gases son flujo de nitrógeno aplicados de forma coaxial. El gas envolvente pulveriza la solución de la muestra a la salida de la aguja capilar, donde el gas auxiliar calentado ayudará al gas envolvente en la desolvatación de las moléculas cargadas. Los analitos en forma iónica

y gaseosa entran en la fuente de ionización (a presión atmosférica) y continuan hacia el interior del analizador de masas (zona de baja presión).

La fuente de ionización HESI resulta ser adecuada para el análisis de compuesto polares y para analitos de alto peso molecular.

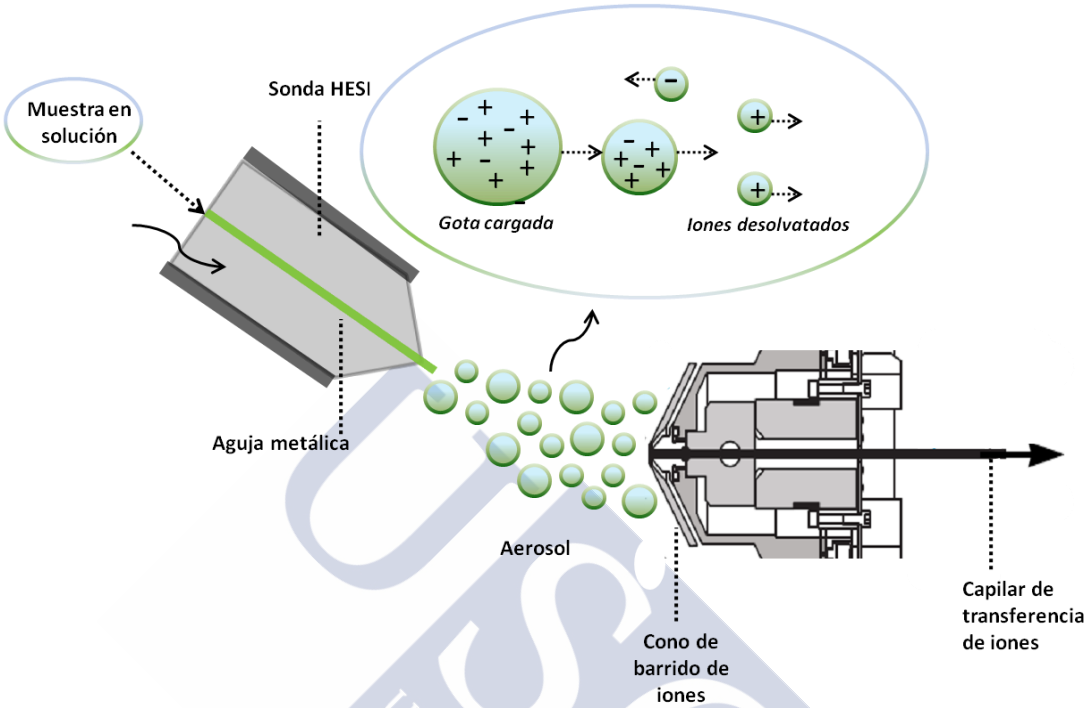


Figura I.C.10. Esquema del funcionamiento de HESI en el modo de ionización positivo

2) Zona de óptica iónica (Q0, Q00)

A través de un capilar de transferencia, los iones procedentes de la fuente alcanzan la óptica iónica, zona formada por un conjunto de lentes, un pequeño cuadrupolo (Q00) y seguido de un octapolo (QO). Cuanta además con la presencia de un skimmer, zona en la que se establece un gradiente de presión para suavizar el paso de los iones procedentes de la fuente (a presión atmosférica) y que se dirigen al analizador (10^{-5} Torr). Se consigue así, la amortiguación del vacío.

Las funciones de la zona de óptica iónica son: realizar una criba de las partículas antes de que lleguen al analizador, deshacer clusters e aductos mediante una corriente de gas en sentido contrario a los analitos y además proporciona energía cinética a los iones para que en la celda de colisión los choques sean más efectivos.

Es la zona del espectrómetro de masas en la que se producen más perdidas y en donde se eliminan la mayor parte de las interferencias. Además, son muchos los parámetros que tienen que ser optimizados en esta zona, de los que dependerá la cantidad de iones que alcancen el analizador.

3) Analizador de triple cuadrupolo (Q1, Q2, Q3)

Esta es la parte del sistema que se encuentra a baja presión y a la que llegan los iones que hayan traspasado la zona de óptica iónica. Es en el analizador donde tendrá lugar la separación de los iones en función de su m/z, mediante la aplicación de campos eléctricos y magnéticos.

Está formado por tres cuadrupolos, Q1, Q2 y Q3 colocados en serie. Dependiendo del tipo de análisis, Q1 y Q3 pueden actuar como transmisores de iones o como analizadores de masas, mientras que el Q2 solamente puede actuar como transmisor de iones. Los iones que vienen del Q1, colisionan en Q2 (celda de colisión) y pasan a Q3. La presencia de una corriente de argón se encarga de la fragmentación de los iones en Q2 antes de su llegada al detector.

Cada cuadrupolo se mueve debido al intercambio de polaridades de las cuatro barras que lo forma, creándose un campo electrostático cuyas oscilaciones son solamente estables para aquellos iones de una determinada relación m/z. Aquellos iones que no son estables dentro del campo magnético son eliminados, mientras que aquellos que sí lo son, avanzan a lo largo del cuadrupolo, aspirados por el vacío, y logran alcanzar el detector.

En el espectrómetro de masas utilizado y tal y como se puede observar en la Figura I.C.10., los cuadrupolos adquirían una distribución ortogonal dentro del analizador (Q1 en perpendicular con Q3, teniendo Q2 una forma curva). Esta distribución además de eliminar gran cantidad de interferentes en el análisis, permite utilizar tiempos de escaneo muy pequeños (10-20 ms), lo que resulta de gran utilidad cuando se analizan varios compuestos simultáneamente, dado que el número de transiciones a determinar es muy elevado. Por lo tanto, este tipo de analizador resulta ser idóneo para los análisis multiresiduos.

4) Sistema de detección

Es en esta parte en la que se recogen y se caracterizan los iones que salen del analizador. Está formado por un dinodo de conversión, que al recibir el impacto producido por las partículas cargadas, emite una serie de partículas secundarias (electrones, partículas neutras, iones de carga inversa a los iones que llegan al detector). Estas partículas, movidas por una diferencia de potencial, alcanzan el multiplicador de electrones, lugar en el que dichas partículas generan electrones originando un efecto en cascada que amplifica fuertemente la señal. Las partículas generadas chocan con un ánodo produciendo una señal eléctrica que posteriormente será registrada forma de pico cromatográfico.

En función del tipo de corriente aplicada, los cuadrupolos pueden actuar como transmisores o analizadores, lo que permitiría llevar a cabo distintos modos de adquisición:

Full Scan:

- Los tres cuadrupolos actúan como transmisores de iones.
- Se hace un barrido de iones dentro de un rango m/z.
- Sólo los iones producidos en la fuente dentro de ese rango llegan al detector.

SIM (Monitorización de un solo ion):

- En Q1 se aplica un voltaje y sólo los iones seleccionados pasan a Q2 y Q3.
- Se genera el espectro SIM del compuesto: representación m/z de los iones y la intensidad de los mismos.
- Más selectivo que el método anterior, pero con mayor posibilidad de pérdida de información y de falsos positivos.

SRM (Monitorización de reacciones selectivas):

- En Q1 se selecciona un ion padre que será fragmentado en la celda de colisión (Q2) en iones hijos, definiendo las transiciones de los compuestos. Los iones hijos de una determinada m/z y procedentes del ion seleccionado en Q1, serán los que lleguen a Q3.

- Es más selectivo que el método anterior, pues los posibles analitos interferentes, con misma m/z que el compuesto de interés, se fragmentarán de forma distinta en Q2 y no podrán alcanzar Q3.

Full MS/MS:

- Se lleva a cabo un barrido de los fragmentos MS/MS a partir de los iones producidos en la fuente.

- Al llegar a Q1 los iones se ven sometidos a un campo eléctrico, de modo que los que sean estables, serán fragmentados en Q2. Los productos de la primera fragmentación (con mayor m/z) necesitarán energías de colisión bajas, mientras que los iones de las segundas y terceras colisiones (con menor m/z), necesitan mayores energías de colisión.

- En Q3 se aplicará un gradiente de energías de colisión (de mayor a menor valor) mientras se realiza un escaneado de las masas (desde valores bajos de m/z hasta los altos). Esta técnica se denomina RER (del inglés *Reversed Energy Ramp*).

- Se obtiene un espectro de MS/MS completo muy intenso y rico en fragmentos que es específico de cada compuesto, lo que se traduce en una mejora de la sensibilidad de los iones productos.

4.3.3. Aspectos de la técnica LC-MS/MS

Existen una serie de aspectos a tener en cuenta cuando se utiliza la espectrometría de masas como técnica de análisis:

**Elección de la fase móvil y del modo de ionización*

En los análisis LC-MS/MS, la composición de la fase móvil no debe ser únicamente seleccionada en función de parámetros cromatográficos (separación), sino que el análisis por masas también deber ser considerado. Para tal selección, uno de los requisitos previos es el uso de disolventes volátiles y compatibles con la ionización [18]. Mezclas de agua y disolventes orgánicos, como el metanol o el acetonitrilo, son habitualmente utilizadas en el análisis multi-micotoxinas cuando se emplea la detección por masas, en los que la mezcla agua/ metanol por lo general incrementaba el rendimiento de ionización y, por lo tanto la sensibilidad, para la mayoría de las micotoxinas [2].

En la técnica de ionización ESI, distintos iones se generan en función del modo en el que se trabaje y de la fase móvil utilizada. Así por ejemplo, iones como $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ o $[M+NH_4]^+$ son observados en modo positivo, mientras que $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+CH3COO]^-$ o $[M+HCOO]^-$ son comunes al trabajar en modo negativo, siempre dependientes de la fase móvil que utilicemos.

La selección del modo de ionización es un factor importante en el análisis de micotoxinas, ya que la sensibilidad entre trabajar en modo positivo o negativo puede variar dependiendo de la micotoxina [71].

Habrá micotoxinas que ionicen mejor en modo positivo, formando iones protonados $[M+H]^+$; otras en modo negativo a través de iones desprotonados y otras que lo puedan hacer en ambas polaridades (como la OTA y la ZEA). Sin embargo, exiten micotoxinas que en ocasiones pueden presentar escasa ionzación en las formas protonada o desprotonada. Un buen ejemplo de esto son las micotoxinas pertenecientes a la familia de los tricotecenos. Una posible manera de mejorar la ionización sería la formación de aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ (en modo positivo) o aductos de formiato $[M+HCOO]^-$ o acetato $[M+CH3COO]^-$, en

modo negativo. Esto requeriría el uso de fases moviles tampones, tales como formiato o acetato de amonio. Además la formación de los aductos se puede ver mejorada mediante la acidificación de dichos tampones con ácidos orgánicos (fórmico y/o acético) [2].

La concentración de los tampones que se añaden a las fases móviles, es otro factor a tener en cuenta. Concentraciones elevadas pueden dificultar la evaporación e ionización por la formación de par iónico, lo que se traduciría en una supresión de la señal.

**Efecto matriz.*

La presencia de ciertos componentes de la matriz, como hidratos de carbono, lípidos, proteínas, pigmentos, etc., pueden co-eluir con los analitos de interés y alterar la ionización de los analitos Esto se traduce en un aumento o en una disminución (supresión de iones) de la señal analítica y tiene efectos adversos sobre la sensibilidad del análisis. Dicho fenómeno es conocido como efecto matriz [71,72], y ocurre habitualmente cuando se trabaja con espectrometría de masas, con lo cual ha de ser tenido en consideración. Como para otras familias de compuestos, efectos matriz también son observados para las micotoxinas en distintas matrices alimentarias [72].

Mucho de los procedimientos de limpieza o purificación de micotoxinas, a veces incluidos como etapa posterior a la extracción, no siempre son capaces de evitar los efectos de matriz, por lo que estos estarán presentes durante el análisis por LC-MS/MS [72].

Sin embargo, existen una serie de estrategias que ayudarían a minimizar este indeseado efecto matriz. Una de ellas es la cuantificación de las micotoxinas a través de la técnica *"matrix-matched calibration",* que consiste en la utilización de patrones de calibración preparados en la propia matriz de estudio y que compensarían los posibles efectos de supresión o de aumento señal por interferencias de la matriz. Otra técnica de cuantificación también empleada con el mismo fin es la "adición standard". Está basada en la determinación de la concentración de un analito (micotoxina) agregando cantidades definidas (concentraciones conocidas exactamente) de una solución estándar de los analitos que se intentan determinar.

Otra estrategia para minimizar el efecto matriz es el uso de patrones calibrantes marcados con isotopos (^{13}C), como por ejemplo -DON, $^{13}C_{18}$-ZEA, $^{13}C_{24}$ -T2, $^{13}C_{34}$-FB_1. Se trata de compuestos químicamente similares a las micotoxinas, cuyo con comportamiento cromatográfico y en espectrometría de masas es parecido, pero que no se encuentran naturalmente en las muestras [73]. Sin embargo, tales compuestos marcados, además del elevado coste analítico que suponen, sólo existen para un número limitado de micotoxinas, lo que supone un problema en el análisis simultáneo de varias micotoxinas [72].

5. TÉCNICA DE INMUNOENSAYO ELISA

5.1. Conceptos generales

La técnica ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), es una técnica de inmunoensayo utilizada para la detección distintas moléculas biológicas, basándose en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Se trata de un ensayo inmunoenzimático en el cual un antígeno o un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte, reaccionan con uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) enlazados a una enzima generando un producto detectable por un

cambio de color, observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de colorímetro o espectrofotómetro.

Aunque existen numerosas variantes de este tipo de ensayo, se puede distinguir entre dos tipos de ELISA: ELISA competitivo directo (para detectar antígenos) y ELISA competitivo indirecto (para detectar anticuerpos). El ELISA se basa en la detección de un antígeno con un anticuerpo específico conjugado como sistema de marcaje, mientras que con el método indirecto, el complejo antígeno-anticuerpo debe ser detectado por un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente. Esto permitiría que un mismo anticuerpo marcado sea capaz de reconocer distintos antígenos. Por lo general, es el ELISA indirecto el que ofrece una mayor sensibilidad de detección [74].

5.2. Aplicación en el análisis de micotoxinas

En la última década, los métodos inmunoquímicos, tales como el ELISA, han ganado terreno en el análisis de micotoxinas [1] en alimentos y piensos. Al tratarse de métodos de rápida detección, están siendo incluidos en los sistemas rutinarios de monitoreo de la calidad de productos agrícolas [39].

Los métodos ELISA ofrecen una gran cantidad de ventajas como su simplicidad y rapidez de uso, posibilidad de automatización, no siempre requieren instrumentación (análisis cualitativo) y de ser así (análisis semi-cuantitativo), no son equipos costosos. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes, entre los que cabe citar: la posible unión no específica de los componentes, escasa reproducibilidad y posible reacción cruzada con otros compuestos similares [74].

Por otro lado, para el caso de micotoxinas pertenecientes a un mismo grupo o familia, como las aflatoxinas, las fumonisinas o los tricotecenos, las estructuras químicas tan similares pueden dar lugar a reacciones cruzadas, lo que se traduce en una sobrestimación de los niveles de micotoxinas [1].

La fiabilidad de este método depende en ocasiones de la matriz. Así por ejemplo, para matrices complejas como el heno, silo o piensos, los métodos cromatográficos son los más elegidos [1].

En el mercado podemos encontrar una gran cantidad de test ELISA para el análisis de micotoxinas individuales (DON, citrina, aflatoxinas B_1y M_1, OTA, ZEA, T-2), así como de grupos de micotoxinas por familias (fumonisinas, aflatoxinas, tricotecenos), en distintas matrices [74].

Existen métodos ELISA para micotoxinas tanto competitivo directos, como competitivo indirectos. Un esquema de ambos aparece representado en la siguiente figura:

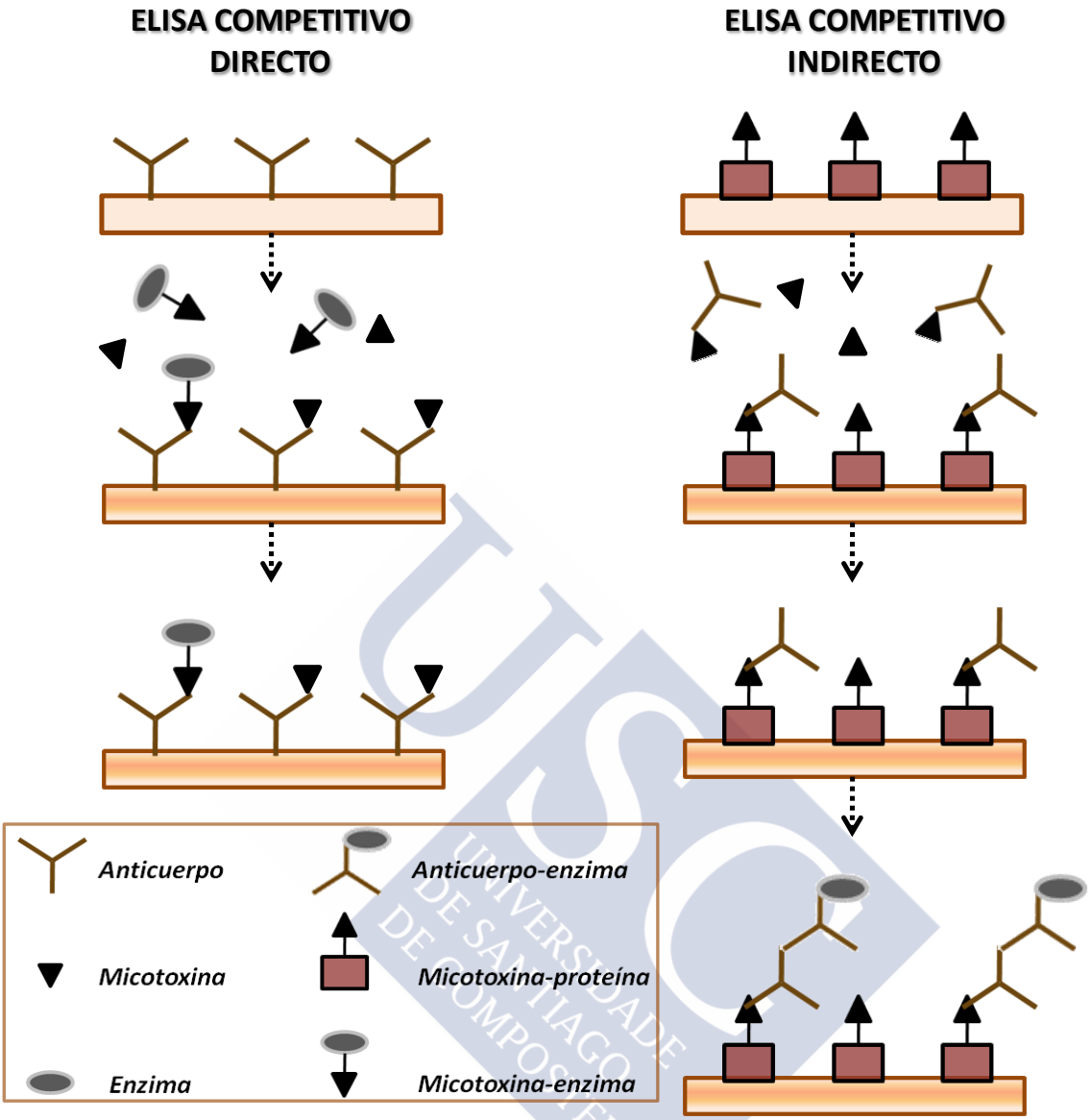


Figura I.C.11. Esquema del ELISA competitivo directo e indirecto

En el caso del ELISA competitivo indirecto, la micotoxinas o su análogo conjugado a una proteína, están inmovilizados en el soporte sobre el que se añade el extracto de la muestra y una muestra de anticuerpos específicos de las micotoxinas (anticuerpos primarios). Existe una competencia entre las micotoxinas presentes en la muestra y las inmovilizadas sobre el soporte por la unión con los anticuerpos de la disolución. Tras una etapa de lavado, una mezcla de anticuerpos marcados enzimáticamente (anticuerpos secundarios) es añadida y estos se unen a los anticuerpos primarios. A continuación, se añade un sustrato cromogénico que reacciona con la enzima unida al anticuerpo secundario generando un cambio de color. Tanto en el ELISA competitivo directo como en el indirecto, la actividad enzimática es inversamente proporcional a la concentración de las micotoxinas en la muestra [74].Es decir, habrá ausencia de color en una muestra positiva, ya que el sustrato cromogénico no puede

reaccionar con la enzimas, pues estas ya lo han hecho con las micotoxinas presente en la muestra (competitivo directo) o con los anticuerpos específicos (competitivo indirecto).

De entre los distintos sistemas de detección de los complejos antígeno-anticuerpos, tales como colorimétricos, fluorescentes, luminiscentes, son los lectores colorimétricos los más comúnmente utilizados. La colorimetría es aquella técnica instrumental basada en la determinación de la absorción de luz visible para una muestra. En los ensayos enzimáticos, la etapa final de adición de un sustrato cromogénico da lugar a un producto de reacción coloreado, capaz de absorber luz en el espectro visible, siendo su densidad óptica (DO) proporcional a la cantidad de compuesto medido [75].

Para conocer la concentración de micotoxinas en una determinada muestra, se construye una curva con patrones cuyas concentraciones son conocidas. En ella, aparecen representados la respuesta (DO) de cada uno de los patrones frente a su concentración. Las muestras se cuantificarán entonces mediante interpolación a partir de la curva de patrones construida dentro de un determinado rango de concentraciones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. BIBLIOGRAFÍA

[1] Krska,R.; Welzig,E.; Boudra,H; Analysis of *Fusarium* toxins in feed**;** *Anim. Feed .Sci. Tech*.; 137, **2007**, 241-264.

[2] Pereira, V.L.; Fernandes, J.O.; Cunha, S.C.; Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: a review on occurrence and recent methods of analysis; *Trends Food .Sci. Tech*.; 36, **2014**, 96-136.

[3] Krska,R.; Schubert-Ullrich, P.; Molinelli, A.; Sulyok,M.; Macdonald,S.; Crews,C.; Mycotoxins analysis: an update**;** *Food Addit. Contam*.; 25, **2008**, 152-163.

[4] Berthiller, F.; Burdaspal,P.A.; Crews,C.; Iha,M.H.; Krska,R.; Lattanzio,V.M.T.; MacDonald, S.; Malone, R.J.; Maragos,C.; Solfrizzo, M.; Stroka,J.; Whitaker, T.B.; Developments in mycotoxin analysis:an update for 2012-2013; *World Mycotoxin J*.; 7, **2014**, 3-33.

[5] Ates,E.; Godula, M.; Stroka, J.; Senyuva, H.; Screening of plant and fungal metabolites in wheat, maize and animal feed using automated on-line clean-up coupled to high resolution mass spectrometry; *Food Chem.;*142, **2014**, 276-284.

[6] Maestroni,B.; Cannavan, A.; Sampling strategies to control mycotoxins. En: "Determing mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed"; De Saeger, S.; Ed. Woodhead Publishing; **2011**, 3-36.

[7] Whitlow, L.W.; Hagler, W.M.Jr.; Diaz, D.E.; Mycotoxins in feed; *Feedstuffs*; 15, **2010**, 74–84.

[8] Whitaker, T.B.; Sampling foods for mycotoxins; *Food Addit. Contam*.; 23, **2006**, 50–61.

[9] Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; WHO (Genova); Series No. 906, **2002**.

[10] Johansson, A.S.; Whitaker, T.B.; Giesbrecht, F.G.; Hagler, Jr.W.M.; Young, J, H.; Testing shelled corn for aflatoxin, Part III: evaluating the performance of aflatoxin sampling plans ; *J. AOAC Int.*; 83, **2000**, 1279–1284.

[11] Whitaker, T.B.; Slate, A.B.; Johansson, A.S.; Sampling feeds for mycotoxins analysis. En: "The Mycotoxin Blue Book"; Diaz, D.E.; Ed. Nottingham University Press, **2005**, 9–31.

[12] Norma general del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. CODEX STAN. 193, **1995**, 1-48.

[13] Proposed draft revised sampling plan for total aflatoxin in peanuts intended for further processing. CODEX Alimentarius Commission 24th Session. FAO/WHO (Roma); **2001**, 276-280.

[14] Razzazi-Fazeli ,E.; Reiter, E.V; "Sample prepration and clean up in mycotoxi analysis: principles, applications and recent developments"; De Saeger, S.; Ed. Woodhead Publishing; **2011**, 37-70.

[15] AOAC International; Natural toxins; Official methods of analysis of AOAC International (Gaithersburg); 18, **2006**, 1-89.

[16] The European Commmittee for standardization. EN 14132:2009; Animal feeding stuffs. Determination of zearalenone in animal feed. High performance liquid chromatographic method with fluorescence detection and inmunoaffinity column clean up; **2009**.

[17] The European Commmittee for standardization. EN 15792:2009; Foodstuffs. Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee. HPLC method with immunoaffinity column clean up; **2009**.

[18] Kokkonen, M.; The challenge of LC/MS/MS multimycotoxin analysis-Hetacles battling the hydra; Tesis doctoral; Department of Food and Environmental Sciences; University of Helsinki; **2011**.

[19] Scudamore, K.A; Slate, A.B.; Principles and applications of mycotoxin analysis. En: "The Mycotoxin Blue Book"; Diaz, D.E.; Ed. Nottingham University Press, **2005**, 157–185.

[20] Lattanzio,V.M.T.; Solfrizzo,M.; Powers,S.; Visconti,A.; Simultaneous determination of afl atoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup; *Rapid Commun. Mass Spectrom*; 21, **2007**, 13253-13261.

[21] Sulyok ,M; Berthiller, F; Krska, R; Schuhmacher, R; 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, **2006**, 2649-2659.

[22] Juan, C; Ritieni, A; Mañes, J; Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal products from organic farming; *Food Chem.*; 141, **2013**, 1747-1755.

[23] Garon, D.; Richard, E.; Sage, L., Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P.; Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study; *J. Agric. Food Chem.*; 54, **2006**, 3479-3484.

[24] Rahmani, A.; Jinap, S.; Soleimany, F.; Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, **2009**, 202-251.

[25] Rasmussen, R. R.; Storm, I. M. L. D.; Rasmussen, P. H.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K.F.; Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 397, **2010**, 765-776.

[26] Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Lacina, O.; Veprikova, Z.; Slavikova, P.; Hajslova, J.; A rugged high-through put analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices; *Talanta*; 121, **2014**, 263-272.

[27] Kokkonen, M.; Jestoi, M.; A multi-compound LC-MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains; *Food Anal.Method*; 2, **2009**, 128-140.

[28] Cirlini, M.; Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins. *J. Chromatogr. A*; 1255, **2012**, 145-152.

[29] Kim, E.K.; Scott, P.M.; Lau, B.P.; Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Addit. Contam*.; 20, 2003, 161-169.

[30] Park, J.W.; Scott, P.M.; Lau, B.P.; Lewis, D.A.; Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins; *Food Addit. Contam*.; 21, **200**4, 1168-1178.

[31] Motta, E.L.; Scott, P.M.; Effect of in vitro digestion on fumonisin B1 in corn flakes; *Mycotoxin. Res*.; 23, **2007**, 166-172.

[32] Motta, E.L.; Scott, P.M.; Bioaccessibility of total bound fumonisin from corn flakes; *Mycotoxin. Res*.; 25, **2009**, 229-232.

[33] Mangia, M.; Free and hidden fumonisins in maize and gluten-free products; Tesis doctoral; Facultad de Agricultura; Universidad de Parma; **2009**.

[34] Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Mangia, M.; Sforza, S.; Dossena, A.; Marchelli, R. ; Free and bound fumonisins in gluten-free food products. *Mol. Nutr. Food Res*.; 53, **2009**, 492-499.

[35] Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Aureli, G.; Dossena, A.; Marchelli, R.A.; LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products; *World Mycotoxin J.*; 1, **2008**, 237-246.

[36] Turner, N.W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S.A.; Analytical methods for determination of mycotoxins: A review; *Anal. Chim. Acta;* 632, **2009**, 168-180.

[37] De Boevre, M.; Diana Di Mavungu, J.; Maene, P.; Audenaert, K.; Deforce, D.; Haesaert, G.; Eeckhout, M.; Callebaut, A.; Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food; *Food Addit. Contam.;* 29, **2012**, 819-835.

[38] Guide to Solid Phase Extraction, Supelco; En: http:// www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/OBJECTS/4600/4538.pdf (Consulta: 20-12-14).

[39] De Boevre, M.; Chemical risk related to food and feed containing masked *Fusarium* mycotoxins ; Tesis doctoral; Faculty of Pharmaceutical Sciences; University f Ghent; **2013**.

[40] Sample Cleanup Columns for Myctoxins; En: http://www.romerlabs.com/es/products/mycotoxins/immunoaffinity-columns/ (Consulta: 20-12-14).

[41] Senyuva, H. Z.; Gilbert, J.; Immunoaffinity column clean-up echniques in food analysis: a review; *J. Chromatogr. B*; 878, **2010**, 115-132.

[42] Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.; Fast an easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and " Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce; J*. AOAC Int.*; 86, **2003**, 412-431.

[43] Schenck, F.; Hobbs, J.; Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis; *Bullet. Environ. Contam. Toxicol.*; 73, **2004**, 24-30.

[44] Arroyo-Manzanares, N.; Huertas-Pérez, J.F.; Gámiz-Gracia.; L.; García-Campaña, A.M.; Control de micotoxinas en alimentos; *Boletín GraseQA*; 7, **2014**, 16-31.

[45] Rasmussen, R. R.; Storm, I. M. L. D.; Rasmussen, P. H.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K. F; Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS; *Anal. Bioanal. Chem*.; 397, **2010**, 765-776.

[46] Desmarchelier,A.; Oberson, J.M.; Tella, P.; Gremaud, E.; Seefelder, W.; Mother, P.; Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry; *J. Agr. Food Chem*.; 58, **2010**,7510-7519.

[47] Zachariasova, M.; Lacina, O.; Malachova, A.; Kostelanska, M.; Poustka ,J.; Godula, M.; Hajslova, J.; 2010. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry; *Anal. Chim. Acta*; 662, **2010**, 51-61.

[48] Rubert, J.; Fapohunda, S.O.; Soluer, C.; Ezekiel, C.N.; Mañes, J.; Kayode, F.; A survey of mycotoxins in random street-vended snacks from Lagos, Nigeria, using QuEChERS-HPLC-MS/MS; *Food Control*; 32, **2013**, 673-677.

[49] Arroyo-Manzanares, N.; Huertas-Pérez, J.F.; Gámiz-Gracia.; L.; García-Campaña, A.M.; A new approach in simple treatment combined withUHPLC-MS/MSfor the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds ; *Talanta*; 115, **2013**, 61-67.

[50] Yogendrarajah, P.; Van Poucke, C.; De Meulenaer, B.; De Saeger, S.; Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices; J*. Chromatogr. A*; 1297,**2013**, 1-11.

[51] Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Lacina, Veprikova, Z.; Slavikova, P.; Hajslova, J.; A rugged high-through put analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices; *Talanta*; 121, 2014, 263-272.

[52] Zachariasova, M.; Dzuman, Z.; Veprikova, Z.; Hajkova, K.; Jiru, M.; Vaclavikova, M.; Zachariasova, A.; Pospichalova, M.; Florian, M.; Hajslova, J.; Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animal; *Anim. Feed Sci. Tech*.; 193, **2014**, 124-140.

[53] Sukyok, M.; Berthiller, F.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; 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, **2006**, 2649-2659.

[54] Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Romero-González, R.; Aguilera-Luiz, M. M.; Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*; Food Chem*.; 2009, 117, **2009**, 705-712.

[55] Herebian, D.; Zühlke, S.; Lamshöft, M.; Spiteller, M.; Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap; *J. Sep. Sci.*; 32, **2009**, 939-948.

[56] Capriotti, A.L.; Foglia, P.; Gubbiotti, R.; Roccia, C.; Samperi, R.; Laganà, A;. 2010. Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to commission regulation (EC) No. 1881/2006 in cereals; J*. Chromatogr. A*; 1217, **2010**, 6044-6051.

[57] Spanjer, M.C.; Rensen, P.M.; Scholten, J.M.; LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornfl akes, raisins and figs; *Food Addit. Contam*. *Part A*; 25, **2008**, 472-489.

[58] Abia, W.A.; Wath, B.; Sulyok, M.; Krska, R.; Tchana, A.N.; Njobeh, P.B.; Dutton, M.F.; Moundipa, P.F.; Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameron by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); *Food Control*; 31, **2013**, 438-453.

[59] Kayode, O.F.; Sulyok, M.; Fapohunda, S.O.; Ezekiel, C.N.; Krska, R.; Oguntona, C.R.B.; Mycotoxins and fungal metabolites in groundnut- and maize-based snacks from Nigeria; *Food Addit. Contam. Part B*; 6, **2013**, 294-300.

[60] Soleimany, F.; Jinap, S.; Abas, F; Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry; *Food Chem*.; 130, **2012**, 1055-1060.

[61] Martos,P.A.; Thompson,W.; Diaz,G.J.; Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *World Mycotoxin J.*; 3, **2010**, 205-223.

[62] Warth, B.; Parich, A.; Atehnkeng, J.; Bandyopadhyay, R.; Schuhmacher, R.; Sulyok, M.; Krska, R.; Quantitation of Mycotoxins in Food and Feed from Burkina Faso and Mozambique Using a Modern LC-MS/MS Multitoxin Method; *J. Agric. Food Chem.*; 60, **2012**, 9352-9363.

[63] Shephard, G.S.; Chromatographic separation techniques for determination of mycotoxins in food and feed. En: "Determing mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed"; De Saeger, S.; Ed. Woodhead Publishing; **2011**, 71-89.

[64] Berthiller, F.; Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; Chromatographic methods for the simlutaneous determination of mycotoxins.; *Int. J. Food Microbiol.*; 119, **2007**, 33-37.

[65] Yogendrarajah, P.; Van Poucke, C.; De Meulenaer, B.; De Saeger, S.; Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices; *J. Chromatogr. A.*; **2013**, 1297, 1-11.

[66] Shodex; Lesson 6: Detectors for HPLC; En: http://www.shodex.net/index.php?lang=3&applic=1485 (Consulta: 22-12-14).

[67] Consejo Superior de Investigaciones Ciéntificas (CSIC); Cromatografía líquida de alta eficacia ; En: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf (Consulta: 22-12-14).

[68] Lattanzio, V.M.T.; Pascale, M.; Visconti,A.; Current analytical method for trichothecene mycotoxins in cereals; *Trac-trend Anal. Chem.*; 28, **2009**, 758-768.

[69] Langseth, W.; Rundberget, T.; Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes incereals, foodstuffs and cultures; *J. Chromatogr. A*; 815, **1998**, 103–121.

[70] Feen, J.; Mann, M.; Meng, C.; Wong, S.; Whitehouse, C.; Electrospray ionization-principles and practice Mass Spectrom. Reviews; 9, **1990**, 37-70.

[71] Spanjer, M.C.; Mass spectrometry in multi-mycotoxin and fungal spore analysis. En: "Determing mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed"; De Saeger, S.; Ed. Woodhead Publishing; **2011**, 90-134.

[72] Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects; *Food Addit. Contam. Part B*; 6, **2007**, 1184-1195.

[73] Boyd, R.K.; Basic, C.; Bethem, R.A.; Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry; John Wiley & Sons Ltd., Chichester; **2008**.

[74] Goryacheva,I.Y.; De Saeger, S.; Immunochemical methods for rapid mycotoxin determination in food and feed. En: "Determing mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed"; De Saeger, S.; Ed. Woodhead Publishing; **2011**, 135-167.

[75] Fundamentos y Tipos de ELISAs**;** En: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf (Consulta: 20-12-14).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos pertenecientes a géneros como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillum*, *Alternaria* y *Claviceps*, algunos de las cuales pueden infectar el maíz forrajero y producir micotoxinas durante el su cultivo y proceso de ensilado [1]. Estas sustancias pueden ocasionar efectos perjudiciales agudos y crónicos sobre la salud animal y humana, y reducir la productividad en las explotaciones [2].

Los ensilados de maíz y de hierba son el principal forraje en la alimentación de las vacas de leche en España y, especialmente en Galicia, donde son empleados por más de 50% de las explotaciones, superando el 75% en explotaciones de mayor tamaño. En éstas, el ensilado puede constituir más de un 60% de materia seca de la ración de las vacas en lactación. El maíz forrajero es más susceptible que la hierba a la contaminación con *Aspergillus* y *Furarium* en el campo [3] y con hongos en general en el silo [4]. Por ello, los ensilados de maíz son el componente de la ración que aporta la mayor cantidad de micotoxinas a la dieta de las vacas de leche [5].

Los hongos aislados con mayor frecuencia en maíz grano en Galicia y en el resto de España son los pertenecientes al géneros *Fusarium*, particularmente *F. verticilloides* y *F. proliferatum* [6-10], principales productores de fumonisinas. En Galicia, también se han aislado *F. graminearum* y *F. culmorum* [6], productores principales de deoxinivalenol y zearalenona; y *F. poae*, productor principal de toxina T-2 y toxina HT-2.

Determinadas prácticas agronómicas como la rotación de cultivos, el laboreo, la elección de la fecha de siembra y cosecha, la fertilización, la elección de variedades resistentes, control de plagas y malas hierbas, pueden reducir la infección por hongos y la consecuente producción de micotoxinas, pero no erradicarlas [3]. Los datos de incidencia de micotoxinas en ensilados de maíz en otros países, indican que la ruta de exposición debe ser considerada [5, 11-13]. Es muy frecuente la contaminación simultánea con varias micotoxinas, destacando deoxinivalenol y zearalenona, como las más habituales, además de la variación del tipo de micotoxinas y del grado de contaminación entre regiones, explotaciones de la misma región y muestras del mismo silo. Algunos de los factores determinantes en el contenido de los hongos en los silos comerciales son el lugar que ocupa la muestra en el silo, la duración de proceso de elaboración del silo y el mes que se realiza el muestreo [4].

Con la intención de mantener los niveles de micotoxinas por debajo de los niveles de riesgo para la salud animal, se han establecido en el ámbito de la Unión Europea (UE) una serie de normas que regulan el contenido máximo de micotoxinas en productos destinados a la alimentación animal. Así, la Comisión Europea, fija los límites máximos para la aflatoxina B_1 en alimentos para animales en su directiva 2003/100/CE [14] y aconseja además intensificar el seguimiento de la presencia de micotoxinas producidas por *Fusarium* en cereales y en productos a base de cereales en su Recomendación 2006/576/CE [15], estableciendo niveles máximos para deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A y fumonisinas (suma de FB_1 y de FB_2) en productos destinados para animales. Más recientemente, de acuerdo con la Recomendación 2013/165/UE [16] se establecieron los límites máximos

orientativos para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales y productos a base de cereales para alimentos y para piensos. La UE también sugiere incrementar los estudios de monitoreo de la presencia de estas micotoxinas en productos destinados a la alimentación animal y pide a sus estados miembros garantizar su análisis y facilitar regularmente sus resultados analíticos a la Comisión. Además, aparición simultánea de varias micotoxinas en un mismo alimento, unido a la variada composición de la dieta de las vacas de leche, hace que éstas estén expuestas a una mezcla variable de micotoxinas con efectos sinérgicos [17] en algunos casos, pudiendo observarse síntomas clínicos inespecíficos capaces de desencadenar patologías comunes en vacas de alta producción. Por todo ello, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda el desarrollo de métodos para el análisis simultáneo de múltiples micotoxinas.

La cromatografía en fase líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), debido a los niveles bajos de detección y cuantificación que permite alcanzar y a su alta repetibilidad y reproducibilidad, se presenta como una técnica eficaz que permitiría la optimización y validación de un método analítico multi-micotoxinas fiable y robusto [18].

Teniendo todo esto en consideración, el trabajo que se presenta se ha centrado en los siguientes objetivos:

1. Evaluar la estabilidad de micotoxinas del género *Fusarium* durante el proceso de ensilado, en silos de laboratorio y en silos convencionales. *(Capítulo IV. Sección IV.A y IV.B)*

Dos ensayos se han propuesto, ambos con maíz contaminado con cepas micotoxigénicas de *F.verticilloides* y *F. graminearum*. En condiciones de laboratorio, se planteó estudiar el efecto del uso de inoculantes y la evolución del contenido de fumonisinas (*F.verticilloides)* y deoxinivalenol y zearalenona (*F. graminearum*) a lo largo del proceso de ensilado. Mientras, en los silos convencionales se evaluó la posición de la muestra en el silo. Además, también se planteó evaluar las concentraciones de fumonisinas en muestras bajo deterioro aeróbico (exposición al aire). La intención de este último estudio era conocer el contenido de esas micotoxinas en lo que sería una representación de una situación real de un silo: una vez que un silo es abierto para alimentar al ganado, se encuentra inevitablemente expuesto al aire.

Para cumplir con este objetivo, se han desarrollado metodologías de análisis (extracción, purificación y detección) para determinar la presencia de fumonisinas, deoxinivalenol y zearalenona en muestras de maíz y de silos de maíz. Así mismo, la posible presencia de micotoxinas modificadas también ha sido investigada. Para la detección y cuantificación de los compuestos se ha empleado la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), y con detector UV/VIS por array de diodos y de fluorescencia (HPLC-PDA-FLD).

2. Optimización y validación de un método multi-micotoxinas utilizando la técnica LC-MS/MS para la determinación simultánea de varias micotoxinas en muestras de ensilados de maíz. *(Capítulo IV. Sección IV.C)*

Con este objetivo se pretendía responder a las necesidades expresadas por la Comisión Europea en su recomendación 2006/576/CE [15] sobre la presencia simultánea de diversas micotoxinas en productos destinados a alimentación animal. Las micotoxinas incluidas en el

método desarrollado son las listadas a continuación: deoxinivalenol, 3 y 15 acetildeoxinivalenol, toxinas T-2 y HT-2, zearalenona, ocratoxina A, fumonisinas B_1 y B_2, verruculogén, ácido micofenólico, ácido penicílico, roquefortina C aflatoxinas B_1 y G_1, eniantina B, eniantina B1, esterigmatocistina, marcfortina A, penitrem, andrastina A, alternariol, α-zearalenol y β-zearalenol.

La técnica empleada para tal fin fue la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), que dada su gran sensibilidad analítica, resultó ser eficaz para el desarrollo de un método analítico multi-micotoxinas fiable y robusto y que permitía cumplir con creces los límites legales/recomendados europeos acerca de los contenidos de algunas micotoxinas en productos de alimentación animal. Además, como parte del proceso de desarrollo del método analítico, varios métodos de extracción y purificación también han sido estudiados. Todo ello resultó una tarea complicada dada la complejidad de la matriz de estudio (silo) y la amplia variedad de propiedades físicas y químicas de las micotoxinas.

3. Evaluar la presencia y el nivel de contaminación con micotoxinas en silos de maíz de explotaciones ganaderas de Galicia. *(Capítulo IV. Sección IV.D)*

La contaminación de los ensilados con micotoxinas puede tener una repercusión económica negativa a través de su efecto sobre la salud animal y la productividad. Existe poca información acerca del efecto de las técnicas de ensilado sobre su contenido en micotoxinas, lo que dificulta el definir puntos críticos de control y buenas prácticas aplicados al ensilado de maíz y mucho más difícil, que estos sean apropiados a las condiciones de las explotaciones españolas. Con este objetivo se pretendía aportar el conocimiento científico necesario para realizar un análisis y evaluación de riesgos que permitiesen proponer puntos de control durante el proceso de ensilado y definir un código buenas prácticas.

Mediante la aplicación de método multi-micotoxinas, desarrollado y validado, fue posible avanzar en el conocimiento del estado de contaminación de los ensilados con micotoxinas en explotaciones gallegas, de gran importancia en lo relativo a la seguridad alimentaria aplicada a alimentos para la ganadería. Además, desde el punto de vista práctico, el uso de métodos multi-micotoxinas supone un importante ahorro en trabajo, tiempo y dinero para los laboratorios de análisis y autoridades sanitarias, proporcionando información sobre una amplia variedad de micotoxinas en alimentos para animales. Toda esta información podría ser utilizada en la elaboración de futuras normas y procedimientos prácticos que asegurasen la calidad de los productos.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Scudamore, K.A.; Livesey, C.T.; Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review; *J. Sci. Food Agric.*; 77, **1998**, 1–17.

[2] Whitlow, L.W.; Hagler, W.M.Jr.; Diaz, D.E.; Mycotoxins in feed; *Feedstuffs*; 15, **2010**, 74–84.

[3] Jouany, J.P.; Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds; *Anim. Feed Sci. Tech*.; 137, **2007**, 342-362.

[4] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Castro, P.; Pereira, S.; Calidad higiénica de piensos, leche y ensilados de hierba y maíz en explotaciones lecheras de Galicia; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba; **2008**, 329-335.

[5] Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; Te Giffel, M.C.; Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands; *Food Addit. Contam. Part B*; 1, **2008**, 41-50.

[6] Muñoz, L.; Cardelle, M.; Pereiro, M.; Riguera, R.; Occurrence of corn mycotoxina in Galicia (nothwest Spain); *J. Agric. Food Chem.*; 38, **1990**, 1004-1006.

[7] Sala, N.; Sanchís, V.; Vilaro, P.; Viladrich, R.; Torres, M.; Viñas, I.; Canela, R.; Fumonisin producing capcity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain; *J. Food Protect.*; 57, **1994**, 915-917.

[8] Castellá , G.; Bragulat, M.R.; Cabeñes, F.J.; Surveillance of fumonisins in maize based feeds and cereals from Spain; *J. Agric. Food Chem.*; 47, **1999**, 4707-4710.

[9] Bakan , B.; Melcion, D.; Richard-Molard, D.; Cahagnier, B.; Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional and genetically modified maize grown in France and Spain; *J. Agric. Food Chem.*; 50, **2002**, 728-731.

[10] Butrón , A.; Santiago, R.; Mansilla, P.; Pintos-Varela, C.; Ordás, A.; Malvar, R.A.; Maize (Zea mays L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination; *J. Agric. Food Chem.*; 54, **20062**, 6113-6117.

[11] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol as undesirable substance in animal feed; *The EFSA Journal;* 73, **2004**, 1-41.

[12] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed; *The EFSA Journal;* 89, **2004**, 1-35.

[13] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substance in animal feed; *The EFSA Journal;* 235, **2005**, 1-32.

[14] Directiva 2003/100/CE de la Comisión de 31 de octubre de 2003 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal; DO L 285, **2003**, 33-37.

[15] Recomendación de la Comisión del 17 de agosto de 2006 (2006/576/CE), sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal; DO L 229, **2006**, 7-9.

[16] Recomendación de la Comisión del 27 de marzo de 2013 (2013/165/UE), sobre la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en los cereales y productos a base de cereales animal; DO L 91, **2013**, 12-15.

[17] Streit, E.; Schwab, C.; Sulyok, M.; Naehrer, K.; Krska, R.; Schatzmayr, G..; Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingridients; *Toxins;* 5 , **2013**, 504-523.

[18] Krska, R.; Schubert-Ullrich, P.; Molinelli,A.; Sulyok, M.; Macdonald,S; Crews,C.; Mycotoxin analysis: An undate; *Food Addit. Contam. Part A*; 25, **2008**, 152-163.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. MUESTRAS DE MAIZ Y ENSILADOS DE MAÍZ

En este apartado se describe cómo fue llevada a cabo la contaminación del maíz, el tratamiento con inoculante, la elaboración de los silos de laboratorio (microsilos) y la distribución de las bolsas con silo contaminado en los silos trinchera (silos convencionales), correspondientes a las muestras que serán comentadas en el siguiente capítulo IV (secciones IV.A y IV.B). Además, se especificará la realización de la toma de muestras, procesado y conservación de las muestras, así como la determinación de la humedad residual de las muestras analizadas en esta Memoria.

1.1. Contaminación de maíz con hongos del *Fusarium*

Para la obtención del maíz contaminado, se cultivaron plantas de maíz en la finca experimental del *Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo* (CIAM, Abegondo, A Coruña) de mayo a septiembre. Esto fue realizado dos años consecutivos: en el año 2010, en el cual se sembró maíz de variedad RULEXX (Ragt), y año 2011, donde la variedad seleccionada fue la BRANDY (Núter Feed).

Durante el del primer año (2010), se contaminó el maíz con una cepa micotoxigénica de *Fusarium verticilloides* para provocar la contaminación con fumonisinas (Sección IV.A), y en el segundo año (2011), con una cepa de *Fusarium graminearum,* para la contaminación con deoxinivalenol y zearalenona (Sección IV.B).

A partir de las cepas micotoxigénicas de ambos hongos (aislados de maíz grano en Galicia y conservados por la Misión Biológica de Galicia) multiplicados en medio PDA en placa petri a 25°C, se obtuvieron las conideas a una concentración superior a 10^6 conideas mL^{-1}, en un medio específico con aireación e iluminación forzada durante 5-7 días. Una vez realizado el recuento de esporas en cámara neubauer, la solución final fue ajustada a 10^6 esporas mL^{-1}. Estas soluciones se utilizaron para la inoculación de las plantas de maíz mediante la inyección en mazorca de 2 mL de solución de esporas.

Figura III.1. Solución inoculante e inoculación de las plantas de maíz.

Dos semanas después de la floración femenina, 1500 plantas de maíz fueron inoculadas con *F. verticilloides* (año 2010) y 3000 plantas con *F. graminearum* (año 2011).

1.2. Elaboración de los silos de laboratorio

En ambos estudios (año 2010 y 2011), 160 kg del maíz previamente contaminado fue cosechado, proceso realizado en dos fechas:

1ª cosecha: 1 de octubre para el ensayo con *F. verticilloides* y el 6 de octubre para el ensayo con *F. graminearum,* correspondiendo a la semana 11 después de la floración femenina.

2ª cosecha: 29 de octubre para el ensayo con *F. verticilloides* y el 8 de noviembre para el ensayo con *F. graminearum,* que corresponden a la semana 13 y 15 después de la floración femenina, respectivamente.

Para ambas fechas, se ha seguido el mismo procedimiento. Las plantas de maíz (160 kg) fueron cosechadas mediante una cosechadora-picadora de precisión de forrajes Wintersteiger Cibus S, específica para ensayo de maíz en el CIAM y picadas a 10 mm en una trituradora de forrajes Viking. La muestra fue homogenizada y dividida en dos alícuotas de 80 kg cada una. A cada una de estas alícuotas, uno de los dos tratamientos con aditivo fue aplicado: agua (control) o inoculante a base de *L. Buchneri* (Pioneer 11CFT) a una concentración de 1 x 10^6 cfu g^{-1}. Las 2 alícuotas correspondientes a cada uno de los tratamientos (control e inoculante) fueron homogenizadas y divididas en:

- 8 alícuotas de 1 kg: maíz fresco (no ensilado)
- 24 alícuotas de 2 kg: con las que se elaboraron los silos de laboratorio en bolsas de polietileno, dentro de un tubo de PVC de 2,2 L de capacidad

Figura III.2. Silos de laboratorio en tubos de PVC de 2,2 L.

1.3. Silos trinchera

Para ambos años (2010 y 2011), 120 kg del maíz contaminado, en cada caso, con *F. verticilloides* y *F. graminearum* fue cosechado y picado a 10 mm, utilizando una cosechadora-picadora de forrajes John Deere.

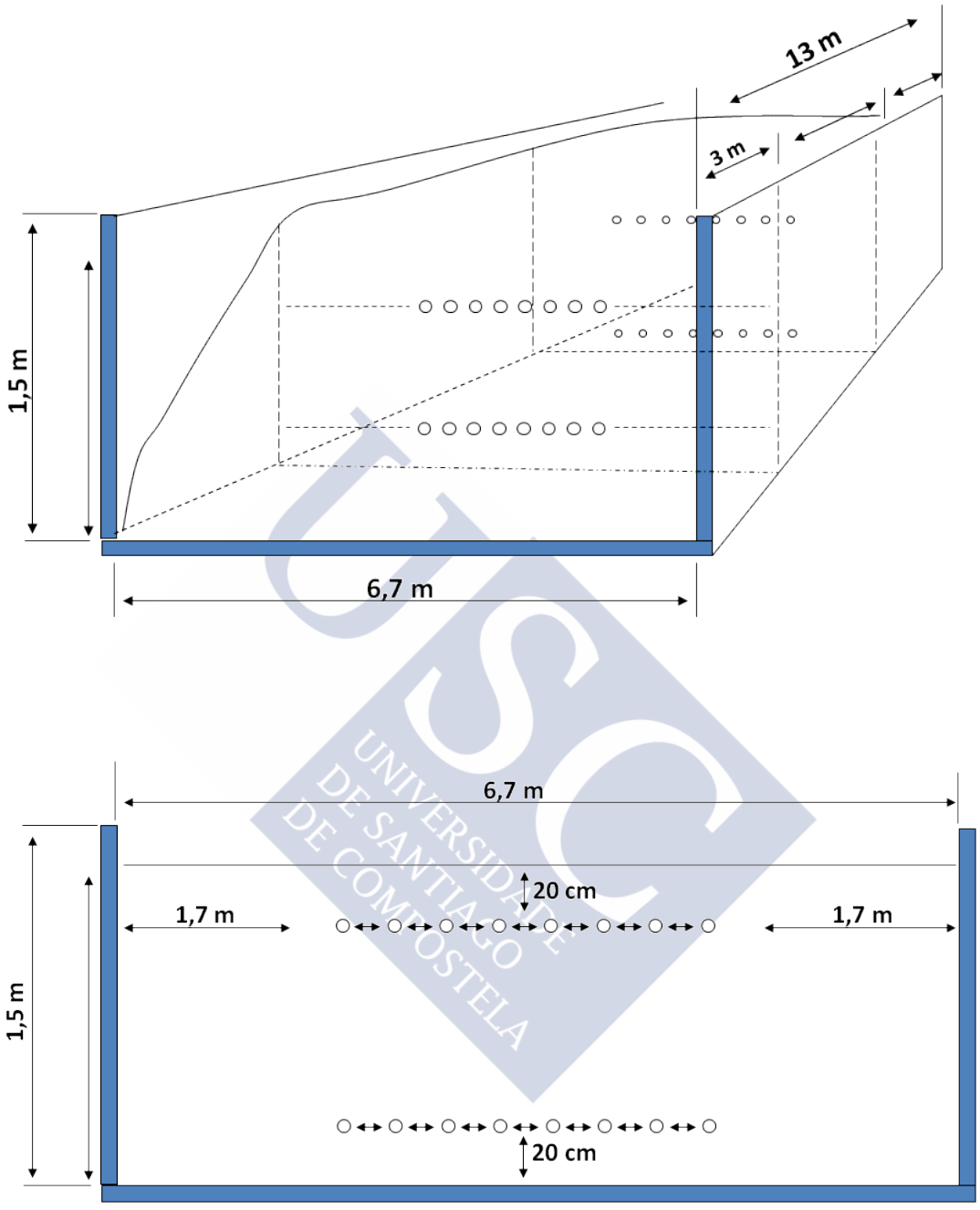


Figura III.3. Distribución de los sacos de maíz contaminado en el silo trinchera

Después de su homogenización, el maíz picado fue dividido en un total de 32 alícuotas de 4 kg de peso. De cada una de estas alícuotas se han tomado 200 g para el análisis de hongos y levaduras y 600 g (2 submuestras) para la determinación de materia seca, composición química y análisis de micotoxinas.

El resto del maíz (entre unos 3500-4000 g), fue repartido e introducido en 32 bolsas (sacos) de nylon de 200 µm de tamaño de poro. Estos sacos se asignaron de forma aleatoria

a cada uno de los tratamientos objeto de estudio y se mantuvieron refrigerados hasta el momento del ensilado.

Tanto en el año 2010 como en el 2011, los sacos de maíz contaminado con *F. verticilloides* (primer año) y *F. graminearum* (segundo año), fueron depositados en 32 puntos distribuidos uniformemente en un silo trinchera de dimensiones de 6,7 m de ancho, 1,5 m de alto y 13 m de largo.

Lo sacos fueron situados en el silo trinchera del siguiente modo:

- A lo *largo*: a 3 m del principio y a 3 m del final del silo
- A lo *ancho*: en el centro y a 1,7 m a izquierda y derecha del eje longitudinal
- A lo *alto*: a 20 cm del suelo, en el centro y a 20 cm de la superficie superior

Dicha colocación fue señalada dentro y fuera del silo.

Tras la apertura de silo, las bolsas se fueron sacando durante un periodo de aproximadamente unos 2 meses, tiempo que dura el aprovechamiento de un silo.

Figura III.4. Sacos de maíz contaminado colocados en un silo trinchera

1.4. Toma de muestras, procesado y conservación

Las muestras fueron homogenizadas y subdivididas en cuarteos sucesivos. De cada una de ellas se tomaron distintas alícuotas utilizando una balanza DENVER modelo DA6EDP-L0-US (Denver Instruments, Arvada, CO, EE.UU.) para la realización de diversas determinaciones.

Una de estas alícuotas, de entre 200-500 g, se secó en estufa de aire forzado Unitherm (Biotech S.L., Madrid, España) a 40°C, durante 48 horas y el contenido en materias seca (MS) se determinó mediante diferencia de pesada entre las muestras antes del secado (estado natural) y después el secado.

Una vez secas, las muestras fueron molidas en molino Christy & Norris Lab Mill (Christy Turner Ltd, Ipswich, Suffolk, Inglaterra) con un tamaño de tamiz de 1mm y una alícuota de

20 g. de la muestra seca fue tomada para el análisis de las micotoxinas. Esta alícuota se mantuvo refrigerada a 4°C hasta la determinación del contenido de micotoxinas.

Antes de realizar el análisis de micotoxinas, el contenido en humedad residual de las muestras de maíz y de ensilado de maíz secas y molidas fue determinado por duplicado en 0,5 g de la muestra mediante desecación durante 24 horas y a 103°C en estufa MEMMERT modelo ULE-500 (Afora, Barcelona, España) con regulación electrónica.

Otras de las determinaciones realizadas en las muestras de maíz fresco y ensilado fueron: análisis de la composición química, determinación de la estabilidad aeróbica, análisis de la calidad fermentativa, determinación de la actividad del agua y análisis de hongos y levaduras (ver Anexos).

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO

En este apartado se incluye una relación de los patrones individuales de micotoxinas, así como los reactivos, material e instrumentación utilizados para la realización de la parte experimental de esta Memoria En los apartados del próximo capítulo IV (Discusión y resultados) se especifican, en cada caso particular, el pre-tratamiento de las muestras analizadas incluyendo las mezclas de micotoxinas utilizadas, así como los distintos protocolos de extracción y/o purificación y condiciones de análisis.

2.1. Patrones

Se han utilizado una gran cantidad de patrones de micotoxinas que fueron suministrados comercialmente en forma individual (sólido o disolución) o en mezcla. Se detallan en las siguientes tablas un listado de los mismos:

Tabla III.1. Relación de los estándares de micotoxinas individuales en disolución

Compuestos	Disolventes	Concentración (µg mL^{-1})
Ácido micofenólico	acetonitrilo	101,0
Ácido penicílico	acetonitrilo	100,0
Fumonisina B_1 hidrolizada	acetonitrilo/agua (1:1 ; v/v)	25,0
Ocratoxina A	acetonitrilo	10,2
Roquefortina C	*Dried down** (acetonitrilo)	100,0
Toxina HT-2	acetonitrilo	102,7
Toxina T-2	acetonitrilo	100,5
Verruculogen	acetonitrilo	100,9
Zearalenona	acetonitrilo	100,3

***Todos sumistrados por Biopure (Tulln, Austria)**

Tabla III.2. Relación de los estándares de micotoxinas individuales en forma sólida

Compuesto	cantidad	Suministrador
15-acetildeoxinivalenol	5 mg	Biopure (Tulln, Austria)
3-acetildeoxinivalenol	5 mg	Biopure (Tulln, Austria)
Ácido ciclopiazónico	10 mg	Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemania)
Alternariol	1 mg	Cayman Chemical (MI, EE.UU.)
Ácido micofenólico	5 g	Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemania)
Andrastina A	250 µg	Santa Cruz Biotechnology (CA,EE.UU.)
Deoxinivalenol	5 mg	Biopure (Tulln, Austria)
Eniantina B	1 mg	Sigma-Aldrich (M0, EE.UU.)
Eniantina B_1	1 mg	Sigma-Aldrich (M0, EE.UU.)
Esterigmatocistin	1 mg	Sigma-Aldrich (M0, EE.UU.)
Fumonisina B_1	1 mg	Acros Organics (New Jersey, EE.UU.)
Fumonisina B_2	1 mg	Acros Organics (New Jersey, EE.UU.)
Marcfortina A	1 mg	Santa Cruz Biotechnology (CA,EE.UU.)
Nivalenol	5 mg	Biopure (Tulln, Austria)
Penitrem A	1 mg	Cayman Chemical (MI, EE.UU.)
Toxina HT-2	5 mg	Biopure (Tulln, Austria)
Toxina T-2	5 mg	Biopure (Tulln, Austria)
α-zearalenol	5 mg.	Sigma-Aldrich (M0, EE.UU.)
β-zearalenol	5 mg	Sigma-Aldrich (M0, EE.UU.)
Zearalenona	5 mg.	Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemania)

Tabla III.3. Relación de las mezclas técnicas de micotoxinas

Compuesto	Disolvente	Concentración ($\mu g\ mL^{-1}$)
Mix Aflatoxinas		
Aflatoxina B_1	acetonitrilo	2,0
Aflatoxina B_2		0,5
Aflatoxina G_1		2,0
Aflatoxina G_2		0,5
Mix Tricotecenos B		
3-acetildeoxinivalenol	acetonitrilo	100,8
15-acetildeoxinivalenol		100,7
Deoxinivalenol		100,6
Nivalenol		100,1
Mix Fumonisinas		
Fumonisina B_1	acetonitrilo/agua (1:1 ; v/v)	50,4
Fuminisina B_2		50

***Todas suministradas por Biopure (Tulln, Austria)**

2.2. Reactivos, gases y disolventes

2.2.1. Reactivos

- Ácido acético glacial, grado HPLC (J.T. Baker , Deventer, Paises Bajos)
- Ácido fórmico, calidad LC-MS (Fluka , Basel, Suiza)
- Acetato amónico ultrapuro, calidad LC-MS (Fluka, Basel, Suiza)
- Formiato amónico ultrapuro, calidad LC-MS (Fluka , Basel, Suiza)
- Hidróxido sódico, (J.T. Baker, Deventer, Paises Bajos)
- Sodio acetato 3-hidrato, para análisis (Panreac, Barcelona, España)
- Sodio laurilsulfato (SDS) para biología molecular (Scharlau, Barcelona, España)
- Sulfato de magnesio anhidro, 97% (Fluka , Basel, Suiza)

2.2.2. Gases

- Nitrógeno seco (Carburos metálicos, A Coruña, España) usado para evaporar
- Nitrógeno ultrapuro, obtenido en el propio laboratorio con un sistema de generación utilizado para las corrientes de gas del LC-MS/MS

- Argón 6.0 (Carburos metálicos, A Coruña, España), empleado para el LC-MS/MS

2.2.3. Disolventes

Todos los disolventes utilizados fueron suministrados por J.T. Baker (Deventer, Paises Bajos):

- Agua, grado HPLC
- Metanol, grado HPLC
- Acetonitrilo, grado HPLC
- Acetato de etilo, grado residuo
- Agua ultrapura (Milli-Q), obtenida en el propio laboratorio con un sistema de purificación (Millipore), utilizada para el lavado del material
- Acetona y metanol de baja calidad para la limpieza del material

2.3. Instrumental

2.3.1. Agitación y separación

- Agitador magnético con placa calefactora modelo Agimatic-E (J.P. Selecta, Barcelona, España)
- Agitador Vortex ZX3 (Velp Scientifica, Usmate, Italia)
- Agitador orbital xMaxi OL30-ME (Ovan, Badalona, España)
- Baño de agua Memmert WB/OB 22 con dispositivo de agitación (Afora, Barcelona, España)
- Baño de ultrasonidos JP Selecta 512 (JP-Selecta, Barcelona, España)
- Centrífuga Allegra X-22R (Beckman Coulter, Madrid, España)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)

2.3.2. Balanzas

- Balanza analítica, ACCULAB con cuatro cifras decimales (Sartorious, Madrid, España)
- Granatario, ACCULAB con 2 cifras decimales (Sartorious, Madrid,España)

2.3.3. Material de uso general en el laboratorio

- Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio
- Espátulas metálicas
- Embudos de polipropileno
- Agitadores magnéticos
- Frascos de polipropileno de boca ancha de 250 mL con tapón de rosca
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Botellas de vidrio de 100, 250, 500 y 1000 mL

- Frascos lavadores
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 y 50 mL
- Cronómetro
- Papel de aluminio
- Film de laboratorio (Parafilm)
- Guantes de nitrilo y latex

2.3.4. Material de dosificación de líquidos

- Pipetas serológica estéril de 10 mL
- Micropipetas automáticas fijas y variables de diferentes volúmenes
- Pipeta automática variable de 1-10 mL
- Puntas de pipeta de 10mL, 100-1000 µL, 10-300 µL, 10-200 µL, 2-20 µL

2.3.5. Material de filtración

- Papel de filtro Whatman N.4
- Filtros de jeringa de PTFE, Uptidisc, 0,45 µm, 33 mm (Interchim, Montluçon , *Francia*)
- Filtro micro spin de celulosa regenerada 0, 22µm ,2mL (Grace,Waukegan, IL, EE.UU.)
- Jeringas de polipropileno para filtrar Injeckt, 2 mL y 10 mL (B. Braun, Barcelona, España)

2.3.6. Material kits ELISA

- Kit AgraQuant® DON (0,25-5,0 ppm) (Romer Labs, Tulln, Austria)
- Kit AgraQuant® Fumonisinas totales (0,25-5,0 ppm) (Romer Labs, Tulln, Austria)

2.3.7. Material y sistema para purificación extractos

- Columnas Mycospin™ 400 Multi-toxin (Romer Labs, Tulln, Austria)
- Columnas Oasis® HLB (3 mL, 60 mg) (Waters, Milford, MA, EE.UU.)
- Sistema de vacío de 12 puertos, Visiprep y accesorios (Supelco, Madrid, España)

2.3.8. Equipos de evaporación

- Evaporador por corriente de nitrógeno "Mini-Vap" y accesorios (Chromatography Research Supplies, Louisville, KY, EE.UU
- Evaporador de vacío Syncore® Polyvap en combinación con un bomba de vacío V-700 y un controlador de vacío V-855 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza)
- Recirculador de agua FL300 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Alemania)

2.3.9. Refrigeración y secado

- Nevera a temperatura de + 4° o inferior
- Congelador a una temperatura de -20°C o inferior
- Desecador
- Estufa

2.3.10. Viales

- Viales de 1,8 mL de rosca, transparente y ámbar (Cromlab, Barcelona,España)
- Viales de fondo cónico de volumen reducido (Cromlab, Barcelona,España)
- Insertos de vidrio para volúmenes inferiores a 200 µL (Cromlab, Barcelona,España)
- -Tapones de rosca y septa PTFE/silicona para viales de 1,8 mL (Cromlab, Barcelona,España)
- Viales de vidrio (12 y 22 mL) con cápsulas de aluminio y septa de butilo (Teknokroma, Barcelona, España)
- Encapsulador 20 mm (Restek, Bellefonte, PA, EE.UU.)
- Viales de vidrio de 12 x 32 mm con tapón de rosca de 9mm y septum de silicona/PTFE preperforado (Waters, Milford, MA, EE.UU.)
- Viales de vidrio de 4 mL (15 x 45 mm) con tapón de rosca de urea con junta de PTFE (Kimble Chase, Vineland, NJ, EE.UU.)

2.4. Dispositivos e instrumentación de detección y cuantificación utilizados

2.4.1. Lector de ELISA

Para leer el resultado de las pruebas realizadas por ELISA se ha utilizado un lector ELISA ELx800 (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.)

2.4.2. HPLC-PDA-FLD

El sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizado pertenecía a la casa comercial Waters (Milford, MA, EE.UU.) y estaba provisto de un módulo de separación (modelo 2695XC), un desgasificador para eluyentes, un automuestreador con termostato, compartimento termostatizado para la columna cromatográfica (horno/refrigerador), una bomba cuaternaria y dos detectores conectados en serie: detector UV/VIS por array de diodos (PDA) (modelo 2998) y un detector de fluorescencia (FLD) de multi-longitud de onda (modelo 2475) con lámpara de xenon y doble monocromador incorporados.

Se utilizó el software Empower 2 de Waters, para la adquisición, procesamiento y gestión de la información cromatográfica.

2.4.3. LC-MS/MS

Para el análisis por cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), se ha utilizado un equipo de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (San Francisco, CA, EE.UU.) compuesto por una bomba Dionex Ultimate 300 acoplada a un automuestraedor Accela, horno, puerto de inyección y detector de masas TSQ Quantum Access de triple cuadrupolo equipado con una fuente de ionización por electrospray HESI.

Se utilizó el software Thermo Scientific™ LC QUAN, para la adquisición y procesado de los datos cuantitativos de los patrones de calibración y muestras.

2.5. Preparación de las soluciones de trabajo

2.5.1. Disoluciones stock, patrones de calibrado y mezclas de fortificación

La preparación de estas soluciones se realizó a partir de estándares comerciales individuales de micotoxinas, en forma sólida o en disolución, o partir de las mezclas comerciales de las mismas. Estas disoluciones fueron siempre preparadas por pesada y conservadas a -20ºC en ausencia de luz en períodos de tiempo variables en función de la micotoxina y de la concentración de la solución.

2.5.2. Soluciones de micotoxinas para la optimización de las transiciones MS/MS

Para determinar las transiciones SRM (primera transición: ion padre; segunda transición: iones producto) y sus energías de colisión, soluciones de micotoxinas individuales o en mezcla fueron introducidas (infusionadas) directamente en la fuente. Estas soluciones fueron preparadas a una concentración de 1 µg mL^{-1} en agua:metanol (80:20, v/v) conteniendo 3mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico. Esta era la concentración de la fase móvil en el momento de inyección del patrón en el cromatógrafo de líquidos.

2.6. Limpieza del material

Un buen protocolo de limpieza del material reutilizable de vidrio y de plástico, así como de las superficies de trabajo, es esencial para asegurar la completa descontaminación y eliminación de residuos de micotoxinas.

Protocolo de limpieza del material de vidrio y de plástico:

1) Lavar abundantemente con metanol para solubilizar los restos de micotoxinas y desechar posteriormente en el bidón de residuos para *disolventes orgánicos no halogenados.*

2) Sumergir el material en un baño de lejía al 5% durante 30 minutos y desechar los restos en el bidón de residuos para *disolventes orgánicos halogenados.*

3) Sumergir en baño de acetona al 5% durante 30 minutos y desechar los restos en el bidón de residuos para *disolventes orgánicos no halogenados.*

4) Realizar un lavado con abundante agua y jabón.

5) Por último, pasar por tres aclarados: uno con agua del grifo, otro con agua destilada y un tercero con agua Milli-Q.

Por otra parte, el material de vidrio que vaya a ser utilizado para la preparación de soluciones de micotoxinas o que vaya a estar en contacto con las mismas, deberá ser sumergido durante 2 horas en ácido diluido (por ejemplo: ácido sulfúrico 2M), pues muchas de las micotoxinas se degradan en medio básico. A continuación se lavará con abundante agua (grifo, destilada y Mili-Q) para eliminar los restos de ácido.

Protocolo de limpieza de las superficies de trabajo:

En el caso de soluciones de micotoxinas vertidas, deberán ser absorbidas con un papel que posteriormente se desechará en el bidón de residuos sólidos. A continuación, se trata superficie de trabajo con lejía al 1%. Al cabo de 10 minutos se lava con acetona al 5% y después de 30 minutos, con agua.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV.A. INCIDENCIA Y ESTABILIDAD DE FUMONISINAS EN ENSILADOS DE MAÍZ EN SILOS DE LABORATORIO Y EN SILOS CONVENCIONALES

El estudio realizado formaba parte del proyecto de investigación que llevaba por título *"Incidencia y estabilidad de aflatoxinas y micotoxinas del género Fusarium en ensilados de maíz. Diagnóstico en explotaciones ganaderas y estudio experimental"*, financiado por el INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) en el año 2010.

El objetivo de este trabajo era el estudio de la incidencia y de la estabilidad de las fumonisinas durante el proceso de ensilado. Dos tipos de muestras de silo de maíz fueron planteadas con tal fin: *silos de laboratorio*, en los que se estudió el efecto de inoculantes y el tiempo de ensilado sobre el contenido de fumonisinas; y *silos convencionales*, donde se evaluó el lugar que la muestras ocupaba en el silo.

Paralelamente, un estudio de la posible existencia de fumonisinas modificadas en ensilaje de maíz también fue llevado a cabo.

Parte de las investigaciones realizadas en este campo han sido publicados en el artículo "*Occurrence and stability of maked fumonisins in corn silage samples" (Food Chem., 189, 2015, 38-44),* que se incluye en los Anexos finales de esta Memoria de Tesis.

1. INTRODUCCIÓN

En muchas partes del mundo, los ensilados de maíz son una de las fuentes de alimentación más importantes para rumiantes, llegando a constituir entre un 50-75% de la ingesta de materia seca para las vacas de leche [1].

El proceso de ensilado se basa en el principio de conservación del forraje en condiciones anaeróbicas durante el cual se produce el crecimiento de bacterias del ácido láctico. La fermentación natural promovida por este tipo de bacterias reduce el pH a un nivel en el cual el crecimiento de microorganismos indeseados, incluyendo hongos, se ve inhibido [2,3]. Sin embargo, un manejo inadecuado del ensilaje podría derivar en el desarrollo de hongos micotoxigénicos y en la consecuente producción de micotoxinas, reduciéndose de este modo el valor nutricional del ensilado [4].

Hongos del género *Fusarium* han sido comúnmente aislados en ensilados de maíz y considerados como uno de los principales productores de micotoxinas en este tipo de matriz [5]. Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium*, principalmente por las especies *F. verticilloides* y *F. proliferatum,* que se encuentran habitualmente contaminando cultivos de maíz en regiones templadas de todo el mundo. Aunque varias formas de fumonisinas han sido identificadas, la fumonisina B_1 (FB_1), fumonisina B_2 (FB_2) y fumonisina B_3 (FB_3) son las más características [6, 7].

A pesar de que la aparición de hogos micotoxigénicos y micotoxinas antes y después del proceso de fermentación en el ensilaje ya ha sido estudiado en varios trabajos [4, 8], la información respecto a la estabilidad de las micotoxinas durante el proceso de ensilado es

todavía escasa. Boudra y Morgavi [9], en su trabajo realizado en silos de laboratorio, observaban una disminución de las toxinas del *Fusarium* durante el tiempo de almacenaje. Los mecanismos de esta disminución no son bien comprendidos [10] y se ha especulado sobre una posible elución y pérdida de efluente [9] o una biotransformación por parte de ciertas bacterias lácticas [11,12] y levaduras [13]. Sin embargo, en silos reales de granjas los resultados son en ocasiones contradictorios. Mientras algunos trabajos evidencian aumento en el contenido de fumonisinas durante el proceso de ensilado [9], otros investigadores no han encontrado variación alguna en la cantidad de fumonisinas [14, 15], sugiriendo que la formación de micotoxinas durante el ensilaje era poco probable y que por tanto debían ser principalmente producidas en la etapa previa a la cosecha.

Las fumonisinas causan una gran variedad de enfermedades en animales, tales como la leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos y cáncer de hígado en ratas. A pesar de que el ganado parece ser más resistente al maíz contaminado con fumonisinas [16], debido a la intensa demanda de la producción láctea, el ganado lechero puede ser más susceptible a los efectos toxicológicos de las fumonisinas [17].

Con la intención de mantener el contenido de fumonisinas por debajo de aquellos niveles de riesgo para la salud, la Unión Europea ha recomendado valores de referencia sobre la presencia de fumonisinas en productos destinados a alimentación animal [18]. Para el caso del maíz y de productos a base de maíz, el valor fijado correspondiente a la suma de FB_1 y FB_2 es de 60 mg /kg.

Un tema novedoso en las investigaciones sobre micotoxinas es el relacionado con las micotoxinas modificadas, a menudo llamadas "micotoxinas enmascaradas", que son aquellas que debido a la unión con ciertos nutrientes de la matriz, son indetectables por procedimientos analíticos comunes. Varios trabajos publicados han descrito la aparición de fumonisinas enmascaradas en productos a base de maíz [19-26], que no pudiendo ser extraídas por tratamientos convencionales, eran liberadas mediante hidrólisis alcalina. Tales formas modificadas podrían incluso estar presentes en cantidades más altas que sus formas libres [19].

El fenómeno de enmascaramiento se ha atribuido a la formación de enlaces covalentes entre las fumonisinas y constituyentes de la matriz (fumonisinas *"unidas"*), tales como los hidratos de carbono o proteínas, durante el procesamiento de los alimentos [20]. Sin embargo, estudios recientes en maíz crudo han atribuido este enmascaramiento a interacciones no covalentes (fumonisinas *"ocultas"*) [21, 22]. Además, derivados de FB_1 obtenidos por la esterificación con ácidos grasos en maíz infectado de forma natural también han sido hallados [27, 28].

En general, el término "micotoxinas enmascaradas" ha sido utilizado junto a otros términos como "*conjugadas*", *"unidas", "ocultas"*, lo que podría suponer cierta confusión. Además de este uso ambiguo, el término "micotoxinas enmascaradas" entraña una serie de limitaciones, ya que sólo abarca a los metabolitos generados por las plantas sin incluir o a otras formas de micotoxinas procedentes del metabolismo animal y/o aquellas debidas a modificaciones térmicas durante el procesamiento. Es por ello, que una serie de autores proponen utilizar el téemino micotoxinas modificadas, siendo ésta una definición más amplia que abarca todas las formas posibles de micotoxinas y sus modificaciones, incluyendo la micotoxinas enmascaradas [29].

En el caso de las fumonisinas, el término modificadas, incluiría a aquellas que se unen covalentemente a los compuestos de la matriz (azúcares, ácidos grasos) y a las que están no covalentemente unidas (*atrapadas* físicamente por alguno de los componentes macromoleculares de la matriz) [30].

Trabajos en este campo, han informado que la mayor contribución de fuminisinas "*modificadas*" proviene de aquellas que han interaccionado físicamente (uniones no covalentes) con compuestos de la matriz [30,31].

Desde el punto de vista toxicológico, una liberación total de estas fumonisinas "*modificadas*" podría ser esperada tras la digestión gastrointestinal, suponiendo, por lo tanto, riesgo para la salud del consumidor [31].

Los métodos de extracción de fumonisinas en productos a base de maíz incluyen habitualmente el uso de una mezcla de disolventes polares (metanol y/o acetonitrilo) y agua, seguido de una etapa de purificación antes de la determinación [14, 32-36]. En cuanto a la detección y cuantificación de las fumonisinas, es frecuente la utilización de la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas (LC-MS/MS) [37].

La metodología analítica disponible para la determinación de fumonisinas "*modificadas*" implica un tratamiento de hidrólisis alcalina para liberar las fumonisinas hidrolizadas, seguido de un análisis por cromatografía líquida con detección por fluorescencia o con detección por espectrometría de masas [23]. La presencia de fumonisinas conjugadas a las proteínas en muestras de copos de maíz, ha sido confirmada empleando una disolución detergente de dodecilsulfato sódico (SDS) antes de la hidrólisis alcalina [38]. Sin embargo, la presencia de SDS en los extractos en ocasiones supone dificultades en la separación cromatográfica y en la detección por espectrometría de masas cuando una fuente de ionización por electrospray es empleada (ESI) [24, 39, 40]. Recientemente, un estudio realizado en alimentos a base de maíz, ha optimizado un método de extracción de fumonisinas y de sus derivados hidrolizados mediante hidrólisis alcalina sin incluir ninguna etapa de limpieza y utilizando un espectro de masas de triple cuadrupolo provisto de una fuente ESI [22].

En el trabajo presentado, se ha llevado a cabo la extracción en muestras de silo de maíz de las fumonisinas en su forma libre (FB_1 y FB_2) seguida de una hidrólisis alcalina de los residuos para la liberación de los derivados hidrolizados (HFB_1 y HFB_2). Posteriormente, todos los analitos fueron detectados por LC-HESI-MS/MS.

Dado a que hasta ahora no existe ningún estudio exhaustivo sobre la posible existencia de fumonisinas en sus formas modificadas en muestras de silo de maíz, el trabajo presentado proporciona información muy útil sobre el riesgo de subestimación de los niveles de fumonisinas totales en ensilados de maíz, y consecuentemente, en la subestimación de la toxicidad real para el ganado.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Patrones empleados. Preparación de las soluciones de trabajo

Los compuestos con los que se ha trabajado en esta sección pertenecen a la familia de las fumonisinas.

Se ha utilizado una mezcla técnica de fumonisinas B1 y B2 (FB_1 y FB_2) preparadas en acetonitrilo:agua (1:1; v/v) y en las que la concentración de cada una de las fumonisinas era de 50 µg mL^{-1}.

Además, se ha utilizado también un estándar comercial de la FB_1 hidrolizada (HFB_1) preparado en acetonitrilo:agua (1:1; v/v) a una concentración de 25 µg mL^{-1} también fue utilizado. Sin embargo, el estándar de FB_2 hidrolizada (HFB_2) no está disponible comercialmente, siendo necesaria su síntesis en laboratorio a partir de su análogo FB_2. Dicha labor, fue encomendada a ORGANISTRY (Bergondo, A Coruña, España), empresa que ofrece servicio de síntesis a media, que a partir de la mezcla comercial de FB_1 y FB_2 y basándose en el método propuesto por Dall´Asta [22] llevó a cabo la síntesis de HFB_1 y HFB_2, tal y como se muestra en la siguiente figura:

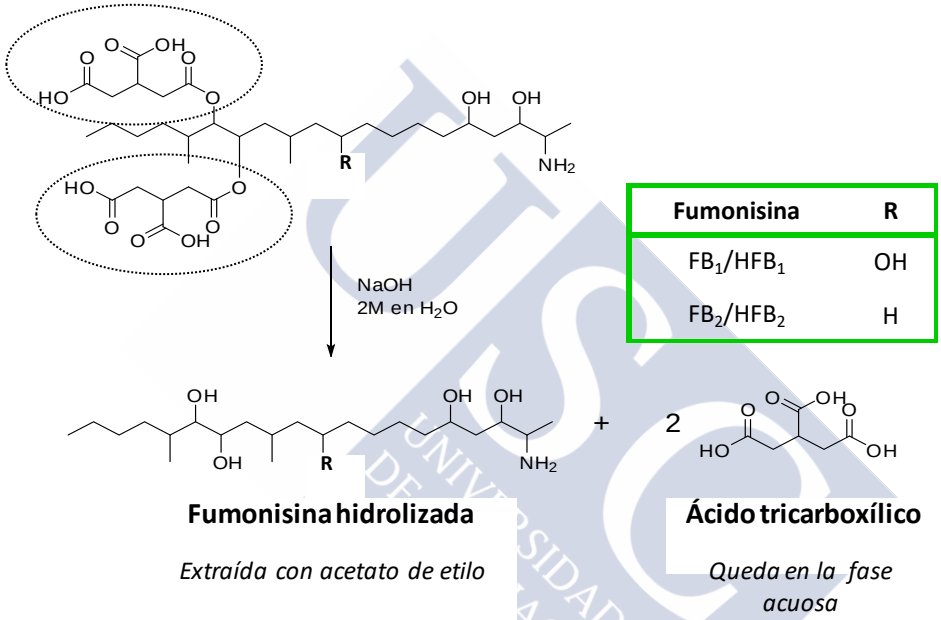


Figura IV.A.1. Reacción de síntesis de las fumonisinas hidrolizadas HFB_1 y HFB_2

El rendimiento de la reacción de síntesis se comprobó por LC-MS/MS comparando la respuesta cromatográfica con la de una solución estándar comercial de HFB_1. El rendimiento de la reacción de síntesis resultó ser de un 73%, siendo la concentración de HFB_1 y de HFB_2 en el estándar sintetizado de 30 µg mL^{-1}.

A partir de convenientes diluciones de los estándares comerciales en acetonitrilo:agua (1:1; v/v), se han preparado soluciones de trabajo de 10 µg mL^{-1}para la mezcla FB_1 y FB_2 y HFB_1 y de 3 µg mL^{-1}para la mezcla de HFB_1 y HFB_2

Todas las soluciones de trabajo fueron conservadas a -20 °C antes de su uso.

2.2. Descripción de los tipos de muestras analizadas

Durante el mismo año, se cultivaron dos parcelas de maíz en la finca experimental del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) (Abegondo, A Coruña, España). Ambas parcelas fueron inoculadas con la cepa micotoxigénica de *Fusarium verticilloides*, obteniéndose plantas de maíz contaminadas procedentes de dos regiones distintas.

Surgieron de este modo dos tipos de ensayos para evaluar el contenido de fumonisinas. En un primer ensayo se elaboraron silos en condiciones de laboratorio (silos de laboratorio o microsilos) a partir del maíz contaminado procedente de una de las parcelas (Parcela A), y un segundo ensayo en el cual muestras de maíz de la otra parcela (Parcela B) eran distribuidas en silos convencionales (silos trinchera).

La elaboración detallada de estos dos tipos de muestras ha sido presentada anteriormente en el Capítulo III, (Apartados 1.2 y 1.3).

Además, el estudio de la estabilidad aeróbica para las muestras del ensayo de silos de laboratorio ha sido también realizado, tal y como se detalla en el próximo Apartado 2.2.3.

2.2.1. Silos de laboratorio

En este ensayo resultaron un total de 128 muestras de las cuales: 32 muestras correspondían a maíz fresco (muestras a los 0 días) y las otras 96 restantes a los silos de laboratorio que fueron abiertos en tres fechas distintas: 60, 120 y a los 240 días.

Con el *diseño experimental* planteado se pretendía evaluar 16 tratamientos, siguiendo un diseño factorial (2x2x4) completamente aleatorizado con 8 repeticiones. Los tratamientos resultan de la combinación de:

- 2 fechas de cosecha: semana 11 (1ª cosecha) tras la floración femenina y semana 13 (2ª cosecha) después de la floración femenina
- 2 tratamientos con inoculante: agua como control y un inoculante comercial a base de *L. Buchneri* (P11CFT)
- 4 momentos de apertura de los silos de laboratorio: 0, 60, 120, 240 días tras la elaboración del silo

Las muestras fueron tomadas en el momento de apertura del silo, teniendo especial cuidado con la representatividad. La toma de muestra, procesado y conservación ya han sido explicados en el Capítulo III (Apartado 1.4.).

2.2.2. Silos trinchera

Este segundo ensayo, 32 sacos de nylon se llenaron con maíz contaminado con *F. verticilloides*. Considerando dos alturas (inferior y superior) y dos secciones (inicial y final), los sacos fueron distribuidos a lo largo del silo trinchera del siguiente modo:

- 8 sacos en parte inferior y sección final.
- 8 sacos en parte inferior y sección inicial.
- 8 sacos en parte superior y sección final.
- 8 sacos en parte superior y sección inicial.

De cada saco se tomaron dos submuestras antes de ser colocados en el silo trinchera, proceso que se repitió al cabo de unos dos meses de haber estado enterrado en el silo trinchera. Esto generó un total de 128 muestras de las cuales: 64 eran muestras de maíz fresco introducido en los 32 sacos y las otras 64, correspondían al maíz ensilado en esos 32 sacos, distribuidos en el silo trinchera.

El *diseño experimental* que se planteaba pretendía evaluar 4 tratamientos (2x2) que resultaban de la combinación de:

- 2 niveles de altura del silo: parte superior y parte inferior

- 2 momentos de muestreo: al principio (sacos correspondientes a la sección inicial del silo) y al final (sacos de la sección final del silo)

2.2.3. Estabilidad aeróbica. Toma de muestras, procesado y conservación

Se ha definido la estabilidad aeróbica como el tiempo en horas durante el que la temperatura permanece inferior a 2°C de la temperatura ambiente. El deterioro aeróbico se definió a partir de la temperatura máxima y/o integral de temperaturas 2°C por encima de la temperatura ambiente.

Para este análisis, una alícuota de 500 g de cada muestra (tomada justo antes de ensilar y/o en el momento de apertura de cada silo) se depositó en una caja de poliestireno de 35x 23 x 8 cm de medidas exteriores y 1,3 cm de espesor, dotadas de dos orificios de 1 cm de diámetro para permitir la entrada de aire. Las cajas se mantuvieron en una sala isoterma a 20°C y humedad de ambiente superior a 80%. Transcurridas dos horas, se comenzó a medir la temperatura en la masa de ensilado cada 15 minutos, durante 7 días. Las temperaturas medidas en este tiempo a través de termopares, fueron almacenadas en un registrador multicanal (ELKET 1105). Al séptimo, se abrieron las cajas y las muestras fueron secadas (40°C durante 48 h) y molidas, antes de proceder al análisis de las fumonisinas.

2.3. Técnica de inmunoensayo ELISA para análisis de fumonisinas totales

Se ha utilizado un Kit de prueba rápida y cuantitativa AgraQuant®, basado en la técnica ELISA para el análisis de fumonisinas totales en las muestras de maíz contaminadas con la cepa de *F. verticilloides*, una vez fueron recogidas del campo y antes de ser ensiladas. El procedimiento se dividía en las dos siguientes etapas:

a) Extracción

En un frasco de polipropileno de 250 mL, las fumonisinas totales fueron extraídas a partir de 10 g. de las muestras (secas y molidas) con 50 mL de una solución de metanol al 70%, siendo la relación muestra:solución de 1:5, respectivamente. Después de una vigorosa agitación durante 3 minutos y una centrifugación (3500 rpm, 20°C, 3 min.), la mezcla fue decantada y el sobrenadante filtrado a través de un embudo con un papel de filtro Whatman N.4. Ya que condiciones de excesiva alcalinidad o acidez pueden afectar al resultado de la prueba, fue necesario comprobar que el extracto tenía un valor de pH de 6-8. A continuación 50 µl de extracto fueron diluidos en 950 µl de agua destilada, resultando muestras con una dilución 1:20 (v/v), que se analizaron por la técnica ELISA.

b) Ensayo ELISA

Para este ensayo, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Atemperar los reactivos que componen el kit (18-30 °C)

2. En la placa base, se colocaron tiras de dilución provistas de pocillos. Cinco pocillos de dilución para cada uno de los patrones (0, 0,25, 1, 2,5, 5 ppm) y ocho pocillos para las muestras a analizar. El mismo número de pocillos (13) recubiertos con anticuerpos fueron también colocados en la placa base

3. Utilizando una pipeta monocanal, se dispensaron 200 µL de conjugado en los 15 pocillos de dilución y a continuación, 100 µL de patrón o de muestra, asegurándose de mezclar bien el contenido de los pocillos pipeteando y liberando las mezclas unas tres veces.

4. Se transfirieron 100 µL de la mezcla anterior a los pocillos que contenían los anticuerpos y se incubó durante 15 min.

5. El contenido de los pocillos se vació en el contenedor de residuos y los pocillos se lavaron cinco veces con agua destilada utilizando un frasco lavador.

6. Tras secar correctamente los pocillos golpeando sobre un papel absorbente, se agregaron 100 µL de substrato y se incubó durante 5 min.

7. Se añadieron 100 µL de sustrato de solución Stop dentro de cada uno de los pocillos y el color del contenido cambió de azul a amarillo a los pocos minutos.

8. Por último, se utilizó un lector de placas ELISA con un filtro de 450 nm y como referencia un filtro de 630 nm, se procedió a la lectura de los pocillos y se registraron las densidades ópticas (DO).

2.4. Procedimiento de extracción

El análisis de la fumonisinas en las muestras de silo se llevó a cabo en dos etapas: una primera etapa en las que las fumonisinas *"libres"* (FB_1, FB_2) eran extraídas y una segunda etapa donde el residuo obtenido era sometido a una hidrólisis alcalina liberando las fumonisinas hidrolizadas (HFB_1 y HFB_2).

2.4.1. Extracción de las fumonisinas *"libres"*

Se pesó un gramo de silo de maíz molido en un tubo cónico de polipropileno de 50 mL, sobre el que se adicionaron 20 mL de metanol:agua (80:20; v/v). La mezcla fue agitada en un agitador orbital durante 60 minutos a 100 rpm y tras la agitación, centrifugada durante 30 minutos, a 1500 rpm y 10 °C.

Utilizando un evaporador de vacío a una temperatura de 70 °C, en combinación con una bomba de vacío y un recirculador de agua a temperatura constante de 7,5°C, el sobrenadante obtenido fue evaporado hasta obtener un volumen final de 3 mL. El extracto obtenido fue filtrado con un filtro de jeringa de PTFE de 0,45 µm y posteriormente diluido en agua con 0,1% de ácido fórmico: acetonitrilo (70:30; v/v) siendo ésta la concentración de la fase móvil en el momento de inyección en el cromatógrafo de líquidos.

El factor de dilución fue distinto en cada ensayo, siendo de 1:10 (v/v) (100 µL de extracto en 1 mL de fase móvil) para las muestras correspondientes a los silos de laboratorio y de 1:5 (v/v) (200 µL de extracto en 1 mL de fase móvil) para las muestras de los silos trinchera. Los extractos diluidos fueron analizados a continuación en el LC-MS/MS.

2.4.2. Extracción de las fumonisinas "*modificadas*"

Tras la extracción de las fumonisinas *"libres"* de 1 g de muestra de silo de maíz, el residuo sólido fue hidrolizado con 15 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio (2 M), en un baño de agua a 70°C y durante 1 h.

Una vez enfriada a la mezcla, se añadieron 15 mL de acetato de etilo y se calentaron a 70°C y durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó (15 min., 3500 rpm), generándose dos fases inmiscibles y recogiéndose la fase orgánica (fase superior) fue

recogida. Este último tratamiento con acetato de etilo se repitió tres veces combinándose las fases orgánicas obtenidas. A continuación, se evaporó a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno. El residuo obtenido fue reconstituido en agua con 0,1% de ácido fórmico: acetonitrilo (70:30; v/v) y filtrado con filtro de jeringa de PTFE de 0,45 µm. Antes de su análisis en el LC-MS/MS, 50 µL de los extractos anteriores se diluyeron en 1 mL de fase móvil, siendo el factor de dilución 1:20 (v/v).

2.5. Preparación de las curvas de calibrado

Se han preparado curvas de calibración bajo la técnica "*matrix-matched calibration"* para FB_1 y FB_2 basadas en la elaboración de patrones de calibración mediante la adición de distintos volúmenes de las soluciones de trabajo de la mezcla de FB_1 y FB_2 a extractos blancos de silo obtenidos a partir del procedimiento de extracción descrito anteriormente. Teniendo en cuenta que el factor de dilución de los extractos era de 1:10 (v/v) para el ensayo de silos de laboratorio y de 1:5 (v/v) para los silos trinchera, se emplearon curvas de calibración "*matrix-matched"* conteniendo distintos porcentajes de matriz silo de maíz: 10% y 20% para la cuantificación de silos de laboratorio o trinchera, respectivamente.

Por otro lado, se han preparado curvas de calibración estándar para la cuantificación de las fumonisinas hidrolizadas, mediante dilución de volúmenes adecuados de la solución trabajo mezcla HFB_1 y HFB_2 en agua con 0,1% de ácido fórmico: acetonitrilo (70:30; v/v).

2.6. Detección y cuantificación mediante LC-MS/MS

A pesar de que la detección y cuantificación de las fumonisinas (FB_1, y FB_2) y sus análogas hidrolizadas (HFB_1 y HFB_2) se llevaban a cabo en dos analíticas distintas, las condiciones cromatográficas y del detector empleadas y que se exponen en este apartado han sido común para ambas.

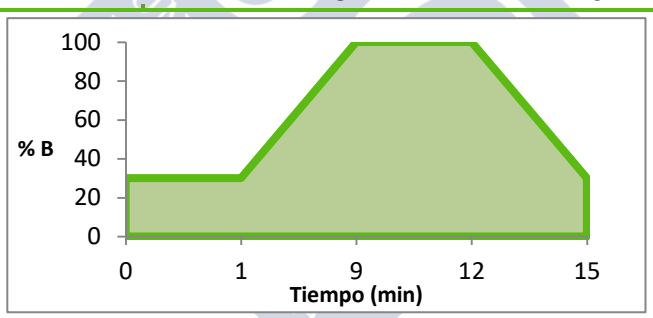
El equipo utilizado fue un LC-MS/MS TSQ Quantum Access de triple cuadrupolo equipado con una fuente de ionización por electrospray HESI, y el modo de adquisición fue SRM (Selected Reaction Monitoring), con ionización positiva. Las condiciones cromatográficas y del detector masas se resumen en la siguiente tabla (Tabla IV.A.1.)

Se inyectaron 10 µL tanto de los patrones de fumonisinas como de los extractos de silo, mantenidos en el automuestrador a una temperatura de 10°C.

Tabla IV.A.1. Condiciones LC-MS/MS empleadas en el análisis de fumonisinas

COLUMNA		
Hypersil GOLD aQ (Thermo Scientific)	Fase estacionaria	C18
	Dimensiones	100×2.1mm
	Tamaño de partícula	3 µm
	Tamaño de poro	175 Å
	Temperatura	25°C

FASE MÓVIL			
Régimen	Gradiente		
A	Agua con ácido fórmico al 0,1%		
B	Acetonitrilo		
Flujo	200 µL min^{-1}		
Temperatura	25°C		
Gradiente de fase móvil	Tiempo (min)	% A	% B
	0	70	30
	1	70	30
	9	0	100
	12	0	100
	15	70	30



DETECTOR	
Modo de ionización	Positivo
Voltaje del spray (V)	3500
Tª del vaporizador (°C)	250
Tª del capilar (°C)	350
Gas de impulsión (u.a.)[1]	38
Gas auxiliar (u.a.)	5
Voltaje del *skimmer ofset* (V)	4
Tiempo de scan (mseg)	10
Presión argon (mbares)	0,002
Cono de barrido de iones (u.a.)[1]	3

[1]**Unidades arbitrarias (u.a)**

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Interpretación de los resultados obtenidos por la técnica ELISA

La prueba AgraQuant® para la determinación de las fumonisinas totales utilizada en este ensayo, consistía en un enzimo-inmuno análisis directamente competitivo, cuyo rango de cuantificación era de 0,25-5,0 ppm.

El objetivo de esta prueba ELISA, era conocer si la inoculación llevada a cabo en las dos parcelas con la cepa de *F. verticilloides* había sido efectiva y había producido fumonisinas, antes de la elaboración de las muestras de silos de laboratorio y silos trinchera. Ya que el mayor nivel de contaminación provocado por el hongo se observaba en la mazorca, se decidió analizar sólo esta parte de las plantas de maíz inoculadas.

Se seleccionaron mazorcas de ambas parcelas, y éstas a su vez fueron divididas en grano y en carozo. Dos muestras de grano y dos muestras de carozo de cada una de las parcelas fueron analizadas con la técnica ELISA.

Las fumonisinas de las muestras y de los patrones competían con las fumonisinas conjugadas con enzimas por lugares de unión de los anticuerpos disponibles. Tras el lavado y la adición del sustrato para a enzima, un color azul se generaba en los pocillos, cuya intensidad era inversamente proporcional a la cantidad de fumonisinas en las muestras y en los patrones. Era con la solución stop, cuando se producía el cambio de color, que tornaba de azul a amarillo, momento en el que se procedía a la lectura de la DO a una longitud de onda de 450 nm.

A partir de los valores de DO obtenidos para los cinco patrones, se construyó la curva dosis-respuesta fue construida, representando el logaritmo de B/B_0 frente al logaritmo de la concentración de cada patrón, donde B es el valor de la DO del patrón y B_0 el valor de la DO del patrón de 0 ppm.

La concentración de fumonisinas totales se obtiene por interpolación a partir de la curva de patrones (y= ax + b) y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Log conc.} = \log (B/ B_0 + b)/a$$

Donde a y b corresponden a la pendiente y a la ordenada en el origen, respectivamente, de la curva de los patrones.

Tabla IV.A.2. Valores para la representación de la curva dosis-respuesta para las fumonisinas

	conc. (ppm)	*Log (conc)*	*DO (450 nm)*	*Log B/B_0*
Patrón 1	0		1,620	**0,000**
Patrón 2	0,25	**-0,602**	1,140	**-0,153**
Patrón 3	1	**0,000**	0,545	**-0,473**
Patrón 4	2,5	**0,398**	0,328	**-0,694**
Patrón 5	5	**0,699**	0,184	**-0,945**

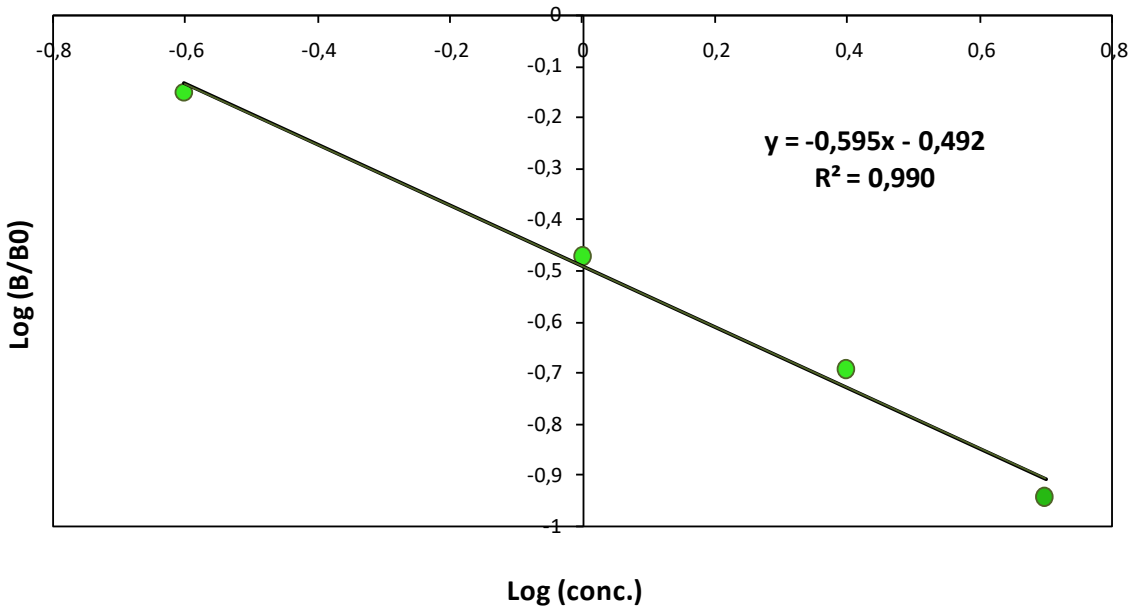


Figura IV.A.2. Curva de calibración estándar obtenida para la determinación de fumonisinas totales utilizando la prueba AgraQuant® basada en la técnica ELISA

Los resultados expuestos en la tabla anterior, mostraron que efectivamente la inoculación de la cepa de *F. verticilloides* funcionó correctamente y que las fumonisinas habían sido producidas por el hongo. Los datos de concentración también revelaron que la concentración de fumonisinas en la *Parcela A* era superior a la encontrada en la *Parcela B*, probablemente porque la inoculación resultó ser más efectiva en la primera de las parcelas.

Tabla IV.A.3. Concentración de fumonisinas totales en muestras de grano y carozo de maíz obtenidas por la prueba AgraQuant® basada en la técnica ELISA

	Muestra	DO (450 nm)	log B/B_0	log conc.	conc.(ppm)	Media conc.(ppm)
Parcela A	Carozo 1	0,165	-0,992	0,839	6,92	9,8
	Carozo 2	0,115	-1,149	1,103	12,58	
	Grano 1	0,108	-1,176	1,149	13,80	11,1
	Grano 2	0,146	-1,045	0,929	8,30	
Parcela B	Carozo 1	0,573	-0,451	-0,069	0,87	4,4
	Carozo 2	0,151	-1,031	0,904	7,94	
	Grano 1	0,21	-0,887	0,663	4,60	5,7
	Grano 2	0,168	-0,984	0,826	6,80	

Los límites de detección y cuantificación eran de 0,2 ppm y 0,25 ppm, respectivamente, lo que convierten al ELISA en una técnica relativamente sensible para el análisis de fumonisinas totales. Además, presentaba otra serie de beneficios como la rapidez de análisis, facilidad de la extracción y bajos costes.

Figura IV.A.3. Mazorcas infectadas con *F. verticilloides* tras la inoculación de plantas de maíz

3.2. Optimización de las condiciones del LC-MS/MS

Aunque el método oficial de análisis de la AOAC de fumonisinas en alimentos a base de maíz consiste en la separación por HPLC con detección por fluorescencia mediante una derivatización post-columna con ortoftaldehido (OPA) [36], actualmente la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS), se ha destacado como uno de los métodos más selectivos y sensibles para el análisis de fumonisinas sin necesidad de derivatización [37].

En este estudio, en base a las propiedades de las fumonisinas, durante el desarrollo del método LC-MS/MS, se trató de seleccionar la adecuada composición de fase móvil que proporcionase un rendimiento cromatográfico en relación con la forma del pico cromatográfico, tiempo de retención y separación entre picos. Además, la eficacia de la ionización antes de que los analitos alcancen el sistema MS/MS, también fue considerada con el fin de obtener una alta sensibilidad.

Tal y como se observa en la Figura IV.A.1, las fumonisinas contienen restos de ácidos carboxílicos libres. De modo que trabajar con una fase móvil en condiciones ácidas podría evitar la ionización de los grupos ácidos, y mejorar la retención y forma de los picos cromatográficos, mediante la neutralización de los cuatro grupos carboxílicos [41,42]. Teniendo todo esto cuenta, se seleccionó la mezcla de agua acidificada con 0.1% ácido fórmico y acetonitrilo en una proporción 70:30 (v/v) y se encontró que proporcionaba buenos resultados, tanto para las fumonisinas como para sus análogas hidrolizadas.

Los resultados del MS mostraron que todas las fumonisinas estudiadas (FB1, FB_2, HFB_1 y HFB_2), ionizaban en modo positivo formando iones $[M+H]^+$. Se observó que FB_1y FB_2 también podían ser detectadas en modo de ionización negativo formando iones $[M-H]^-$, pero la señal que presentaban era menos intensa. Fue por ello que el modo de ionización en positivo fue el elegido para este estudio.

Las transiciones MS/MS y sus energías de colisión fueron optimizadas introduciendo patrones de cada una de las fumonisinas a una concentración 1 µg mL^{-1}, preparadas en una mezcla agua: acetonitrilo 50:50 (v/v).

En la siguiente tabla aparecen detallados los tiempos de retención obtenidos y las transiciones y las energías de colisión seleccionadas en el modo positivo. No obstante, y a pesar de no haber sido las utilizadas en este estudio, también se incluyen en esta tabla las transiciones y energías de colisión para FB_1 y FB_2 en modo de ionización negativa.

Tabla IV.A.4. Tiempos de retención y parámetros MS/MS optimizados para las fumonisinas estudiadas

Analito	T_R (min)	Ionización	Ion precursor	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Energías de colisión (eV)
FB_1	4.3	HESI +	[M+H]+	722.3	334.2 / 325.1	42 / 33
FB_2	5.4	HESI +	[M+H]+	706.4	318.3 / 336.1 /354.4	35 / 35 / 34
HFB_1	3,5	HESI +	[M+H]+	406.4	254.2 / 352.3 / 370.3 / 388.2	23 / 21 / 20 / 16
HFB_2	5,4	HESI +	[M+H]+	390.5	318.5 / 354.5 / 372.5	21 / 21 / 21
FB_1	4.3	HESI -	[M-H]-	722.3	334.2 / 325.1	42 / 33
FB_2	5.4	HESI -	[M+H]+	706.4	318.3 / 336.1 /354.4	35 / 35 / 34

3.3. Evaluación de los parámetros de calidad del método de extracción de fumonisinas *"libres"*

3.3.1. Optimización del disolvente de extracción

Para seleccionar el disolvente que garantizase una buena extracción de las fumonisinas de las muestras de ensilado de maíz, se estudiaron dos mezclas de disolventes, considerando la solubilidad de FB_1 y FB_2 metanol:agua (80:20, v/v) y metanol: acetonitrilo:agua (25:25:50,v/v/v).

Con tal fin, se realizó un estudio de la recuperación del método de extracción con las dos mezclas de disolventes anteriores, mediante fortificaciones de blancos de silo a los niveles de 2000, 5000 y 10000 µg kg^{-1}, cada uno de ellos por triplicado (n=3). Los extractos obtenidos a partir de estas fortificaciones fueron diluidos 1/10 (v/v) y analizados a partir de la recta *matrix matched calibration.*

Los resultados que se exponen en la siguiente tabla (Tabla IV.A.5.), indicaron que la mayor recuperación de la FB_1 y FB_2 se lograba si la extracción era realizada con la mezcla metanol:agua (80:20, v/v), siendo especialmente significativo para la FB_2 , para la cual se obtuvo un valor medio de recuperación bajo (37,2%) cuando se trabajaba con la mezcla metanol: acetonitrilo:agua (25.25:50,v/v/v). Fue por tanto el combinado metanol:agua (80:20, v/v) el elegido como extractante de las fumonisinas en las distintas muestras de silo de maíz.

Según trabajos publicados anteriormente, la determinación de fumonisinas en productos a base de maíz frecuentemente implicaba la extracción con mezcla de disolventes polares (metanol y/o acetonitrilo) y agua, seguido de una etapa de purificación basada en una extracción en fase sólida (SPE) [32,33], intercambio aniónico (SAX) [14] o columnas de

inmunoafinidad (IAC) [34-36]. Sin embargo, el uso de una etapa de limpieza supone un mayor tiempo de preparación de la muestra y no siempre mejora los rendimientos de recuperación de las fumonisinas [43].

Tabla IV.A.5. Valores de recuperación obtenidos para la extracción de fumonisinas en muestras de silo de maíz con los dos extractantes propuestos

Micotoxina	Disolvente de extraccion	Niveles fortificacion (n=3)	Recuperación media	RSD
		(ug kg-1)	%	%
FB_1	metanol:agua (80:20)	2000, 5000, 10000	70,7	9,3
FB_2			66,2	8,2
FB_1	metanol:acetonitrilo:agua (25:25:50)	2000, 5000, 10000	64,7	12,6
FB_2			37,2	8,6

De este modo, ninguna etapa de purificación fue incluida en el método de extracción de fumonisinas con metanol:agua (80:20, v/v) en muestras de silo de maíz del presente estudio, cuyos parámetros de calidad se exponen en los apartados siguientes.

3.3.2. Linealidad y límites de detección y cuantificación

Teniendo en cuenta algunos de los principales aspectos de la validación de un método analítico establecido en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657 [44], se ha comprobado la linealidad de la calibración externa en un rango de 22-700 ug L^{-1} para las fumonisinas FB_1 y FB_2.

Para ello, se han evaluado cuatro rectas de calibración preparadas a partir de las adecuadas diluciones de la solución de trabajo en agua con 0,1% de ácido fórmico: metanol (70:30, v/v) y a nueve niveles de concentración.

La evaluación estadística mediante la aplicación del test F de Fisher y el test Q de Cochran a un nivel de confianza α=1%, reveló un ajuste lineal de los puntos de calibrado y la existencia de homogeneidad en las varianzas, pudiéndose afirmar que las calibraciones para FB_1 y FB_2, fueron lineales en el rango establecido, con coeficientes de determinación (R^2) de 0,9934 y 0.9975, respectivamente.

Además, los límites de detección y cuantificación instrumentales (IDL y IQL) y límites de detección y de cuantificación del método (LOD y LOQ) para FB1 y FB_2 han sido también evaluados, parámetros que aportaron una idea acerca de la sensibilidad.

La determinación del límite de detección instrumental (IDL) y del límite de cuantificación instrumental (IQL) fue llevada a cabo a partir de las curvas de calibración estándar (y = ax + b), de acuerdo con las formulas:

$$IDL = b + 3sb / a$$
$$IQL = b + 10sb / a$$

Donde: b es la ordenada en el origen (o intercepto), sb la desviación estándar del valor de b, y a es la pendiente de la curva de calibración estándar.

Los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) también fueron evaluados. Aunque existen diversos modos de calcular estos dos límites, la más empleada consiste en la extrapolación de la relación entre la señal y el ruido (S/N) de los picos de los cromotagramas, de modo que los LOD y LOQ representan la concentración del analito para la cual la S/R es de 3 y 10, respectivamente.

Teniendo esto en cuenta, los LOD y LOQ se calcularon para FB_1 y FB_2 considerando los picos cromatográficos generados por los patrones con un factor de dilución 1:10 (10% de matriz silo), a partir de los cuales se realizó una extrapolación.

Tabla IV.A.6. Linealidad, límites de detección y de cuantificación obtenidos para el análisis de fumonisinas

Micotoxina	Rango de linealidad	R^2	IDLs	IQLs	LODs	LOQs
	(ug L^{-1})	(1/X)*	(ug L^{-1})	(ug L^{-1})	(ug kg^{-1})	(ug kg^{-1})
FB_1	22-700	0,9934	6,5	21,8	195	654
FB_2	22-700	0,9975	4,7	15,7	141	471

*** (1/X): patrones de calibrado ponderados por la inversa del cuadrado de su cantidad**

En la recomendación 2006/576/CE [18], la Unión Europea ofrece un valor orientativo sobre el contenido máximo de la suma de fumonisinas (FB_1 + FB_2) en productos destinados a la alimentación animal a base de maíz de 60 mg kg^{-1}.

Los valores de LOQs obtenidos para FB_1 y FB_2 referidos a la matriz silo de maíz, se encuentran a un nivel bastante bajo, siendo las suma de ambos ligeramente superior 1,12 mg kg^{-1}, cumpliendo con creces las especificaciones recomendados por la Unión Europea.

3.3.3. Evaluación del efecto matriz

El efecto de supresión o aumento de iones en la fuente de ionización por interferencias con la matriz se estudió para FB1 y FB_2 por comparación entre las pendientes de las rectas de regresión realizadas bajo el método *"matrix-matched calibration"* con presencia, en cada caso, de un 10% o un 20% de matriz para cada uno de los niveles, y otra con calibración estándar es obtenida a partir de diluciones del patrón de fumonisinas en acetonitrilo:agua (50:50, v/v).

La fórmula empleada para el cálculo del efecto matriz (ME) ha sido la siguiente:

$$ME\ (\%) = [A_{matrix} / A_{estándar})] * 100 - 100$$

donde A_{matriz} es la pendiente obtenida con la curva de calibración *"matrix-matched"* y $A_{estándar}$ la pendiente de la curva de calibración estándar.

Como se puede observar en la figura siguiente, las pendientes proporcionadas por las rectas de regresión preparadas en matriz son superiores a aquellas obtenidas a partir del calibrado con estándares.

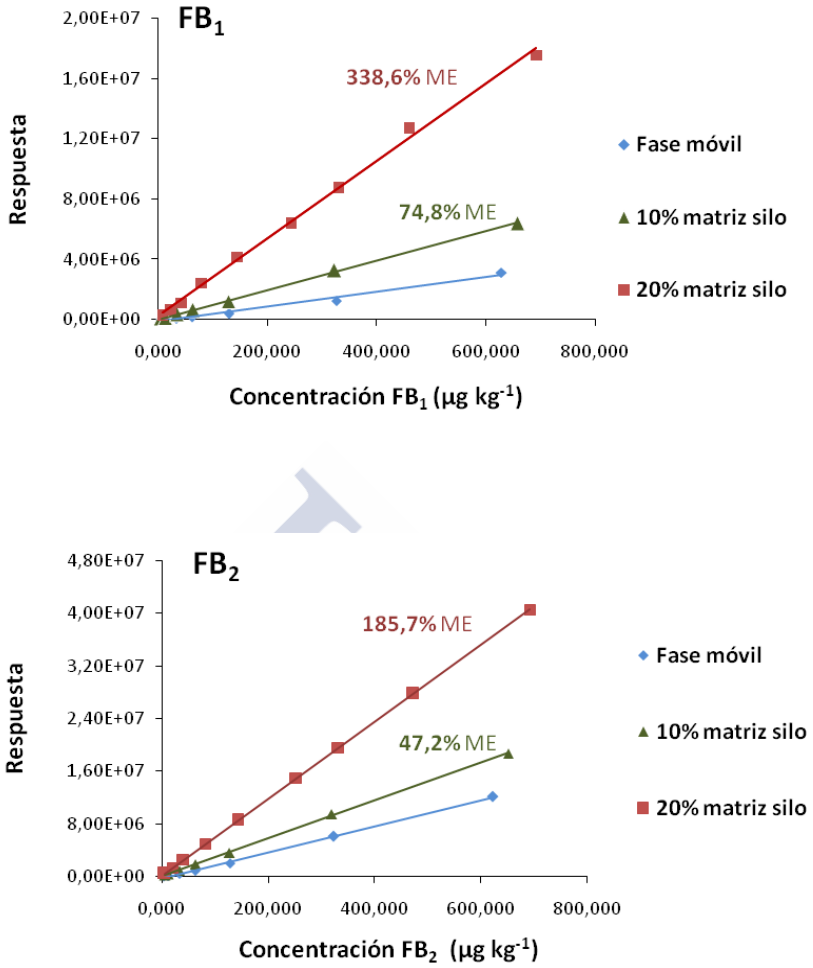


Figura IV.A.4. Efecto matriz observado para las fumonisinas en muestras de silo de maíz.

Cuanto mayor fue el porcentaje de matriz presente, mayor aumento de señal analítica fue observado, llegando a alcanzar un 338, 6% de ME para la FB_1 cuando se trabaja con 20% de matriz. Aunque para ambas fumonisinas el ME ha sido muy elevado, fue la FB_1 en la que el efecto fue más pronunciado.

Concluyendo, la presencia de componentes de la matriz silo que co-eluyen con las fumonisinas ha tenido un sorprendente efecto multiplicador en sus respuestas analíticas al trabajar con la fuente de ionización tipo ESI, lo que se ha visto traducido con un elevado aumento de la señal analítica. Asumiendo la existencia de este pronunciado efecto matriz y tratando de compensarlo en la medida de lo posible, se decidió el uso de curvas de calibración *"matrix-matched"* para la cuantificación de las fumonisinas en las muestras de silo, que, dependiendo del ensayo, contenían un 10 o un 20% de matriz.

3.3.4. Exactitud y precisión

La estimación relativa a la exactitud del método se realizó a partir de los fortificados por triplicado (n=3) de muestras de silo blanco, previo a la extracción, a tres niveles de concentración (2000, 5000 y 10000 µg kg^{-1}). Los extractos obtenidos fueron diluidos 1/10 (v/v).

Las recuperaciones se calcularon mediante la relación entre la concentración de cada fumonisina en los experimentos anteriores obtenidas a partir de las curvas de calibración *"matrix-matched"* y los valores de concentraciones teóricos. Mediante el promedio de las recuperaciones para cada uno de los niveles de concentración se han obtenido el valor de recuperación final para cada fumonisina. Además, la desviación estándar relativa (RSD) de las determinaciones también ha sido calculada.

Tabla IV.A.7. Valores de recuperación media y RSD para las fumonisinas

Micotoxina	Niveles fortificacion (n=3)	Recuperación media	RSD
	(ug kg-1)	%	%
FB_1	2000, 5000, 10000	70,7	9,3
FB_2		66,2	8,2

El valor de las recuperaciones permitió evaluar la exactitud del método, mientras que de la RSD asociada a las medidas se extrajo una idea acerca de su precisión.

Los valores de las recuperaciones obtenidos para ambas fumonisinas han mostrado valores superiores al 66%, porcentajes que se han estimado aceptables y suficientemente cuantitativos para poder considerar como adecuado el método de extracción de fumonisinas en muestras de silo de maíz propuesto.

Además, los valores de RSD se han mantenido por debajo del 10%, indicando una baja dispersión de los datos y, por lo tanto, una buena precisión de la metodología aplicada.

3.3.5. Repetibilidad y reproducibilidad

Una evaluación más completa acerca de la precisión del método se realizó a partir del cálculo de la repetibilidad y de la reproducibilidad.

Para el estudio de la repetibilidad (precisión intra-día), 2 extractos fortificados a dos niveles de concentración (900 y 5000 µg kg^{-1}) fueron analizados seis veces en el mismo día, siendo los valores obtenidos de 2.8 y 1.8% para la FB_1 y FB_2, respectivamente.

La evaluación de la reproducibilidad (precisión inter-día) consistió en el análisis de 9 extractos fortificados a niveles de concentración de fumonisinas en un rango entre 800-7000 µg kg^{-1} ,durante seis días consecutivos, resultando una reproducibilidad de 7,2% para FB_1 y 5,6% para FB_2.

A la vista de estos valores tan bajos de repetibilidad y de reproducibilidad, se pudo deducir la alta precisión y robustez de la metodología propuesta.

3.4. Estudio de la existencia de fumonisinas *"modificadas"* en muestras de silo.

Apoyándose en investigaciones previas que informaban sobre las formas modificadas de fumonisinas en diferentes productos a base de maíz, debidas a distintos tipos de interacciones de estas micotoxinas con constituyentes de la matriz [19-22, 25], una vez que las fumonisinas "*libres*" fueron extraídas de los silos de maíz, la presencia de fumonisinas "*modificadas*" fue también evaluada en las mismas muestras.

En tales investigaciones, se ha observado que estas fumonisinas "*modificadas*" no podían ser extraídas con métodos convencionales, siendo necesario un tratamiento de hidrólisis alcalina que, tras la eliminación de las cadenas laterales de ácidos tricarboxílicos de las fumonisinas, liberaría sus derivados hidrolizados: las fumonisinas hidrolizadas [23-25].

3.4.1. Pruebas previas

De este modo, dos muestras de silo de maíz contaminadas con fumonisinas fueron seleccionaron aleatoriamente, ambas procedentes del ensayo de silos de laboratorio. Tras la extracción de las fumonisinas *"libres"*, los residuos sólidos obtenidos de ambas muestras fueron tratados con una disolución de hidróxido sódico (2M) mediante agitación durante 1 hora, y posteriormente con acetato de etilo durante 30 min. Las dos fases inmiscibles que se obtuvieron después de una centrifugación fueron separadas y la fase de orgánica (acetato de etilo), evaporada y reconstituida en agua con 0,1% de ácido fórmico: acetonitrilo (70:30; v/v). El análisis por LC-MS/MS de estos extractos reveló la existencia de un pico cromatográfico correspondiente a HFB_1.

Además, en las muestras hidrolizadas un segundo pico de alta intensidad era observado, pudiendo corresponder al derivado hidrolizado de la FB_2, la otra fumonisina presente en gran proporción en las muestras. La información extraída de la bibliografía sobre las transiciones electrónicas correspondientes al compuesto HFB_2 fue utilizada. A continuación, se muestra un cromatograma correspondiente a una de las muestras hidrolizadas, en donde se observan dos picos cromatográficos de gran intensidad. Si se reconstituye el cromatograma a partir de la señal registrada en SRM para cada uno de los analitos, se obtienen dos picos cromatográficos, el primero para HFB_1 que corresponde a las transiciones seleccionadas previamente tras la infusión del estándar en la fuente de ionización, y el segundo para HFB_2, que responde a las transiciones descritas en la bibliografía.

Para la correcta identificación de este pico "sospechoso", debido a que en este momento el estándar de HFB_2 no existía comercialmente, éste tuvo que ser sintetizado en el laboratorio, trabajó que llevó a cabo la empresa ORGANISTRY (Bergondo, A Coruña, España) y que aparece detallado previamente en el Apartado 1.1 de la presente Sección.

Las pruebas pertinentes confirmaron que efectivamente el pico "sospechoso" correspondía a la HFB_2.

De esta forma se ha confirmado el hecho de que, en las muestras de silo de maíz, existían fumonisinas que, debido a posibles uniones con componentes de la matriz, eran "no detectables" tras aplicar el método de extracción comúnmente utilizado, haciendo necesaria la posterior hidrólisis alcalina del residuo que liberase sus derivados hidrolizados.

En investigaciones anteriores, donde los matrices alimentarias estudiadas eran sometidas a tratamientos térmicos de procesado de alimentos [20], las formas modificadas de fumonisinas se relacionaban con la interacción a través de enlaces covalentes entre las fumonisinas y distintos macrocomponentes de la matriz. Sin embargo, dado que las muestras de silo de maíz no fueron sometidas a ningún efecto térmico [24, 38], la liberación de los derivados hidrolizados (HFB_1 y HFB_2) observada en las muestras de silo del presente estudio, sugirió la existencia de una interacción no covalente entre las fumonisinas y los macrocomoponentes de la matriz. Este mismo tipo de asociación de naturaleza no covalente, había sido ya constatado por Dall´Asta, C. et al.[21] en el primer estudio sobre la presencia de fumonisinas *"modificadas"* en maíz crudo.

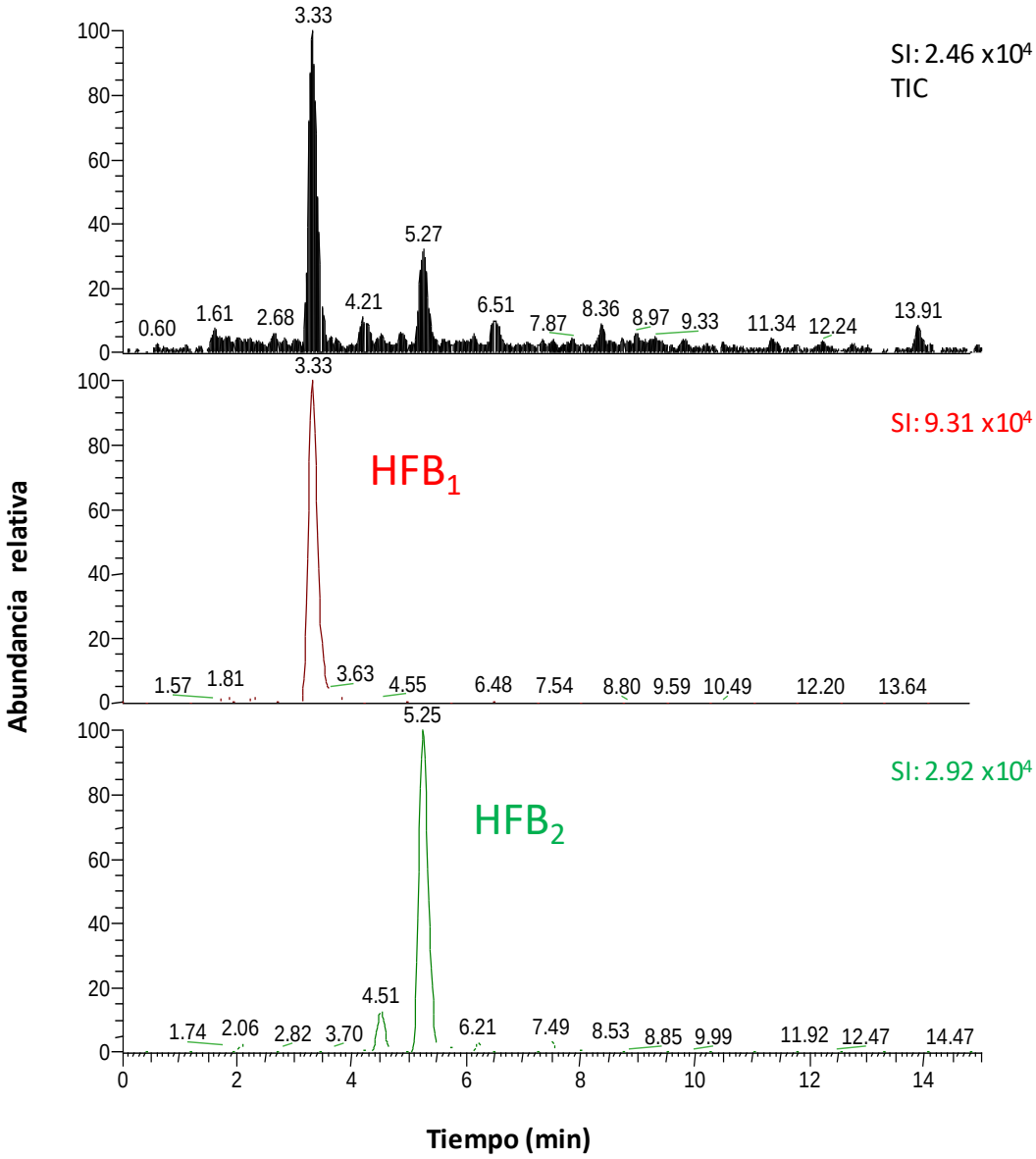
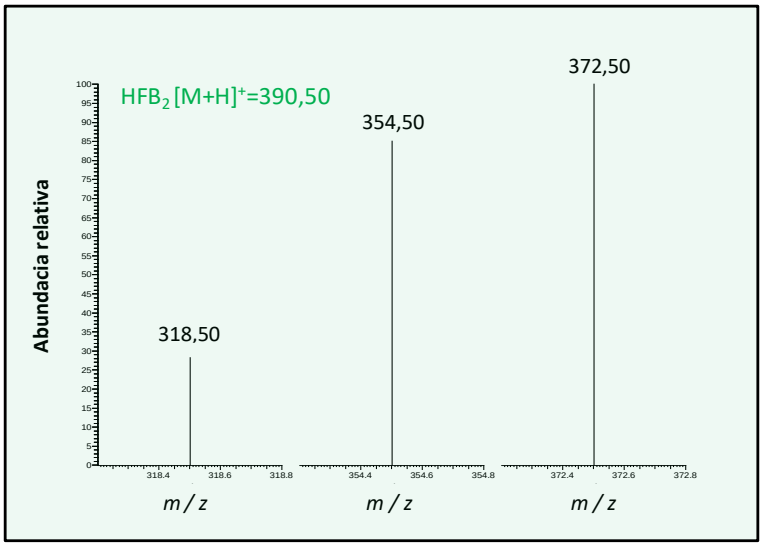


Figura IV.A.5. Señales cromatográficas (SRM) obtenidas para la HFB_1 y HFB_2 tras el análisis de una muestra de silo de maíz "hidrolizada"



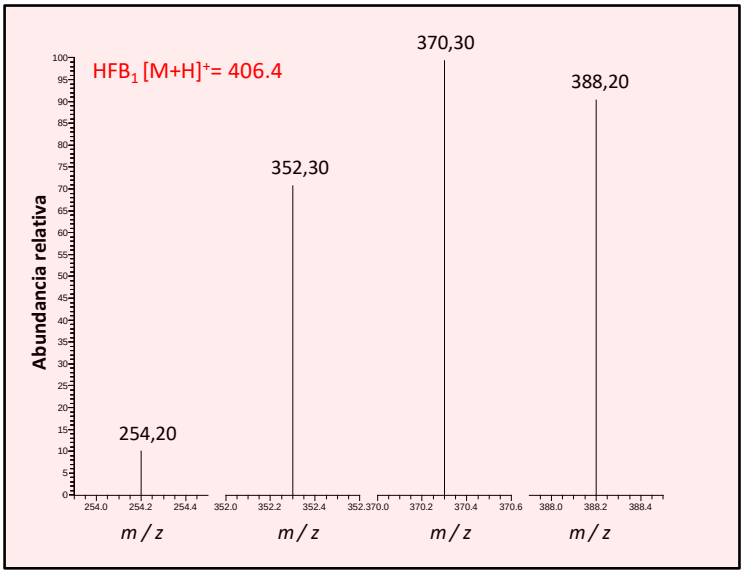


Figura IV.A.6. Espectros de masas (SRM) para la HFB_1 y HFB_2

Paralelamente, se decidió valorar la efectividad del uso de dodecilsulfato sódico (SDS), detergente capaz de desnaturalizar las proteínas y que podría ayudar a la extracción de la fracción proteica que pudiese estar formando complejo con las fumonisinas. Para ello, se generaron nuevos residuos sólidos a partir de la extracción de las fumonisinas "*libres*" sobre los cuales se aplicó una solución detergente de SDS (1%), previa a la etapa de hidrólisis alcalina.

La señal analítica correspondiente a HFB_1 obtenida fue comparada con aquella procedente del residuo que no fue tratado con SDS.

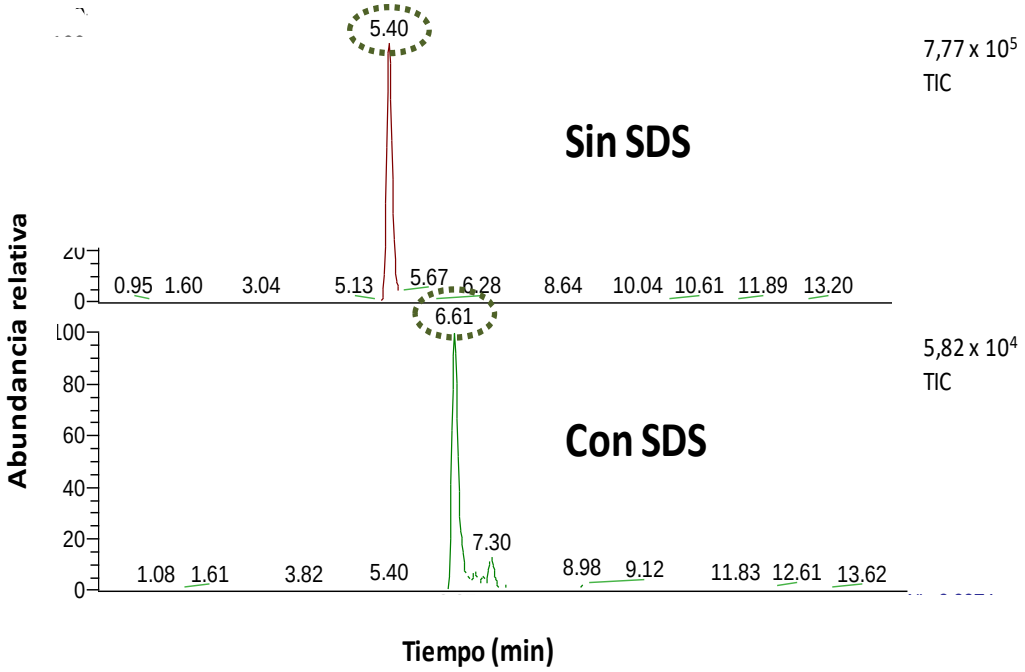


Figura IV.A.7. Cromatogramas correspondientes a HFB_1 obtenidos tras el tratamiento de residuos de muestras de silo de maíz con y sin SDS

Tal y como se observa en los cromotogramas anteriores, el tratamiento con SDS provocaba una variación de más de un minuto en el tiempo de retención de la HFB_1, lo que conllevaría a que la confirmación de esta micotoxina fuese poco fiable. Varios autores ya habían observado el mismo fenómeno [24, 39, 40], asumiendo que la presencia de SDS en los extractos dificultaba las etapas posteriores de separación cromatográfica y de detección por espectrometría de masas cuando se utilizaba una fuente de ionización tipo ESI.

Por todo ello, un tratamiento previo con SDS no ha sido incluido en el método de extracción de fumonisinas *"modificadas"*, cuya optimización viene detallada en el próximo apartado.

Las intensas señales analíticas obtenidas para HFB_1 y HFB_2 debidas a la elevada concentración en la que estas formas hidrolizadas se encontraban en las muestras de silo tras el proceso de hidrólisis, hicieron conveniente diluir los extractos en un factor 1:20 (v/v).

3.4.2. Optimización del método de extracción de fumonisinas "*modificadas*"

Los métodos de determinación de fumonisinas y de sus derivados hidrolizados en productos a base de maíz optimizados recientemente, extraían las formas hidrolizadas mediante el uso de disolventes como el acetonitrilo [45] o el acetato de etilo [22], sin necesidad de ninguna etapa de limpieza.

Se decidió evaluar el efecto de la temperatura y del uso de distintos extractantes en la extracción de las fumonisinas hidrolizadas en muestras de silo de maíz. Para ello, se llevaron a cabo estudios de recuperación utilizando acetato de etilo y acetonitrilo, a una temperatura de incubación de 25 y 70°C.

Ante la escasez del estándar de HFB_2, que debía ser sintetizado en laboratorio al no existir comercialmente, se decidió realizar el estudio de recuperación tan sólo de la HFB_1, esperando que el comportamiento de esta forma hidrolizada de FB_1 pudiera ser extrapolado al de HFB_2.

Tras someter varias muestras de silo blanco a tratamiento con metanol:agua (80:20; v/v) (extracción fumonisinas "*libres*"), los residuos sólidos generados fueron fortificados mediante la adición de distintos volúmenes de estándar de HFB_1 a dos niveles de concentración (1500 y 6000 µg kg^{-1}) y cada uno de ellos por triplicado.

Además, también se estudió el número de fracciones de fase orgánica que eran necesarios recoger para obtener un mejor rendimiento de recuperación. Con tal fin, la etapa de extracción fue repetida 3 veces con los dos extractantes en los experimentos anteriores y la recuperación de HFB_1 en cada una de las tres fases orgánicas recogidas evaluada.

En la siguiente figura aparecen representadas las recuperaciones medias obtenidas de la extracción con los dos disolventes y a las dos temperaturas estudiadas, recogiendo una, dos o tres fases orgánicas en cada caso:

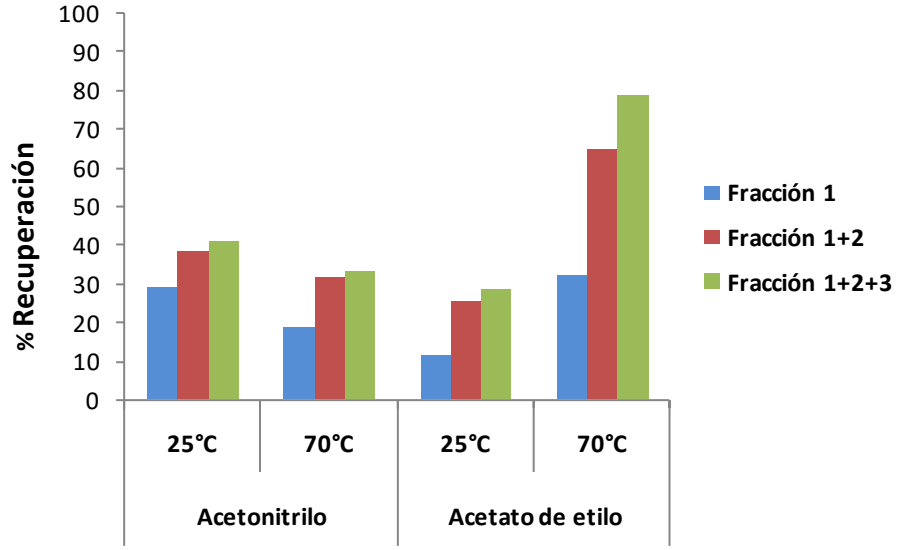


Figura IV.A.8. Valores de recuperación de la extracción de HFB_1 con distintos extractantes y a distintas temperaturas

Los tratamientos con acetonitrilo, además de no ser capaces de extraer más de un 42% para ninguna de las temperaturas de incubación, aun cuando se recogían tres 3 fracciones orgánicas, daban lugar a unas mezclas muy turbias en la que la separación entre fases era complicada.

Cuando el extractante empleado fue el acetato de etilo, el efecto de la temperatura fue decisivo. Así, la extracción se vio notablemente favorecida cuando la incubación se llevaba a cabo a alta temperatura, siendo la cantidad de HFB_1 recuperada a 70°C casi tres veces más que si se incubaba a 25°C.

En base a estos resultados, la extracción con acetato de etilo a 70°C fue seleccionada como la más adecuada, pues los experimentos realizados bajo estas condiciones mostraron un claro mayor porcentaje de recuperación de la HFB_1.

En relación al número de extracciones con acetato de etilo que deberían ser realizadas, se ha observado que, en la tercera fracción de fase orgánica recogida la HFB_1 todavía se

encontraba presente. Era al recoger y combinar las tres fracciones obtenidas cuando la recuperación alcanzaba el valor de casi el 80%, haciendo pues necesarias tres extracciones sucesivas con acetato de etilo.

En estudios recientes [46], las muestras de maíz eran totalmente hidrolizadas y las cantidades de fumonisinas "*modificadas*" determinadas como la diferencia entre el total de fumonisinas y las fumonisinas "*libres*". Por lo contrario, en el caso de las muestras de silo maíz que se estudian en esta Memoria, se proponía la determinación de las fumonisinas "*libres*" y "*modificadas*" separadamente, como ya habían sugerido los autores anteriores en otro de sus trabajos [22]. Así es que después de la extracción de las fumonisinas "*libres*", el residuo se sometía a una hidrólisis alcalina y las concentraciones de HFB_1 y HFB_2 eran determinadas.

Se decidió entonces estudiar las diferencias entre realizar las hidrólisis directamente en las muestras de silo de maíz, o bien sobre los residuos obtenidos tras una primera extracción de las fumonisinas "*libres*", en tres muestras de silo seleccionadas aleatoriamente.

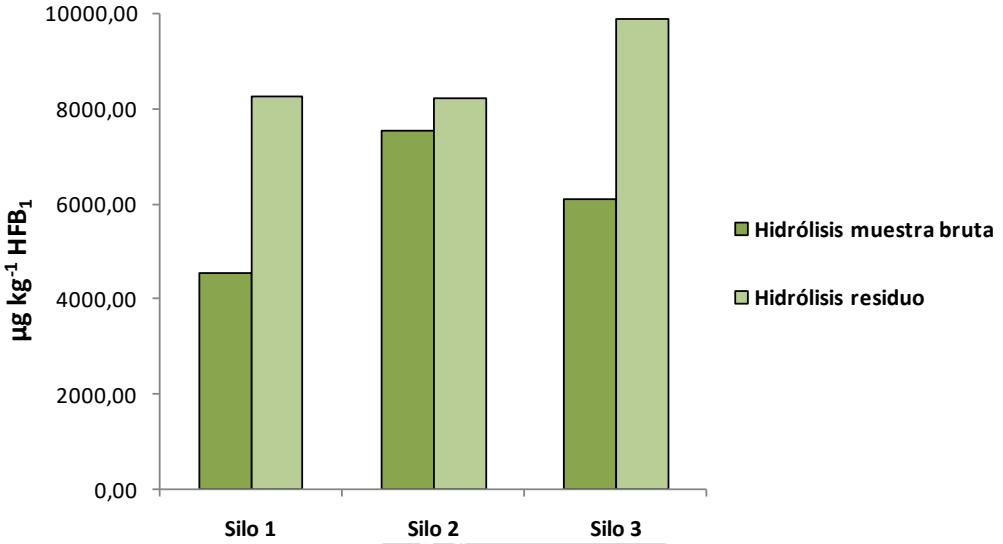


Figura IV.A.9. Representación de las concentraciones de HFB_1 en tres muestras de silo obtenidas a partir de hidrólisis directa en la muestra o a partir de la hidrólisis en el residuo

Las concentraciones de HFB_1 obtenidas con ambos procedimientos revelaron que la extracción de fumoninas "*modificadas*" resultó ser mucho más eficaz cuando el tratamiento alcalino era aplicado en el residuo, aumentando la concentración de HFB_1 extraída casi un 70% en comparación con la hidrólisis alcalina sobre la muestra bruta.

3.4.3. Parámetros de calidad del método de extracción de fumonisinas "*modificadas*"

Del mismo modo que para las fumonisinas "*libres*" y siguiendo las mismas directrices que las detalladas en el Apartado 2.3.2 de esta Sección, la linealidad, IDL, IQL, LOD y LOQ de HFB_1 y HFB_2 han sido evaluados a partir de cuatro rectas de calibración preparadas a diez niveles de concentración en el rango de 20-900 µg L^{-1}.

El análisis estadístico mediante el test F de Fisher y el test Q de Cochran a un nivel de confianza α=1%, han proporcionado resultados satisfactorios, de forma que se puede

afirmar que HFB_1 y HFB_2 se ajustan al modelo lineal, con coeficientes de determinación de 0,9925 y 0, 9952, respectivamente.

En la siguiente tabla se representa la linealidad, los valores de IDL y IQL referidos a muestra líquida (ug L^{-1}) y los LOQ y LOD referidos a la matriz (ug kg^{-1}) para las dos fumonisinas hidrolizadas:

Tabla IV.A.8. Linealidad, límites de detección y de cuantificación para el análisis de fumonisinas hidrolizadas

Micotoxina	Rango de linealidad	R^2	IDLs	IQLs	LODs	LOQs
	(ug L^{-1})	(1/X)*	(ug L^{-1})	(ug L^{-1})	(ug kg^{-1})	(ug kg^{-1})
HFB_1	20-900	0,9925	4,5	15,0	135	450
HFB_2	20-900	0,9952	4,8	16,2	144	486

*** (1/X): patrones de calibrado ponderados por la inversa del cuadrado de su cantidad**

Por otro lado, los extractos de silo obtenidos tras la hidrólisis eran diluidos 20 veces antes del análisis de HFB_1 y de HFB_2.

En estas condiciones, donde el porcentaje de matriz presente era tan bajo, los efectos de supresión o aumento de iones en la fuente de ionización por interferencias con la matriz no fueron significativos. Es debido a este hecho que se decidió trabajar con curvas de calibración estándar obtenidas a partir de diluciones del patrón de fumonisinas hidrolizadas en agua con 0,1% de ácido fórmico: acetonitrilo (70:30; v/v), sin que la matriz de silo estuviese presente.

La estimación relativa a la exactitud del método de extracción de HFB_1, se realizó a partir del fortificado por triplicado (n=3) de los residuos sólidos generados a partir de muestras de silo blanco, mediante la adición de distintos volúmenes de estándar de HFB_1 a dos niveles de concentración (1500 y 6000 µg kg^{-1}). Después de la hidrólisis alcalina y de tres sucesivas extracciones con acetato de etilo, los extractos obtenidos fueron diluidos 1/20 (v/v) y la recuperación calculada mediante la relación de la concentración de HFB_1 obtenida de los experimentos anteriores a partir de la curva de calibración con estándares y las concentraciones teóricas. El valor medio de la recuperación y su RSD resultaron ser de un 78,6% y 14,3%, respectivamente, porcentajes que se han estimado aceptables como para considerar adecuado el método de extracción de fumonisinas hidrolizadas propuesto. Como se ha explicado con anterioridad, este estudio de recuperación, solamente realizado para la HFB_1, ha sido extrapolado para HFB_2.

La repetibilidad (precisión intra-día) y la reproducibilidad (precisión inter-día) fueron evaluadas para las dos fumonisinas hidrolizadas.

La repetibilidad se estudió a partir del análisis de 2 extractos fortificados a dos niveles de concentración (1000 y 4000 µg kg^{-1}), realizado cuatro veces en un mismo día, siendo los valores obtenidos de 4.4 y 5.7% para la HFB_1 y HFB_2, respectivamente. Mientras que la evaluación de la reproducibilidad consistió en el análisis de 9 extractos fortificados a niveles de concentración en un rango entre 1000-9000 µg kg^{-1}durante seis días consecutivos, resultando una reproducibilidad de 8,4% para HFB_1 y 8,9% para HFB_2.

3.5. Incidencia y estabilidad de fumonisinas durante el proceso de ensilado en *silos de laboratorio*

El procedimiento de extracción de fumonisinas "*libres*" seguida de la extracción de las fumonisinas "*modificadas*" después de la hidrólisis alcalina de los residuos, se aplicó a un total de 124 muestras de maíz ensiladas en condiciones de laboratorio.

Las fumonisinas obtenidas después de la hidrólisis (HFB_1 y HFB_2) fueron expresadas como los equivalentes de FB_1 y FB_2, respectivamente, aplicado el factor de corrección debido a los diferentes pesos moleculares de las fumonisinas en su forma nativa y de las fumonisinas hidrolizadas.

Tabla IV.A.9. Factores de corrección utilizados para el cálculo de la concentración de FB_1 y FB_2 a partir de sus formas hidrolizadas

Peso molecular FB_1	**Peso molecular HFB_1**	**Factor de corrección**
g mol^{-1}		**1,78**
721,83	405,61	
Peso molecular FB_2	**Peso molecular HFB_2**	**Factor de corrección**
g mol^{-1}		**1,81**
705,83	389,61	

De este modo, se han obtenido concentraciones de FB_1 y FB_2 *"libres"* y *"modificadas"* además del "*total*" de FB_1 y FB_2, correspondiente a la suma de las anteriores ("*libre*" + " *modificada*"). Todos los resultados han sido corregidos con el contenido de humedad residual.

Las concentraciones de FB_1 y FB_2 *"libres"*, *"modificadas"* y "*total*" correspondientes a las muestras de este ensayo se presentan en los Anexos finales de esta Memoria de Tesis.

Para todas las muestras de silo analizadas, las concentraciones de FB_2 fueron siempre inferiores a las de FB_1, siendo la relación FB_2 / FB_1 resultante de aproximadamente un 0,3. Dicho valor ha resultado ser inferior al obtenido por otros autores [31], para los cuales la relación FB_2 / FB_1 en muestras de ensilado de maíz era de alrededor de un 0,5, esto es, una menor diferencia entre la cantidad de FB_2 y FB_1 encontrada en su estudio.

Para las dos fechas de cosecha, el efecto del uso de inoculantes (agua como control y *L. Buchneri* como inoculante) y del tiempo de ensilado (0, 60, 120, 240 días) sobre la concentración de fumonisinas fueron evaluados y los datos experimentales obtenidos analizados mediante análisis multifactorial ANOVA utilizando el software Statsgraphics.

La representación gráfica de las evoluciones de las dos fumonisinas en cada una de sus formas, *"libre", "modificada"* y *"total"* en las muestras de silo de laboratorio, para ambas fechas de cosecha y con los distintos tratamientos de inoculante, se muestra en la siguientes Figuras:

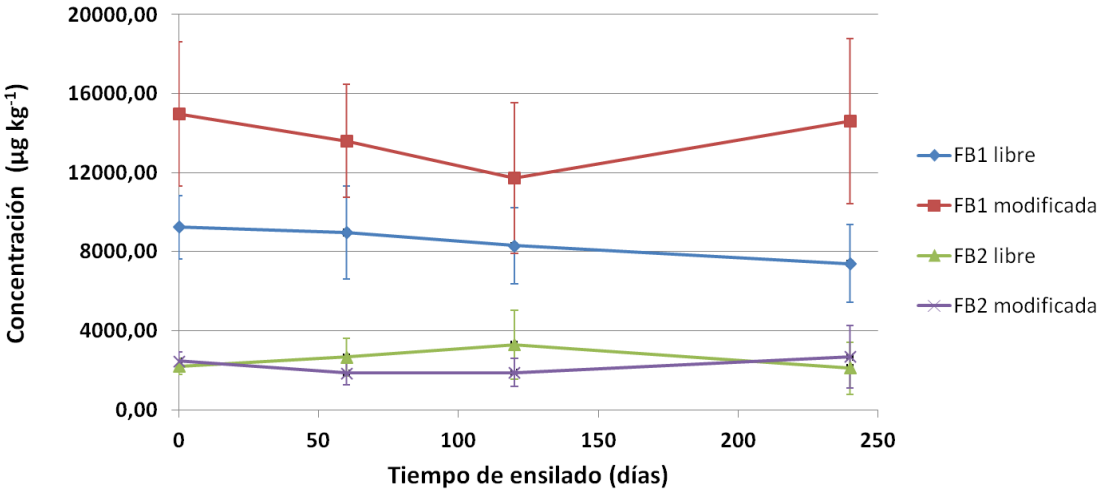


Figura IV.A.10. Evolución de la FB_1 y FB_2 *"libre"* y *"modificada"* en silos de laboratorios correspondientes a la 1ª cosecha y al tratamiento con agua (control)

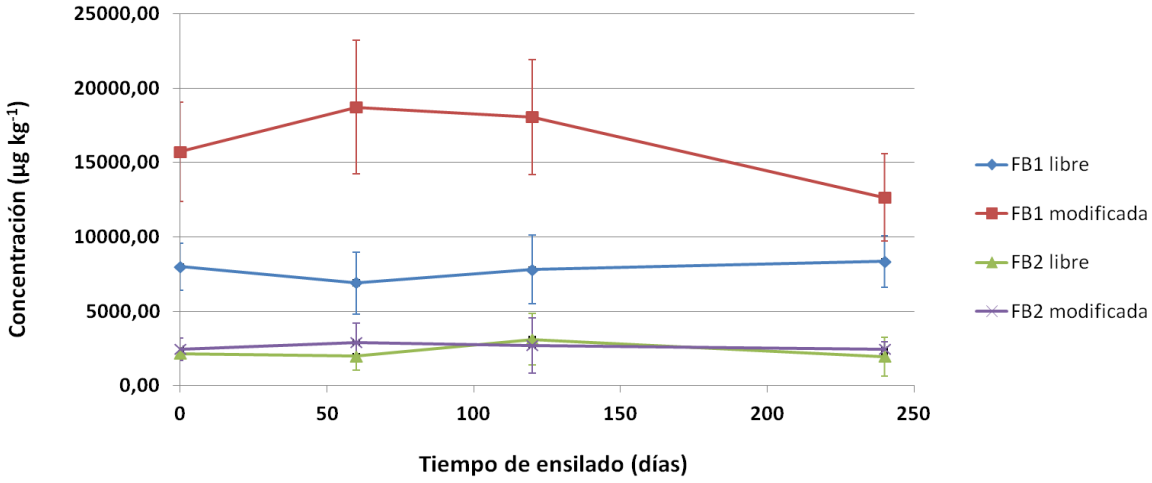


Figura IV.A.11. Evolución de la FB_1 y FB_2 *"libre"* y *"modificada"* en silos de laboratorio correspondientes a la 1ª cosecha y al tratamiento con *L. Buchneri*

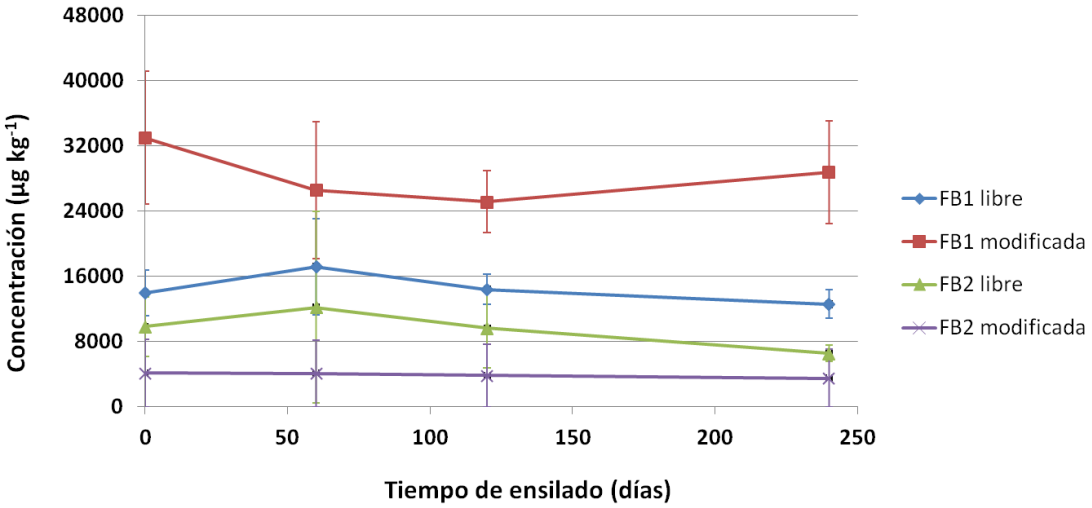


Figura IV.A.12. Evolución de la FB_1 y FB_2 *"libre"* y *"modificada"* en silos de laboratorios correspondientes a la 2ª cosecha y al tratamiento con agua (control)

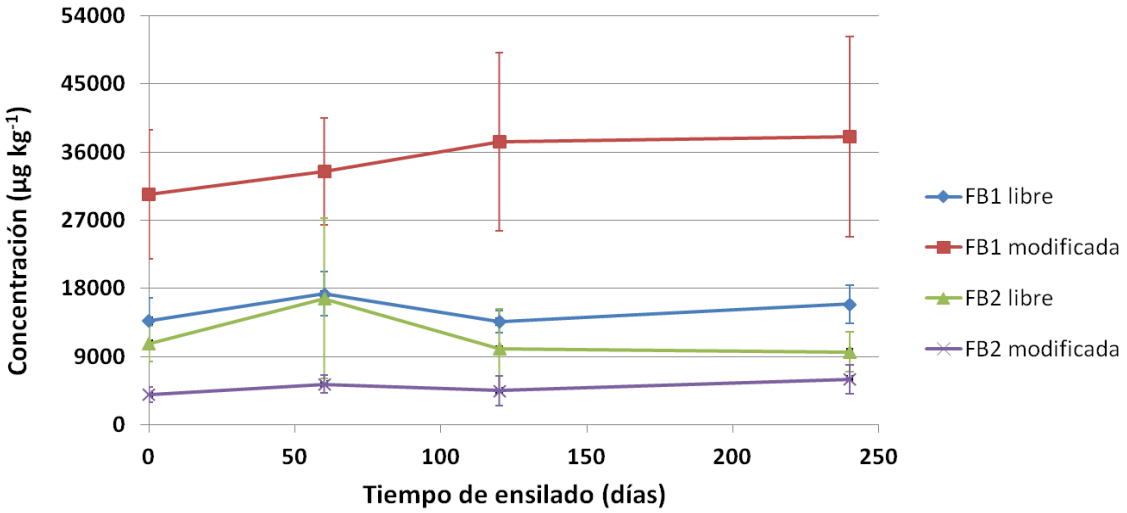


Figura IV.A.13. Evolución de la FB_1 y FB_2 *"libre"* y *"modificada"* en silos de laboratorio correspondientes a la 2ª cosecha y al tratamiento con *L. Buchneri*

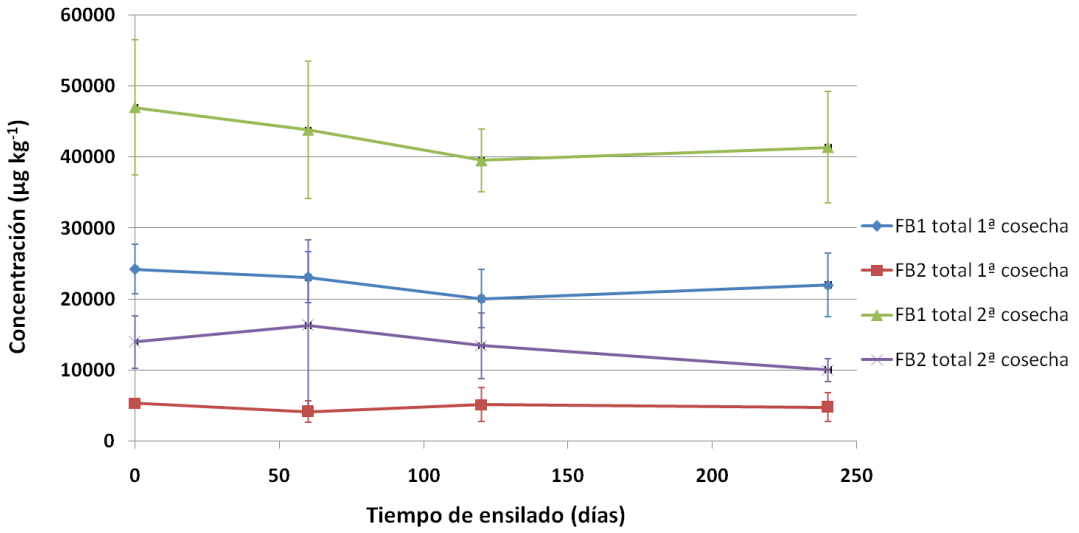


Figura IV.A.14. Evolución de la FB_1 y FB_2 *"total"* en silos de laboratorio correspondientes a las dos cosechas y al tratamiento con agua (control)

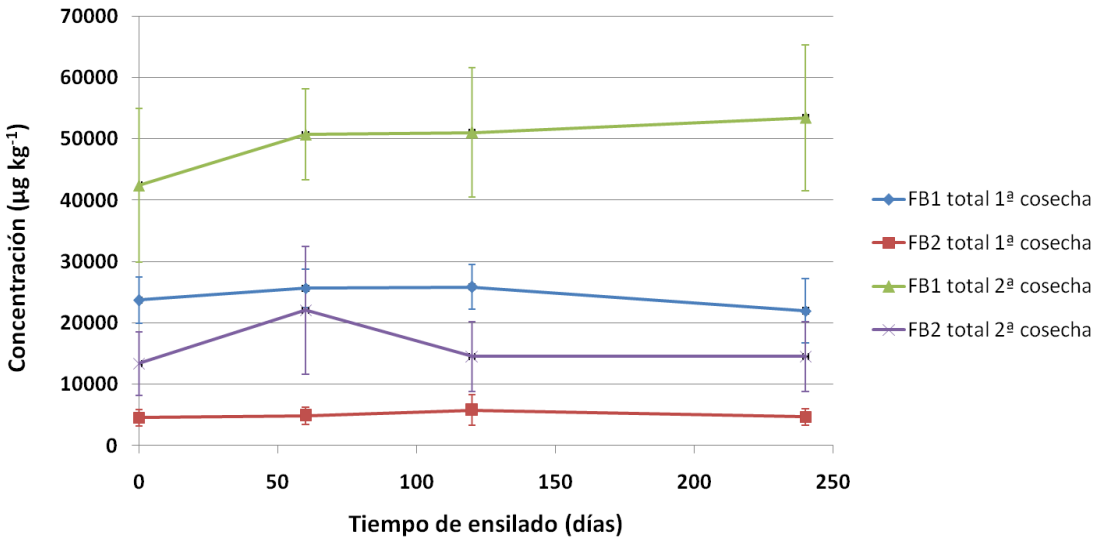


Figura IV.A.15. Evolución de la FB_1 y FB_2 *"total"* en silos de laboratorio correspondientes a las dos cosechas al tratamiento con *L. Buchneri*

Para las muestras correspondientes al maíz de la primera cosecha (9ª semana tras la floración femenina), el tiempo de ensilado no ha resultado ser un factor significativo para las fumonisinas en ninguna de sus formas. Como se puede observar en las gráficas anteriores, para esta primera cosecha, las concentraciones de FB_1 y de FB_2 "*libre*", "*modificada*" y "*total*", permanecían prácticamente constantes a largo del proceso de ensilado. Esto resultados fueron compatibles con aquellos publicados en anteriores estudios sobre la evolución de micotoxinas del *Fusarium,* incluyendo las fumonisinas, en muestras de silo de maíz durante el tiempo de almacenamiento [14,15].

Incluso cuando se añadieron hongos productores de micotoxinas durante el proceso de fermentación del silo, en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, los autores no observaron ningún aumento de los niveles de micotoxinas. Un hecho como este venía a

sugerir que las micotoxinas en su forma libre encontradas en muestras de silo de maíz eran producidas principalmente en la etapa de precosecha y no a lo largo del proceso de ensilado.

Por otro lado, el uso de *L. Buchneri* como inoculante sí ha demostrado ser un factor significativo (P <0,05), pero tan sólo para el "total" de la FB_1 y para la FB_1 en su forma "*modificada*" para la primera fecha de cosecha. Tal y como se puede apreciar en las figuras anteriores, las concentraciones de la FB_1 en estas dos formas, han aumentado para las muestras de ensilados de maíz tratados con *L. Buchneri*, mientras que para las muestras en las que se empleó agua cómo inoculante (muestras control), existía una muy pronunciada disminución de FB_1 "*total*" y "*modificada*" después de 240 días de ensilado.

A pesar de que el *L. Buchneri* es una bacteria herterofermentativa comúnmente utilizada como inoculante en los ensilados con el fin de mejorar la estabilidad aeróbica e inhibir el crecimiento de levaduras y hongos [47], se ha demostrado que este tipo de inoculantes no siempre tienen este efecto sobre las micotoxinas una vez que ya fueron sintetizadas [48]. Este hecho podría explicar lo ocurrido con las muestras de silo de laboratorio tratadas con *L. Buchneri,* correspondientes a la primera cosecha, que se estudian en esta Sección.

En la segunda fecha de cosecha (14 semanas después de la floración femenina), el tiempo de ensilado ha resultado ser un factor significativo (P <0,05) en la evolución de las formas "*libres*" de la FB_1 y de la FB_2, pero no para las fumonisinas "*modificadas*" y "*totales*". De este modo, la estabilidad general de la FB1 no ha demostrado estar afectada por el tiempo de almacenamiento del ensilado.

Además, al igual que ocurría con las muestras correspondientes a la primera cosecha, el uso de inoculante resultó ser un factor significativo (P <0,05) para las cantidades de FB_1 "*modificada*" y "*total*", pero no para su forma "*libre*".

Por otra parte, el contenido total de FB_2 mostró un porcentaje de disminución de aproximadamente un 38% en aquellos silos de laboratorio abiertos a los 240 días de ensilado y que no habían sido tratados con inoculante *L. Buchneri*. Un comportamiento diferente fue en cambio observado para las muestras que contenían la bacteria *L. Buchneri* (Figura IV.A.15), para las cuales el contenido total de FB_2 aumentaba en aproximadamente un 40% después de 60 días de almacenamiento, volviendo prácticamente a su concentración inicial para los tiempos de ensilado más largos (120 y 140 días).

Estos resultados no correspondían con aquellos publicados por Boudra y Morgavi [9], los cuales informaban sobre una disminución del nivel de toxinas del *Fusarium* como la FB_1 o como el deoxinivalenol en muestras de silos de laboratorio, sobre todo en los tres primeros meses de almacenamiento. Sin embargo, para las mismas muestras, las cantidades de FB_2 y zearelanona mostraban una mayor estabilidad a lo largo del proceso de ensilado. Según estos autores, la materia seca del ensilado afectaba a la estabilidad de las micotoxinas durante el tiempo de almacenamiento, observando una mayor tasa de desaparición de las micotoxinas para aquellas muestras de silo con bajo contenido en materia seca.

3.5.1. Presencia de fumonisinas *"modificadas"* en silos de laboratorio

La presencia de fumonisinas *en* sus formas modificadas ha sido evaluada para todas las muestras de silo de maíz analizadas (n=124) en este ensayo. En particular, se ha observado

que, para todas estas muestras, la cantidad de fumonisinas liberadas después de realizar la hidrólisis alcalina era incluso superior a la cantidad de fumonisinas en sus formas *"libres*".

La relación entre las cantidades de fumonisinas *"modificadas"* y fumonisinas *"totales"* (*"libres"* + *"modificadas"*) permitió calcular el porcentaje de "enmascaramiento" en las muestras de silos de laboratorio, confirmándose que las fumonisinas en sus formas modificadas representaban un 65% para la FB_1 y un 39% para la FB_2.

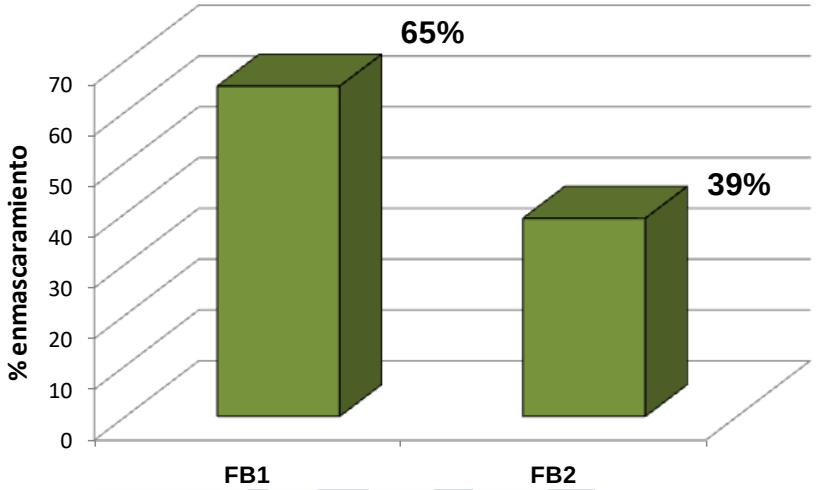


Figura IV.A.16. Porcentaje de "enmascaramiento" de las fumonisinas observado en el ensayo llevado a cabo con de silos de laboratorio

Estos porcentajes de "enmascaramiento" destacaron la importancia de estudiar estas fumonisinas "no extraíbles" en las muestras de silo de maíz. La no cuantificación de las mismas podría conducir a una subestimación de la concentración real de las fumonisinas presentes en las muestras y, en consecuencia, a una errónea evaluación de la toxicidad del ensilaje.

3.5.2. Estudio de la estabilidad aeróbica

La incidencia y la estabilidad de las fumonisinas en sus formas *"libres"* y *"modificadas"* y "*total*" en los silos de laboratorio bajo deterioro aeróbico también han sido evaluadas. Transcurridos los 7 días en el que dichas muestras fueron mantenidas a una temperatura de 20°C y expuestas al aire, se observó un gran crecimiento de hongos consecuencia del deterioro aeróbico.

Bajo estas condiciones experimentales, un total de 48 muestras de silo de maíz procedentes de las dos fechas de cosecha y representantes de los dos tratamientos con inoculante (agua y *L. Buchneri)* y de los tiempos de ensilado (60, 120, 240 días) fueron aleatoriamente seleccionadas y las concentraciones de FB_1 y de FB_2 calculadas.

Las concentraciones de FB_1 y FB_2 *"libres"*, *"modificadas"* y "*total*" obtenidas de este estudio se presentan en los Anexos finales de esta Memoria de Tesis.

Los datos experimentales obtenidos han sido analizados mediante análisis multifactorial ANOVA utilizando el software Statsgraphics y representados mediante gráficos de medias basados en el procedimiento Diferencia menos significativa (LSD). Este tipo de gráficos constituyen un intervalo de confianza para cada par de medias al nivel de confianza 95%, usando la distribución t de Student y en ellos, la magnitud de los límites indica la menor

diferencia entre las dos medias reales que puedan representar una diferencia estadísticamente significativa.

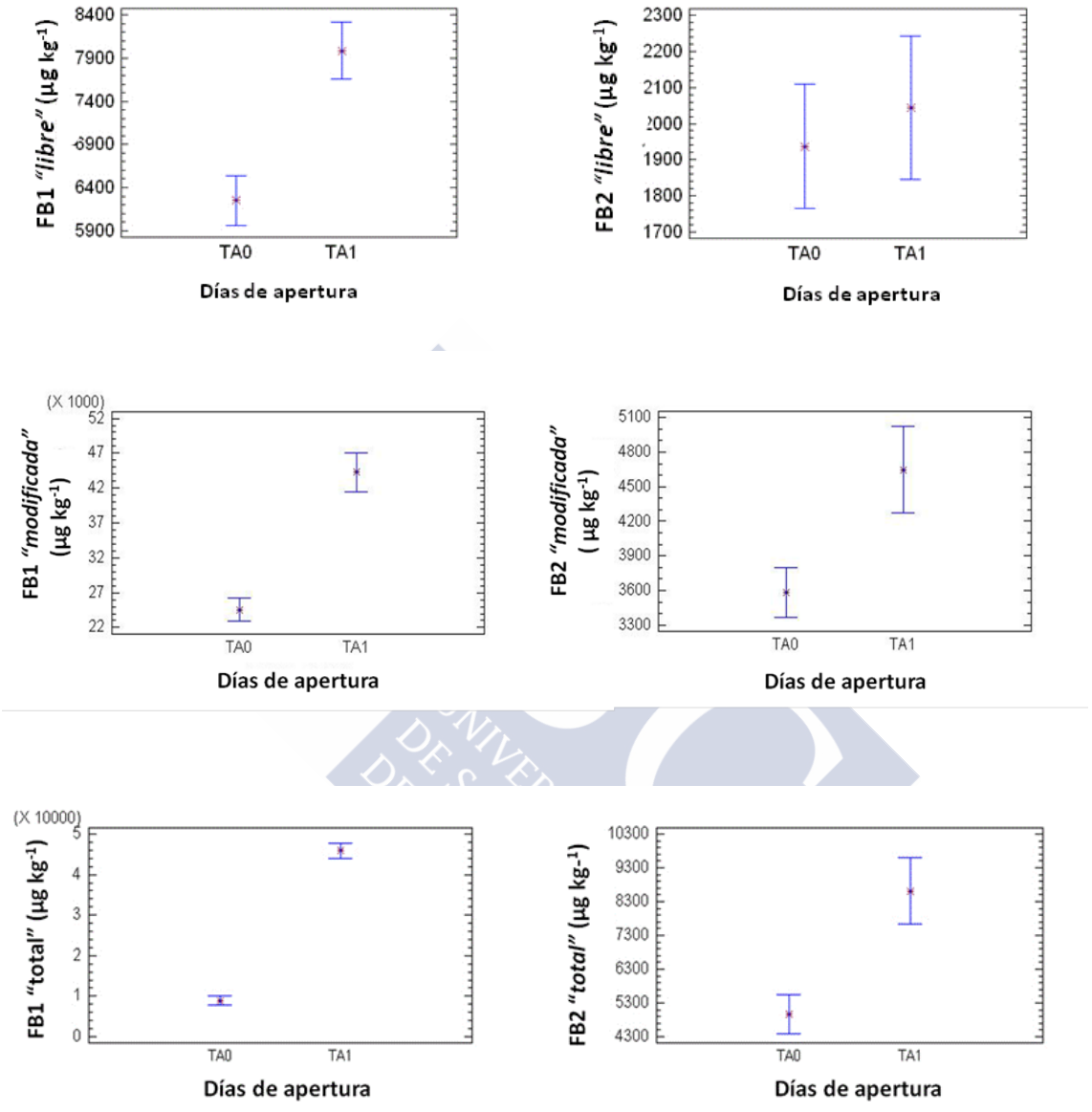


Figura IV.A.17. **Gráficos de medias LSD correspondientes a fumonisinas *"totales"* en muestras de silos de laboratorio bajo condiciones aeróbicas (7 días, 20°C)**

A continuación se presentan los gráficos LSD para FB_1 y FB_2 "*libre*", "*modificada*" y "*total*" para las muestras de silos de laboratorios sometidos a condiciones aeróbicas (7 días, 20°C):

El par de intervalos representado (*TA0: sin deterioro aeróbico; TA1: con deterioro aeróbico*) en cada uno los gráficos anteriores, indica si existe una diferencia significativa entre las medias al nivel de confianza seleccionado.

De este modo se pudo confirmar que las condiciones aeróbicas tenían una influencia significativa sobre las cantidades de FB1 y FB2 *"modificada"* y *"total",* mostrando, en todos los casos, niveles más altos que para las muestras de silo no expuestas al aire. En cambio, para las formas "*libres*" de las fumonisinas, sólo un ligero aumento de las concentraciones que observado tras el deterioro aeróbico de las muestras.

Por otra parte, la evaluación del porcentaje de "enmascaramiento" en los silos de laboratorio, permitió confirmar que el 75% y el 45 % de la concentración total de FB_1 y FB_2, respectivamente, era debido a sus formas modificadas. Este experimento ha sugerido por lo tanto, que la existencia de fumonisinas "*modificadas*" en muestras de silo de maíz en condiciones aeróbicas era mayor que en aquellas que no habían sido expuestas al aire.

3.6. Incidencia y estabilidad de fumonisinas durante el proceso de ensilado en *silos convencionales*

Se ha llevado a cabo la extracción de las fumonisinas en su forma libre (FB_1 y FB_2) seguida de una hidrólisis alcalina de los residuos para la liberación de los derivados hidrolizados (HFB_1 y HFB_2), en las 128 muestras de maíz fresco y ensilado procedentes de los 32 sacos distribuidos en el silo trinchera. A continuación, las fumonisinas fueron detectadas y cuantificadas por LC-HESI-MS/MS.

Basándose en el uso de factores de corrección, tal y como se ha realizado en el ensayo de silos de laboratorio (Apartado 3.5 de la presente Sección), se han obtenido concentraciones de FB_1 y FB_2 a partir de sus formas hidrolizadas (fumonisinas "*modificadas*"). Los valores de concentración de FB_1 y FB_2 que se recogen a en la siguiente tabla corresponden a la suma de estas fumonisinas "*modificadas*" y de las fumonisinas "*libres*".

Comparando las concentraciones de ambas micotoxinas en el maíz fresco y en el maíz ensilado en sacos (Tabla IV.A.10), los resultados obtenidos han revelado un acusado descenso en las concentraciones de FB_1 para los sacos situados en la parte más baja del silo (inferior). Esta tasa de disminución ha sido más pronunciada en la sección final alcanzado un 82% frente a un 63% para los sacos correspondientes a la sección inicial del silo.

En cambio, un comportamiento diferente se ha observado para la FB_2 en esa altura inferior del silo trinchera, donde tan solo un ligero descenso ha sido percibido en la sección del final (18%) y manteniéndose su concentración prácticamente constante en la parte inicial.

A la altura superior del silo, el análisis de los datos ha demostrado que tanto para FB_1 como FB_2 los contenidos apenas han variado desde el maíz es su estado fresco hasta el ensilado en sacos en el silo trinchera.

Tabla IV.A.10. Concentraciones medias de fumonisinas calculadas para las 128 de muestras de maíz fresco y ensilado procedentes de los 32 sacos colocados a dos alturas y en dos secciones del silo trinchera

	FB_1 total		**FB_2 total**		**altura/sección**	
	concentración	RSD	concentración	RSD		
	(ug kg-1)		**(ug kg-1)**			
maíz fresco (n=64)	9569,1	2954,5	1911,5	638,2	*inferior*	*final*
	7409,1	3166,7	1490,9	507,0	*inferior*	*inicial*
	10082,3	3962,8	2204,1	1017,6	*superior*	*final*
	7195,2	3686,0	1751,4	843,0	*superior*	*inicial*
	FB_1 total		**FB_2 total**		**altura/sección**	
	concentración	RSD	concentración	RSD		
	(ug kg-1)		**(ug kg-1)**			
maíz ensilado (n=64)	1749,3	1006,9	1569,9	675,0	*inferior*	*final*
	2752,9	2432,6	1696,4	857,0	*inferior*	*inicial*
	10407,1	4414,9	2821,5	871,2	*superior*	*final*
	8546,7	4494,6	2365,3	942,6	*superior*	*incial*

Con este ensayo se pretendía estudiar la evolución del contenido de fumonisinas a dos niveles de altura de un silo trinchera y en dos momentos de muestreo (sección inicial y sección final de silo). El análisis total de aquellas muestras correspondientes al maíz ensilado en sacos (n=64) y repartidos a lo largo del silo trinchera, ha revelado que la única variable significativa sobre los contenidos en fumonisinas era la altura a la que se encontraban los sacos.

Aquellas muestras de silo de maíz correspondientes a los sacos situados en la parte más alta del silo presentaron una concentración media de 9477 µg kg^{-1} para FB_1 y de 2593 µg kg^{-1} para FB_2 frente a los 2251 µg kg^{-1} para FB_1 y de 1633 µg kg^{-1} para FB_2 que se obtuvieron en la capa más baja. Este aumento ha sido especialmente notable para la FB1, cuyo contenido se ha visto incrementado hasta en un 76% en las capas más superficiales del silo.

Esto podría verse explicado por el hecho de que los recuentos de colonias de hongos de totales y levaduras son mayores en las capas superiores de los silos, capas que a su vez están menos compactadas y más expuestas a posibles infiltraciones de aire. Todo ello contribuye a que el riesgo de contaminación por micotoxinas sea presumiblemente mayor [49].

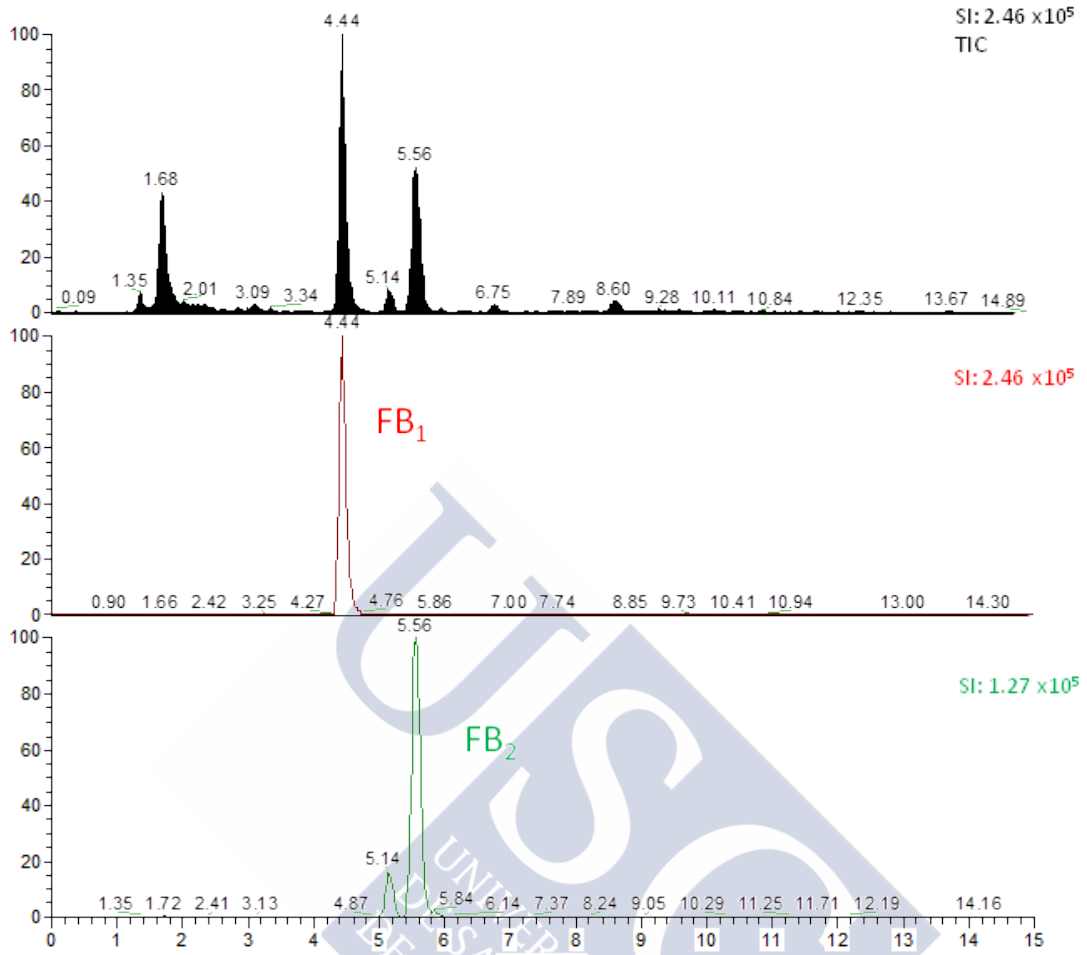


Figura IV.A.18. Señales cromatográficas obtenidas para la FB_1 y FB_2 tras el análisis de una muestra de ensilado de maíz extraída del silo trinchera con un factor de dilución 1:5

3.6.1. Presencia de fumonisinas *"modificadas"* en silos convencionales

Con el objetivo de conocer el porcentaje de fumonisinas en sus formas modificadas, la relación entre las cantidades de fumonisinas *"modificadas"* y las fumonisinas *"totales"* (*"libres"* + *"modificadas"*) ha sido evaluada para las muestras del presente ensayo (n=128).

Tal y como ocurría en el ensayo anterior, aquel que estudiaba los silos en condiciones de laboratorio, la cantidad de fumonisinas liberadas tras la hidrólisis de los residuos era muy superior a la cantidad de fumonisinas en sus formas nativas. Incluso para el caso particular de este ensayo, los porcentajes de enmascaramiento eran superiores, confirmándose que un 79% y 69% del contenido total de FB_1 y de FB_2, respectivamente, procedían de las formas modificadas.

Una vez más, estos altos porcentajes de "enmascaramiento", realzan la necesidad de cuantificar las *"fumonisinas modificadas"*, pues la no inclusión de las mismas llevaría a una clara subestimación de las concentraciones de fumonisinas en muestras de maíz y de silo de maíz.

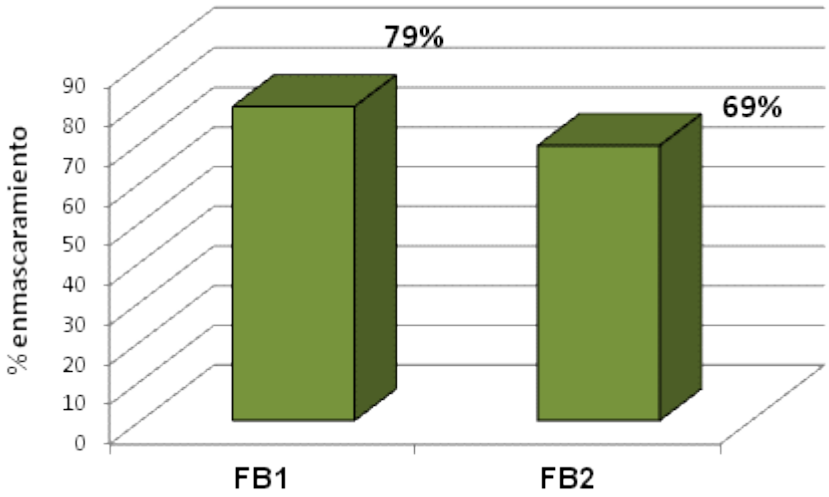


Figura IV.A.19. Porcentaje de "enmascaramiento" de las fumonisinas observado en el ensayo llevado a cabo con silos trinchera

4. BIBLIOGRAFÍA

[1] Dunière, L. ; Sindou, J. ; Chaucheyras-Durand, F. ; Chevallier, I. ;Thévenot-Sergentet, D.; Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms; *Anim. Feed .Sci. Tech*., 182, **2013**, 1-15.

[2] Garon, D.; Richard, E.; Sage, l.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P.; 2006 Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study; *J. Agric. Food Chem.;* 54, **2006**, 3479-3484.

[3] Richard, E.; Heutte, N.; Sage, L.; Pottier, D.; Bouchart, V.; Lebailly, P.; Garon, D.; Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage; *Food Chem. Toxicol.*; 45, **2007**, 2420-2425.

[4] Keller, L.A.M.; González Pereyra, M.L.; Keller, K.M.; Alonso, V.A.; Oliveira, A.A.; Almeida, T.X.; Barbosa, T.S.; Nunes, L.M.T.; Cavaglieri, L.R.; Rosa, C.A.R.; Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation; *J. Stored Prod. Res*.; 52, **2013**, 42-47.

[5] Cheli, F.; Campagnoli, A.; Dell´Orto V.; Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis; *Anim. Feed .Sci. Tech.*; 183, **2013**, 1-16.

[6] Shephard, G. S.; Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins ; *J. Chromatogr. A*.; 815, **1998**, 31–39.

[7] Krska,R.; Welzig,E.; Boudra,H; Analysis of *Fusarium* toxins in feed**;** *Anim. Feed .Sci. Tech*.; 137, **2007**, 241-264.

[8] Gonzalez Pereyra, M.L.; Alonso, V.A.; Sager, R.; Morlaco, M.B.; Magnoli, C.E.; Astoreca, A.L.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R.; Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage; *J. Appl. Microbiol.*; 104, **2008**, 1034-1041.

[9] Boudra, H.; Morgavi, D.P.; Reduction in *Fusarium* toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time; *J. Agric. Food Chem.;* 56, **2008**, 4523-4528.

[10] Storm, I.M.L.D.; Sørensen, J.L.; Rasmussen, R.R.; Nielsen, K.F.; Thrane, U.; Mycotoxins in silage; *Stewart Postharvest Rev*.; 4, **2008**, 1–12.

[11] Styriak, I.; Conkov E.; Microbial binding and biodegradation of mycotoxins; *Vet. Hum. Toxicol*.; 44, **2002**,358–361.

[12] Niderkorn, V.; Morgavi, D.P.; Pujos, E.; Tissandier, A.; Boudra, H.; Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenona and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model; *Food Addit. Contam*.; 24, **2007**, 406-415.

[13] Auerbach, H.; Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions; **2006;** En: http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mould-growth-mycotoxin-contamination-t219/p0.htm (Consulta: 22-01-2015).

[14] Uegaki, R.; Tsukiboshi, T.; Tohno, M; Changes in the concentrations of fumonisin, deoxynivalenol and zearalenone in corn silage during ensilage; *Animal Science Journal*; 84, **2013**, 656–662.

[15] Mansfield, M.A.; Archibald, D.D.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A.; Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices; *Phytopathology;* 93, **2007**, 504-510.

[16] Voss, K. A.; Smith, G. W.; Haschek, W. M.; Fumonisins: Toxicokinetics,mechanism of action and toxicity; *Anim. Feed .Sci. Tech*., 137, **2007**, 299–325.

[17] Joany, J-P.; Diaz, D.E.; Effects of mycotoxins in ruminants. En: "The Mycotoxin Blue Book"; Diaz, D.E.; Ed. Nottingham University Press, **2005**, 295–321.

[18] Recomendación de la Comisión del 17 de agosto de 2006 (2006/576/CE), sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal; DO L 229, **2006**, 7-9.

[19] Berthiller, F.; Crews, C.; Dall'Asta, C.; Saeger, S. D.; Haesaert, G.; Karlovsky, P.; Oswald, I.P.; Seefelder, W.; Speijers, G.; Stroka, J.; Masked mycotoxins: A review; *Mol. Nutr. Food Res*.; 57, **2013**, 165–186.

[20] Humpf, H. U.; Voss, K. A.; Effects of thermal food processing on thechemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res*.; 48, **2004**, 255–269.

[21] Dall'Asta, C.; Mangia, M.; Berthiller, F.; Molinelli, A.; Sulyok, M.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R.; Difficulties in fumonisin determination: The issue of hidden fumonisins; *Anal. Bioanal. Chem*.; 395, **2009**, 1335–1345.

[22] Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Aureli, G.; Dossena, A.; Marchelli, R.A.; LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products; *World Mycotoxin J.*; 1, **2008**, 237-246.

[23] Cirlini, M.; Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins; *J. Chromatogr. A*; 1255, **2012**, 145-152.

[24] Park, J.W.; Scott, P.M.; Lau, B.P.; Lewis, D.A.; Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins; *Food Addit. Contam*.; 21, **200**4, 1168-1178.

[25] Seefelder, W.; Knech, A., Humpf, H. U.; Bound fumonisin B1: Analysis of fumonisin-B1 glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry; *J. Agr. Food Chem*.; 51, **2003**, 5567–5573.

[26] Bryła, M.; Roszko, M.; Szymczyk ,K.; Jędrzejczak, R.; Obiedziński , M.W.; Fumonisins and their masked forms in maize products; *Food Control*; 59, **2016**, 619-627.

[27] Dall'Asta, C.; Falavigna, C.; Galaverna, G.; Battilani, P.; Role of maize hybrids and their chemical composition in Fusarium infection and fumonisin production; *J. Agr. Food Chem*.; 60, **2012**, 3800–3808.

[28] Falavigna, C.; Lazzaro, I.; Galaverna, G.; Battilani, P.; Dall'Asta, C.; Fatty acid esters of fumonisins: First evidence of their presence in maize; *Food Addit. Contam.*; 30, **2013**, 1606–1613.

[29] Rychlik, M.; Humpf H-U.; Marko, D.; Dänicke, S.; Mally, A.; Berthiller, F.; Klaffke, H.; Lorenz, N.; Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins; *Mycotoxins Rech.;* 30, **2014**, 197–205.

[30] Scientific Opinion on the risk for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed; *The EFSA Journal;* 12(12):3916, **2014**, 1-107.

[31] Dall'Asta, C.; Falavigna, C.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R.; In vitro digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize; *J. Agr. Food Chem*.; 58, **2010**, 12042–12047.

[32] Ren, Y.; Zhang, Y., Han, S.; Han, Z.; Wu, Y.; Simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 contaminants in maize by ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; *Anal. Chim. Acta* 692, **2011**, 138–145.

[33] Dilkin, P.; Mallmann, C.A.; De Almeida, C.A.A.; Corrêa, B.; Robotic automated clean-up for detection of fumonisins B_1 and B_2 in corn and corn-based feed by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr. A*; 925 **2001**, 151-157.

[34] Kim, E.; Maragos, C. M.; & Kendra, D. F.; Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn silage *J. Agr. Food Chem*.; 52, **2004**, 196–200.

[35] Rubert, J.; Fapohunda, S.O.; Soluer, C.; Ezekiel, C.N.; Mañes, J.; Kayode, F.; A survey of mycotoxins in random street-vended snacks from Lagos, Nigeria, using QuEChERS-HPLC-MS/MS; *Food Control*; 32, **2013**, 673-677.

[36] Senyuva, H.Z.; Gilbert, J.; Stroka, J.; Biselli, S.; De Girolamo, A.; De Rijk, T.; De Saeger, S.; Köppen, R.; MacDonald, S.; Neumann, G.; Patel, S.; Seefelder, W.; Tibet, U.; Trucksess, M.W.; van Osenbruggen, W.A.; Zachariásová, M.; Determination of fumonisins FB1 and FB2 in corn by LC/MS with inmunoaffinity column cleanup: interlaboratory study; *J. AOAC. Int.*; 93, **2010**, 611-621.

[37] Falavigna, C.; Cirlini, M.; Galaverna, G.; Sforza, S.; Dossena, A.; Dall'Asta, C.; LC/ESI-MS/MS analysis outlines the different fumonisin patterns produced by F.verticillioides in culture media and in maize kernels; *J. Mass Spectrom*.; 47, **2012**, 1170–1176

[38] Kim, E.K.; Scott, P.M.; Lau, B.P.; Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Addit. Contam*.; 20, 2003, 161-169.

[39] Motta, E.L.; Scott, P.M.; Effect of in vitro digestion on fumonisin B1 in corn flakes; *Mycotoxin. Res*.; 23, **2007**, 166-172.

[40] Motta, E.L.; Scott, P.M.; Bioaccessibility of total bound fumonisin from corn flakes; *Mycotoxin. Res*.; 25, **2009**, 229-232.

[41] Lattanzio,V.M.T.; Solfrizzo,M.; Powers,S.; Visconti,A.; Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup; *Rapid Commun. Mass Spectrom*; 21, **2007**, 13253-13261.

[42] Sulyok ,M; Berthiller, F; Krska, R; Schuhmacher, R; 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, **2006**, 2649-2659.

[43] D`arco ,G; Fernández-Franzón, M; Font, G; Damiani, P; Mañes, J.; Analysis of fumonisins FB_1, FB_2 and FB_3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromagtography/tandem mass spectrometric; *J. Chromatogr. A*; 1209, 2008, 188-194.

[44] European Commission. 2002. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; *Off. J. Eur. Union*; L221, **2002**, 8-36.

[45] Mangia, M.; Free and hidden fumonisins in maize and gluten-free products; Tesis doctoral; Facultad de Agricultura; Universidad de Parma; **2009**.

[46] Dall'Asta, C.; Falavigna, C.; Galaverna, G.; Battilani, P.; Role of maize hybrids and their chemical composition in Fusarium infection and fumonisin Production; *J. Agr. Food Chem*.; 60, **2012**, 3800–3808.

[47] Driehuis, F.; Elferink, S. J.; Spoelstra, S. F; Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus Buchner*i inhibits yeast growth and improves aerobic stability; *J. Appl. Microbiol.*, 87, **1999**, 583–594.

[48] Binder, E. M.; Managing the risk of mycotoxins in modern feed production; *Anim. Feed Sci. Tech*.; 133, **2007**, 149–166.

[49] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Castro, P.; Pereira, S.; Calidad higiénica de piensos, leche y ensilados de hierba y de maíz em explotaciones lecheras de Galicia; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba; 36, **2008**, 337-346.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV.B. INCIDENCIA Y ESTABILIDAD DE DEOXINIVALENOL Y ZEARALENONA EN ENSILADOS DE MAÍZ EN SILOS DE DE LABORATORIO Y EN SILOS CONVENCIONALES

Este segundo estudio relativo a la incidencia y estabilidad de micotoxinas del género *Fusarium* en ensilados de maíz, ha seguido el mismo plan de trabajo y diseño que el planteado en la Sección anterior.

En este caso, el trabajo se centraba en el estudio de la evolución del contenido de deoxinivalenol y zearalenona durante el proceso de ensilado en muestras *de silo de laboratorio* y en muestras de *silos convencionales*, incluido también en el proyecto de investigación titulado *"Incidencia y estabilidad de aflatoxinas y micotoxinas del género Fusarium en ensilados de maíz. Diagnóstico en explotaciones ganaderas y estudio experimental"*.

Parte de la investigación en lo tocante a la metodología analítica, ha sido desarrollada en *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari* (ISPA), *Consiglio Nazionale delle Ricerche* (CNR) en Bari (Italia) durante un período de tres meses en el año 2012.

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium* como el deoxinivalenol y la zearalenona, pueden ser originadas en el campo durante la etapa previa a la cosecha y, a continuación, estar presentes en el ensilaje [1]. De hecho, un 56% del total de DON y un 51% del total de ZEA ingerido por el ganado a través de la dieta, es suministrado por concentrados y por ensilados de maíz [2].

El deoxinivalenol (DON), también conocido como vomitoxina, es la micotoxina más importante de la familia de los tricotecenos tipo B, producida principalmente por el *F. graminearum* y el *F. culmorum* [3, 4]. Se trata de un compuesto polar, de bajo peso molecular, soluble en agua y en disolventes polares como el metanol y el acetonitrilo [4]. Debido a su elevada prevalencia en los cultivos de cereales de toda Europa, el DON ha sido considerado como el principal indicador de la contaminación con otras micotoxinas del *Fusarium* [5].

Desde el punto de vista toxicológico, el DON se ha asociado a problemas reproductivos, rechazo de alimento, diarrea e incluso la muerte en animales no rumiantes. En el caso del ganado lechero, el DON puede reducir la ingesta de alimento y, en consecuencia, disminuir la producción de leche [6].

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina estrogénica no esteroidea, también producida por especies del *Fusarium* tales como el *F. graminearum* y el *F. culmorum.* Es una de las micotoxinas más ampliamente distribuidas y encontrada a menudo en altas concentraciones, especialmente en maíz [7].

A pesar de que es producida normalmente en el campo, la ZEA también puede ser originada en condiciones de almacenamiento con mucha humedad [5].

En lo referente a la salud animal, la ZEA y sus metabolitos han sido relacionados con alteraciones en el aparato reproductor y la disminución de la fertilidad [5].

Como ya se ha destacado con anterioridad, es frecuente la aparición simultánea de varias micotoxinas en un mismo alimento. De este modo, existen trabajos realizados en muestras de silo de maíz donde la coexistencia de DON y de sus derivados acetilados (15-acetildeoxinivalenol) y de la ZEA ha sido observada [2, 8].

En silos de laboratorio, el proceso de ensilado ha parecido presentar cierta disminución en micotoxinas del *Fusarium* como el DON y ZEA [1]. En cambio, en muestras de silos convencionales distintos resultados acerca de la evolución de estas dos micotoxinas han sido encontrados. Mientras para algunos autores no existía variación en el contenido de DON [9, 10] y ZEA [9, 11, 12], son otros los que observaban un aumento en la concentración de dichas toxinas [10, 12].

Debido a la alta frecuencia con la que los alimentos destinados a consumo animal presentan contaminación con micotoxinas, varias instituciones y organizaciones internacionales como la Comisión Europea (CE), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU (FDA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) de las Naciones Unidas, han adoptado una serie de normas para limitar laos niveles máximos de micotoxinas en los alimentos para animales [13]. Recientemente, la Unión Europea (UE) ha mostrado gran interés en micotoxinas producidas por especies del *Fusarium* y ha recomendado valores de referencia para los contenidos de DON y ZEA en productos destinados a alimentación animal [14]. En el caso del maíz y de sus productos derivados, estos valores se han fijado en 12 mg/kg para el DON y en 3 mg/kg para la ZEA. Además, dados los efectos toxicológicos, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha recomendando el desarrollo de métodos analíticos adecuados y fiables para la detección de DON y ZEA en alimentos para animales [15, 16], necesarios para cumplir con la normativa Europea [17].

Varios métodos analíticos para la determinación simultánea de micotoxinas en ensilados de maíz basados en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) han sido descritos y publicados por varios autores [1, 8, 9, 18-20].

Debido a la complejidad que los piensos y los ensilados implican como matriz analítica, han sido muchos los trabajos que han preferido una etapa de limpieza previa para el análisis de toxinas del *Fusarium* por LC-MS/MS [13].

Procedimientos de limpieza basados en una extracción en fase sólida (SPE) seguidos del análisis por LC-MS/MS han sido utilizados con anterioridad para la determinación de varias micotoxinas en muestras de ensilado de maíz [9, 20, 21].

Además, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por ultravioleta (UV) y por fluorescencia (FLD) puede ser utilizada en el análisis de varias micotoxinas en una gran variedad de matrices [22], siendo varios los métodos ya publicados para la determinación de tricotecenos por HPLC-UV en productos destinados a la alimentación animal [13, 23].

Micotoxinas con presencia de grupos fluoróforos como es el caso de la ZEA pueden ser analizadas por HPLC-FLD [24].

El objetivo de este trabajo era el estudio de la incidencia y de la estabilidad de DON, ZEA y 3-acetildeoxinivalenol durante el proceso de ensilado en *silos de laboratorio*, en los que se estudió el efecto de inoculantes y del tiempo de ensilado. En paralelo y en *silos*

convencionales (trinchera), se evaluó la influencia de la zona que la muestra ocupaba en el volumen de silo, sabiendo que este tipo de silo puede llegar a ocupar 130 m^3. Para tal estudio, se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de DON, ZEA y 3-acetildeoxinivalenol basado en la detección LC-HESI-MS/MS, además de un método de cromatografía líquida con un detector UV/VIS por array de diodos en serie con un detector de fluorescencia (HPLC-PDA-FLD), ambos incluyendo una etapa previa de limpieza de los extractos por SPE.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Patrones empleados. Preparación de las soluciones de trabajo

Se han utilizado estándares de micotoxinas individuales en forma sólida para el 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA a partir de los cuales disoluciones madre de 10 mg mL^{-1} fueron preparadas por pesada del material sólido y posterior dilución en acetonitrilo.

Las soluciones de trabajo se han preparado mediante la combinación de alícuotas de cada una de las disoluciones madres individuales, finalmente diluidas en acetonitrilo, obteniéndose dos mezclas de trabajo. En la primera de ellas (utilizada en el ensayo de silos de laboratorio) la concentración de micotoxinas resultó ser de 5000 µg mL^{-1} para DON, 10 µg mL^{-1} para ZEA y de 100 µg mL^{-1} para 3-ADON; mientras que para la segunda mezcla de micotoxinas (utilizada en el ensayo de silos trinchera) las concentraciones han sido de 5000 µg mL^{-1} para DON y de 100 µg mL^{-1} para ZEA.

Todas las soluciones de trabajo fueron conservadas a -20°C antes de su uso.

2.2. Descripción de los tipos de muestras analizadas

Durante el año 2011, se cultivaron plantas de maíz en una parcela de la finca experimental del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) (Abegondo, A Coruña, España), 3000 de las cuales fueron inoculadas con una cepa micotoxigénica de *Fusarium graminearum*.

A partir de este maíz contaminado, dos ensayos para evaluar el contenido de DON y ZEA fueron propuestos: en un primer ensayo se elaboraron silos en condiciones de laboratorio (silos de laboratorio o microsilos) con el maíz procedente de la zona norte de la parcela, y un segundo ensayo, en el cual muestras de maíz de la zona sur de la misma parcela eran distribuidas en silos convencionales (silos trinchera).

La elaboración de detallada de estos dos tipos de muestras ha sido presentada anteriormente en el Capítulo III, (Apartados 1.2 y 1.3).

2.2.1. Silos de laboratorio

En este ensayo resultaron un total de 64 muestras de las cuales: 16 muestras correspondían a maíz fresco (muestras a los 0 días) y las otras 48 restantes a los silos de laboratorio que fueron abiertos en tres fechas distintas: 60, 120 y a los 240 días.

Con el *diseño experimental* planteado se pretendía evaluar 16 tratamientos, siguiendo un diseño factorial (2x2x4) completamente aleatorizado con 4repeticiones. Los tratamientos resultaban de la combinación de:

- 2 fechas de cosecha: semana 11 (1ª cosecha) tras la floración femenina y semana 15 (2ª cosecha) después de la floración femenina.
- 2 tratamientos con inoculante: agua como control y un inoculante comercial a base de *L. Buchneri* (P11CFT).
- 4 momentos de apertura de los silos de laboratorio: 0, 60, 150, 240 días tras la elaboración del silo.

Las muestras fueron tomadas en el momento de apertura del silo, teniendo especial cuidado con la representatividad. La toma de muestra, procesado y conservación ya ha sido explicado en el Capítulo III (Apartado 1.4.).

2.2.2. Silos trinchera

Este segundo ensayo, se seleccionaron 16 sacos de nylon llenos con maíz contaminado con *F. graminearum*, considerando dos alturas (inferior y superior) y dos secciones (inicial y final) a lo largo del silo trinchera del siguiente modo:

- 4 sacos en parte inferior y sección final.
- 4 sacos en parte inferior y sección inicial.
- 4 sacos en parte superior y sección final.
- 4 sacos en parte superior y sección inicial.

De cada saco se tomaron dos submuestras antes de ser colocados en el silo trinchera, proceso que se repitió al cabo de unos dos meses de haber estado enterrado en el silo trinchera. Esto generó un total de 64 muestras de las cuales: 32 eran muestras de maíz fresco introducido en los 16 sacos y las otras 32, correspondían al maíz ensilado en esos 16 sacos, distribuidos en el silo trinchera.

El *diseño experimental* que se planteaba pretendía evaluar 4 tratamientos (2x2) que resultaban de la combinación de:

- 2 niveles de altura del silo: parte superior y parte inferior
- 2 momentos de muestreo: al principio (sacos correspondientes a la sección inicial del silo) y al final (sacos de la sección final del silo).

2.3. Técnica de inmunoensayo ELISA para análisis de deoxinivalenol

Se ha utilizado un Kit de prueba rápido y cuantitativa AgraQuant®, basada en la técnica ELISA para el análisis de DON en las muestras de maíz contaminadas con la cepa de *F. graminearum*, una vez fueron recogidas del campo y antes de ser ensiladas. El procedimiento se dividía en las dos siguientes etapas:

a) Extracción

En un frasco de polipropileno de 250 mL, el DON fue extraído a partir de 10 g de las muestras (secas y molidas) con 50 mL de agua destilada. Después de una vigorosa agitación durante 3 minutos y de una centrifugación (3500 rpm, 20°C, 3 min.), la mezcla fue decantada y el sobrenadante filtrado a través de un embudo con un papel de filtro Whatman N.4. Ya

que condiciones de excesiva alcalinidad o acidez pueden afectar al resultado de la prueba, fue necesario comprobar que los extractos tenían un valor de pH de 6-8. A continuación, el extracto filtrado fue diluido con agua destilada en una relación 1:4, agregando1 ml del extracto del extracto filtrado a 3 ml de agua destilada. La muestra diluida ya pudo ser analizada por la técnica ELISA.

b) Ensayo ELISA

Para este ensayo, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Atemperar los reactivos que componen el kit (18-30 °C)

2. En la placa base, se colocaron tiras de dilución provistas de pocillos. Cinco pocillos de dilución para cada uno de los patrones (0, 0,25, 1, 2,5, 5 ppm) y once pocillos para las muestras a analizar. El mismo número de pocillos (16) recubiertos con anticuerpos fueron también colocados en la placa base.

3. Utilizando una pipeta monocanal, se dispensaron 200 µL de conjugado en los 15 pocillos de dilución y a continuación, 100 µL de patrón o de muestra, asegurándose de mezclar bien el contenido de los pocillos pipeteando y liberando las mezcla unas tres veces.

4. Se transfirieron 100 µL de la mezcla anterior a los pocillos que contenían los anticuerpos y se incubó durante 15 min.

5. El contenido de los pocillos se vació en el contenedor de residuos y los pocillos se lavaron cinco veces con agua destilada utilizando un frasco lavador.

6. Tras secar correctamente los pocillos golpeando sobre un papel absorbente, se agregaron 100 µL de substrato y se incubó durante 5 min.

7. Se añadieron 100 µL de sustrato de solución Stop dentro de cada uno de los pocillos y el color del contenido cambió de azul y amarillo a los pocos minutos.

8. Por último, se utilizó un lector de placas ELISA con un filtro de 450 nm y como referencia un filtro de 630 nm, se procedió a la lectura de los pocillos y las densidades ópticas (DO) fueron registradas.

2.4. Procedimiento de extracción y purificación

La preparación de la muestra se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Lattanzio [25] con alguna modificación.

Se pesaron 10 gramos de silo de maíz molido en frasco de polipropileno de 250 mL, sobre el que se adicionaron 100 mL de acetonitrilo:agua (84:16; v/v). La mezcla fue agitada en un agitador orbital durante 60 minutos a 100 rpm y el sobrenadante filtrado a través de un papel de filtro Whatman N.4. 10 mL del filtrado fueron evaporados a sequedad utilizando un evaporador de vacío a una temperatura de 70 °C, en combinación con una bomba de vacío y un recirculador de agua a temperatura constante de 7,5°C. El residuo fue reconstituido añadiendo, en primer lugar ,100 µL de metanol agitando durante un minuto y, a continuación, añadiendo 900 µL de agua agitando de nuevo durante 1 minuto.

El extracto diluido era posteriormente purificado a través de una extracción en fase sólida (SPE) empleando columnas Oasis® HLB (3 mL, 60 mg). Durante todas las etapas de la purificación se utilizó un sistema de vacío de 12 puertos que ayudó a que el paso del líquido a través de la columna fuese uniforme.

La columna OASIS era previamente acondicionada con 2 mL de metanol (2 x 1 mL) y equilibrada con 2 mL de metanol: agua (10:90; v/v) (2 x 1 mL). A continuación, el extracto de

la muestra reconstituido (1 mL) se hizo pasar a través de la columna a una velocidad de flujo de aproximadamente una gota por segundo, etapa en la cual los analitos de interés quedaban adsorbidos en el empaquetado de la columna. Tras proceder a la limpieza de la columna con 1 mL de metanol: agua (10:90; v/v), las micotoxinas fueron eluidas con 1 mL de metanol.

Finalmente, la muestra eluida fue evaporada a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno y reconstituida en 500 µL de metanol: agua (10:90; v/v).

Antes de su análisis por LC-MS/MS o HPLC-PDA-FLD, una alícuota de 250 µL de extracto anterior fue filtrada con un filtro de micro spin de celulosa regenerada y centrifugados en microcentrífuga durante 10 minutos a 10.000 rpm.

2.5. Preparación de las curvas de calibrado

Para la cuantificación de las micotoxinas en las muestras de silo de maíz, se han preparado curvas de calibración bajo la técnica "matrix-matched calibration" para DON, ZEA y 3-ADON. Para ello, se han elaborado patrones de calibración mediante la adición de distintos volúmenes de las soluciones de trabajo mezcla de DON, ZEA y 3-ADON a extractos blancos de silo obtenidos a partir del procedimiento de extracción y posterior SPE, descrito anteriormente.

Las curvas de calibración resultantes constaban de 8 niveles de concentración en el rango 40000-500000 µg kg^{-1} para DON, 25-1000 µg kg^{-1} para ZEA, 250-50000 µg kg^{-1} para 3-ADON para el ensayo de silos de laboratorio y de seis niveles de concentración en el rango 25000-250000 µg kg^{-1} para DON y 500-12500 µg kg^{-1} para ZEA, para el ensayo de silos trinchera.

2.6. Detección y cuantificación mediante LC-MS/MS

Se empleó un equipo LC-MS/MS para la detección y la cuantificación del DON, ZEA y 3-ADON en las muestras de maíz y de silo de maíz procedentes del ensayo de silos de laboratorio.

2.6.1. Preparación de fases móviles

Las fases móviles utilizadas para realizar los análisis en el LC-MS/MS fueron el agua y el metanol, ambas tamponadas con formiato amónico a concentración 3 mM y a acidificadas con ácido fórmico al 0,1%.

Para la preparación de las mismas, se utilizaron disoluciones intermedias de formiato amónico en agua y en metanol, ambas a concentración de 300 mM, a partir de las cuales se prepararon en matraces aforados de 250 y 500 mL las disoluciones a concentración de 3 mM. Se adicionó en cada una de ellas el volumen pertinente de ácido fórmico para lograr la presencia del mismo al 0,1% del volumen total.

2.6.2. Condiciones cromatográficas y del detector de masas empleadas

El equipo utilizado para detección y cuantificación de las micotoxinas fue un LC-MS/MS TSQ Quantum Access de triple cuadrupolo equipado con una fuente de ionización por electrospray HESI, y el modo de adquisición fue SRM (Selected Reaction Monitoring), con ionización positiva y negativa. Las condiciones cromatográficas y del detector masas se resumen en la siguiente Tabla IV.B.1.

Se inyectaron 10 µL tanto de los patrones de micotoxinas, como de los extractos de silo, mantenidos en el automuestrador a una temperatura de 10°C.

2.7. Detección y cuantificación mediante HPLC-PDA-FLUO

La cromatografía líquida acoplada a un detector UV/VIS por array de diodos (PDA) en serie con un detector de fluorescencia fue la técnica empleada para el análisis de DON y ZEA en las muestras de maíz y de silo de maíz del ensayo de silos trinchera.

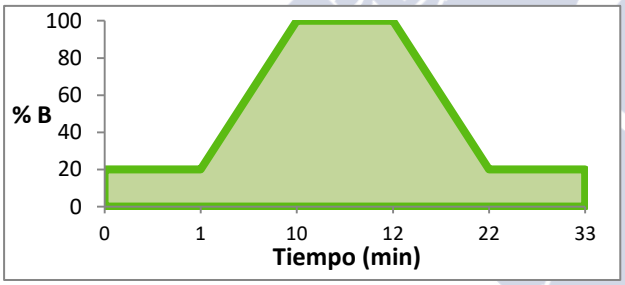
Las condiciones cromatográficas y de los dos detectores empleados se exponen en la Tabla IV.B.2.

Se inyectaron 10 µL tanto de los patrones de micotoxinas como de los extractos de silo, mantenidos en el automuestrador a una temperatura de 10°C.

Tabla IV.B.1. Condiciones LC-MS/MS empleadas para el análisis de DON y ZEA

COLUMNA		
KINETEX (Phenomenex)	Fase estacionaria	C18
	Dimensiones	100×2.1mm
	Tamaño de partícula	3 µm
	Tamaño de poro	100 Å
	Temperatura	25°C

FASE MÓVIL			
Régimen	Gradiente		
A	Agua con ácido fórmico al 0,1% y formiato amónico (3mM)		
B	Metanol con ácido fórmico al 0,1% y formiato amónico (3mM)		
Flujo	200 µL min^{-1}		
Temperatura	25°C		
Gradiente de fase móvil	**Tiempo** (min)	**% A**	**% B**
	0	80	20
	1	80	20
	10	0	100
	12	0	100
	22	80	20
	33	80	20



DETECTOR		
Modo de ionización	**Positivo**	**Negativo**
Voltaje del spray (V)	3000	2500
Tª del vaporizador (°C)	250	70
Tª del capilar (°C)	350	350
Gas de impulsión (u.a.)[1]	38	38
Gas auxiliar (u.a.)	5	5
Voltaje del *skimmer ofset* (V)	4	4
Tiempo de scan (mseg)	50	50
Presión argon (mbares)	0,002	0,002
Cono de barrido de iones (u.a.)[1]	3	3

[1]**unidades arbitrarias (u.a)**

Tabla IV.B.2. Condiciones HPLC-PDA-FLUO empleadas para el análisis de DON y ZEA

COLUMNA				
Atlantis dC18 (Waters)	Fase estacionaria	C18		
	Dimensiones	150×4,6mm		
	Tamaño de partícula	5 µm		
	Tamaño de poro	100 Å		
	Temperatura	30°C		
FASE MÓVIL				
Régimen	Gradiente			
A	Agua			
B	Acetonotrilo con ácido acético al 0,5%			
Flujo	1 mL min^{-1}			
Temperatura	25°C			
Gradiente de fase móvil	**Tiempo** (min)	**% A**	**% B**	**Curva**
	0	90	10	
	6	90	10	6
	15	80	20	1
	25	40	60	2
	30	90	10	6
DETECTORES				
PDA (deoxinivalenol)				
Longitud de onda de absorción	220 nm			
FLD (zearalenona)				
Longitud de onda de emisión	440 nm			
Longitud de onda de excitación	274 nm			

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Interpretación de los resultados obtenidos por la técnica ELISA

Al igual que para el estudio con *F. verticilloides* presentado en la sección anterior de este mismo capítulo (Sección IV.A, apartado 2.1), con el objetivo de conocer si la inoculación con la cepa de *F. graminearum* había sido efectiva, se llevó a cabo la determinación DON en algunas de las muestras de maíz antes de ser ensiladas mediante un enzimo-inmuno análisis directamente competitivo, en un rango de cuantificación de 0.25-5.0 ppm.

Cabe destacar que el comportamiento de este hongo ha sido mucho más agresivo que aquel presentado por el *F.verticilloides* (Sección IV.A, apartado 2.1), observándose que para un gran número de las plantas inoculadas con la cepa del *F. graminearum*, las mazorcas estaban afectadas en prácticamente toda su superficie.

F. verticilloides ***F. graminearum***

Figura IV.B.1. Mazorcas infectadas con *F. verticilloides* y *F. graminearum* tras la inoculación de plantas de maíz con de cepas de *Fusarium*

Se seleccionaron muestras de maíz representativas para cada ensayo (silos de laboratorio y silos trinchera) y para cada uno de los tratamientos (agua y *L. Buchneri*), resultando un total de 11 muestras que fueron analizadas con la técnica ELISA.

El DON de las muestras analizadas y el DON de los patrones competían con el DON conjugado con enzimas por lugares de unión de los anticuerpos disponibles. Una vez que se realizaba el lavado y se adicionaba el sustrato para la enzima, se observaba un color azul en los pocillos, cuya intensidad era inversamente proporcional a la cantidad de DON en las muestras y en los patrones. Al añadir la solución STOP, se apreciaba un cambio del color azul a color amarillo, momento en el que se procedía a la lectura de la DO a una longitud de onda de 450 nm.

A partir de los valores de DO obtenidos para los cinco patrones, una curva dosis-respuesta fue construida, representando el logaritmo de B/B_0 frente al logaritmo de la concentración de cada patrón, donde B es el valor de la DO del patrón y B_0 el valor de la DO del patrón de 0 ppm.

Tabla IV.B.3. Valores para la representación de la curva dosis-respuesta el deoxinivalenol

	conc. (ppm)	*Log (conc)*	*DO (450 nm)*	*Log B/B $_0$*
Patrón 1	0		0,221	**0,000**
Patrón 2	0,25	**-0,602**	0,145	**-0,183**
Patrón 3	1	**0,000**	0,101	**-0,340**
Patrón 4	2,5	**0,398**	0,079	**-0,447**
Patrón 5	5	**0,699**	0,063	**-0,545**

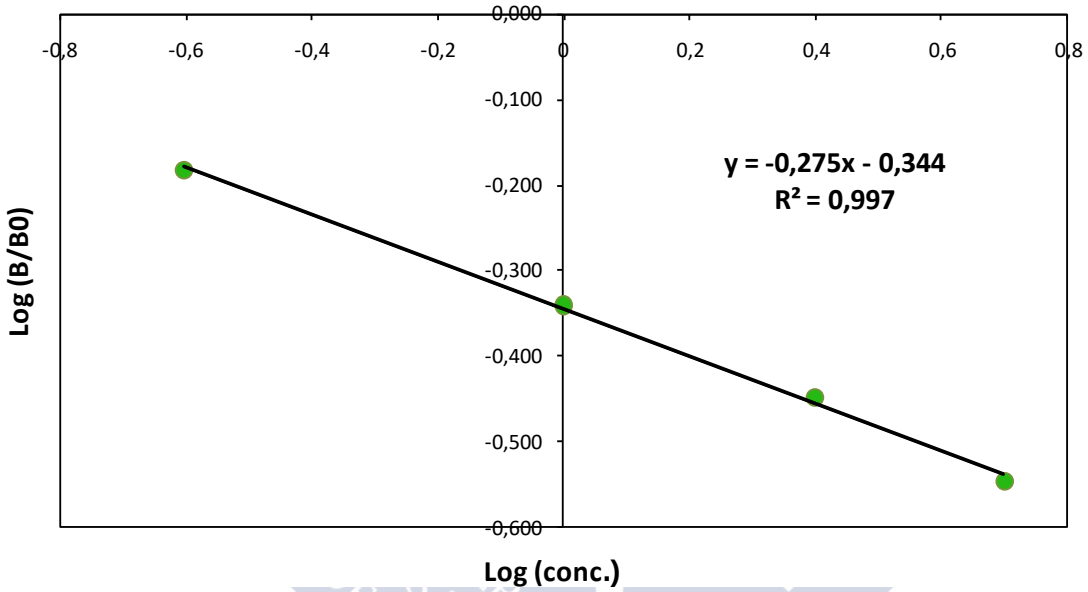


Figura IV.B.2. **Curva de calibración estándar obtenida para la determinación de deoxinivalenol utilizando la prueba AgraQuant® basada en la técnica ELISA**

La concentración de DON fue obtenida por interpolación a partir de la curva de patrones (y= ax + b) y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Log conc.} = \log (B/ B_0 + b)/a$$

Donde a y b corresponden a la pendiente y a la ordenada en el origen, respectivamente, de la curva de de los patrones.

Se comprobó que la inoculación de las plantas de maíz con la cepa de *F. graminearum* sí había sido efectiva, ya que el hongo produjo DON, tal y como se puede observar en los resultados expuestos en la tabla anterior. Además, los valores de concentración de DON en las distintas muestras analizadas, también revelaron que la cantidad de micotoxinas era casi 6 veces superior en aquellas muestras de maíz que fueron tratadas con el *L. Buchneri*.

Tabla IV.B.4. Concentración de DON en muestras de silo de maíz obtenidas por la prueba AgraQuant® basada en la técnica ELISA

Tipo de muestra	Inoculante	DO (450 nm)	log B/B_0	log conc.	conc. (ppm)
Silo laboratorio_1	**agua**	0,083	-0,425	0,296	**1,96**
Silo laboratorio_2	**agua**	0,073	-0,481	0,498	**3,13**
Silo laboratorio_3	**agua**	0,079	-0,447	0,374	**2,35**
Silo laboratorio_4	***L. Buchneri***	0,060	-0,566	0,808	**6,37**
Silo laboratorio_5	***L. Buchneri***	0,049	-0,654	1,128	**13,30**
Silo laboratorio_6	***L. Buchneri***	0,046	-0,682	1,228	**16,73**
Silo trinchera_1	**agua**	0,096	-0,362	0,066	**1,16**
Silo trinchera_2	**agua**	0,094	-0,371	0,099	**1,25**
Silo trinchera_3	**agua**	0,076	-0,464	0,435	**2,70**
Silo trinchera_4	**agua**	0,078	-0,452	0,394	**2,46**
Silo trinchera_5	**agua**	0,077	-0,458	0,414	**2,58**

3.2. Optimización de las condiciones del LC-MS/MS

Se optimizaron las transiciones SRM y las energías de colisión más intensas de cada compuesto mediante la infusión, en el modo positivo y negativo, de soluciones estándar a una concentración de 1 µg mL^{-1} preparadas en una mezcla de igual composición a la fase móvil en el momento de inyección (agua:metanol 80:20, conteniendo 3mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico).

Los resultados de estas infusiones mostraron que el DON y 3-ADON ionizaban en modo positivo formando iones protonados $[M+H]^+$, mientras que la ZEA ionizaba en modo negativo dando lugar a su ion molecular desprotonado $[M-H]^-$.

En la siguiente tabla aparecen detallados los tiempos de retención, las transiciones y las energías de colisión seleccionadas en el modo de ionización positivo o negativo, según corresponda para cada compuesto:

Tabla IV.B.5. Tiempos de retención y parámetros MS/MS optimizados para las micotoxinas estudiadas

Analito	T_R (min)	Ionización	Ion precursor	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Energías de colisión (eV)
DON	2.7	HESI +	[M+H]+	297.0	91.5 / 203.0 / 231.1 / 249.1/ 279.0	42 / 17/ 14 / 11 /11
3-ADON	6.5	HESI +	[M+H]+	339.1	137.0 / 202.9 / 213.1 / 231.0 / 261.1 / 321.0	14 / 17/ 17 / 12 / 11/ 5
ZEA	10.5	HESI -	[M-H]-	317.1	130.4 / 159.6 / 175.0 / 187.0	36 / 39 / 26 / 26

Los analitos determinados en el modo de ionización positivo (DON y el 3-ADON) son compuestos polares que se registran al principio del cromatograma, mientras que la ZEA, caracterizada por un carácter apolar, se determina a un tiempo más alto. Estas diferencias de polaridad, hicieron posible la determinación de los tres de forma conjunta, esto es, realizando un cambio de polaridad en una misma analítica. De este modo, durante los 8 primeros minutos la adquisición fue realizada en el modo de ionización positivo (HESI+), segmento en el que DON y 3-ADON eran determinados, y a partir del minuto 8, la ionización cambiaba al modo negativo (HESI+), tramo en el cual la ZEA era adquirida.

El proceso de cambio de polaridad de la fuente de ionización es un proceso que requiere cerca de unos cinco segundos. La separación cromatográfica entre el DON, 3-ADON y ZEA, ha permitido la realización de un cambio del modo de ionización positivo al negativo sin afectar a la determinación analítica, y permitiendo el análisis de las tres micotoxinas en una única inyección.

3.3. Optimización de las condiciones del HPLC-PDA-FDL

Además de su elevada capacidad de resolución (separación), otra de las ventajas de utilizar HPLC es la posibilidad de combinarla con distintos sistemas de detección [24], lo que permite la detección de múltiples compuestos de distinta naturaleza química.

Se ha desarrollado un método HPLC con detectores PDA y FLD en serie (HPLC-PDA-FLD) para la cuantificación simultánea de DON y ZEA en muestras de silo de maíz.

El DON era detectado mediante el PDA, detector que permitía la medición simultánea a distintas longitudes de onda, haciendo posible la obtención de espectros de absorción completos cada 0,01 segundos y la selección de la longitud de onda óptima para la cual el DON presentaba un máximo de absorción. La longitud de onda más adecuada resultó ser de 220 nm, siendo la seleccionada para la detección y cuantificación del DON.

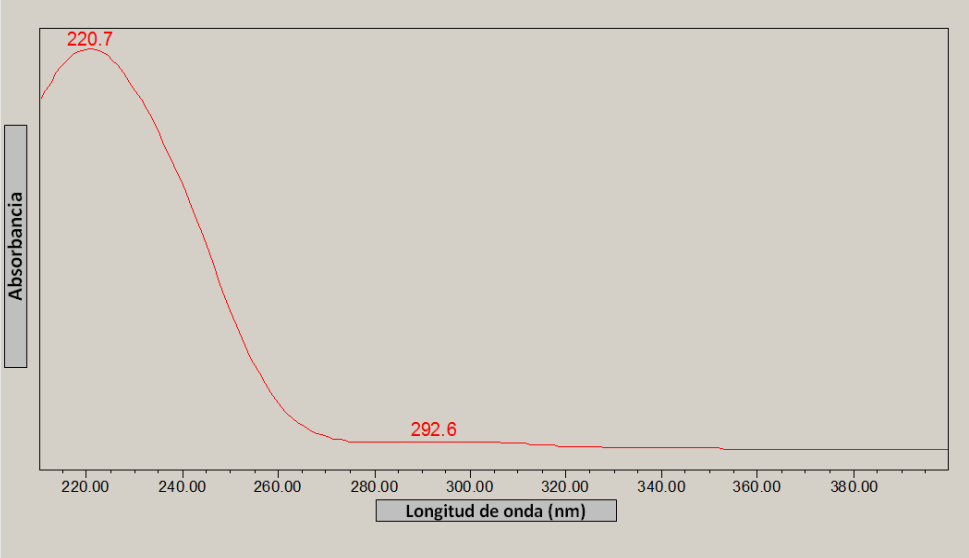


Figura IV.B.3. Espectro de absorción del DON

Simultáneamente, y sin necesidad de ninguna etapa de derivatización, la ZEA era analizada a través del detector FDL midiendo la intensidad de fluorescencia emitida de forma natural por esta micotoxina. Para este tipo de detección, fue necesaria la selección de adecuadas longitudes de onda de emisión y de excitación para la correcta identificación y cuantificación de la ZEA una vez que ésta era eluida de la columna. Las longitudes de onda de emisión y excitación empleadas fueron de 440 nm y 274 nm, respectivamente.

Debido a la alta especificidad, la utilización de un detector fluorescencia para la determinación de la ZEA en una matriz compleja como es el silo de maíz, supuso una gran ventaja.

Los tiempos de retención para DON y ZEA fueron de 5,2 y 22 min., respectivamente.

3.4. Evaluación del proceso de extracción y purificación de DON, 3-ADON y ZEA

En base a la bibliografía referente a ensilados de maíz consultada [9, 20, 21] y a un protocolo establecido para el análisis de varias micotoxinas en alimentos a base de cereales [25], se decidió aplicar una extracción con una mezcla acetonitrilo:agua (84:16; v/v) seguida de una etapa de purificación (SPE) para la determinación simultánea de DON, 3-ADON y ZEA en las muestras de ensilados de maíz.

Debido a las características de las muestras de silo, la relación muestra/ extractante seleccionada fue de 1:10, de modo que para todos los casos 10 gramos de silo de maíz fueron extraídos con 100 mL de la mezcla acetonitrilo:agua (84:16; v/v) .

Incluir una etapa de purificación que eliminase los compuestos interferentes tales como lípidos y pigmentos, comunes en las muestras de ensilado de maíz [9], parecía ser necesaria.

Teniendo en cuenta el gran carácter polar del DON, durante la etapa de lavado de la columna se planteó la utilización de una mezcla que contenía un 20% de metanol, evitando de este modo la posible pérdida de dicha micotoxina.

3.4.1. Evaluación de la recuperación

La extracción de las muestras de silo y la purificación de los extractos obtenidos a través de columnas Oasis® HLB fueron evaluados mediante el estudio del porcentaje de recuperación de las micotoxinas con la metodología propuesta. Para ello, muestras de silo blanco (secado durante 2 días a 40°C, molido con un tamaño de tamiz de 1 mm) fueron fortificadas por triplicado mediante la adición de distintos volúmenes de la disolución mezcla de las tres micotoxinas, siendo las concentraciones de 1000 µg kg^{-1} para DON y ZEA y de 500 µg kg^{-1} para 3-ADON.

Las muestras fortificadas se dejaron reposar durante una noche, asegurando una correcta interacción entre los analitos y la matriz, y con el fin de evaporar al máximo el disolvente (acetonitrilo) antes de proceder a la extracción.

A continuación, se procedió a la extracción y a la purificación de estas muestras utilizando el procedimiento descrito en el apartado 1.4 de esta misma Sección y las recuperaciones fueron calculadas a partir de curvas de calibración *"matrix-matched"*. Además, la desviación estándar relativa (RSD) de las determinaciones también ha sido calculada.

Tabla IV.B.6. Valores de recuperación obtenidos para la extracción de DON, 3-ADON y ZEA con el método propuesto.

Micotoxina	Recuperación media (%)	RSD (%)
DON	81,1	4,1
3-ADON	77,1	3,0
ZEA	61,1	7,9

Bajo las condiciones estudiadas, los valores de las recuperaciones obtenidos para estas micotoxinas han mostrado valores superiores al 60% y los valores de RSD se han mantenido por debajo del 8%, considerándose la metodología (extracción y purificación) aplicada a las muestras de silo como aceptable y bastante precisa.

3.4.2. Evaluación del efecto matriz

Se ha realizado un estudio para conocer el efecto matriz (ME) de las micotoxinas estudiadas en las dos técnicas de análisis empleadas: LC-MS/MS y HPLC-PDA-FLD.

Para la primera de ellas, el efecto de supresión o aumento de iones en la fuente de ionización por interferencias con la matriz fue evaluado por comparación entre un patrón preparado en fase móvil y un patrón obtenido bajo la técnica "matrix-matched" (con un 100% de presencia de matriz), conteniendo ambos DON y ZEA y 3-ADON a la misma concentración.

Las áreas cromatográficas de las micotoxinas obtenidas para cada uno de los patrones fueron comparadas y el efecto matriz calculado, tal y como se muestra a continuación:

Tabla IV.B.7. Efecto matriz del DON, 3-ADON y ZEA en muestras de silo de maíz analizadas por LC-MS/MS

Micotoxinas	patrón 2 ppm en fase móvil	patrón 2 ppm en matriz silo	% ME
DON	250000	164000,0	-34,4
3-ADON	173000	47500,0	-72,5
ZEA	759000	50300,0	-93,4

Los resultados indicaron que la mayor supresión de iones la presentaban 3-ADON y la ZEA, siendo ésta muy pronunciada para la ZEA con un porcentaje de supresión que alcazaba el 93%.

Por ello, para el análisis de las muestras de silo de maíz por LC-MS/MS, el ME debido a las presencia de compuestos interferentes (lípidos, pigmentos) fue compensado mediante el uso de curvas de calibración que contenían un 100% de matriz ("*matrix-matched calibration")*.

El ME también fue evaluado para la técnica HPLC-PDA-FLD. Para ello se han comparado las pendientes obtenidas a partir de un duplicado de la curva de calibración *"matrix-*

matched" (n=2) con la curva de la calibración estándar, ambas en el rango de concentración de 50-500 µg mL^1 para DON y de 0.9-14 µg mL^1 para ZEA.

Tabla IV.B.8. Curvas de calibración en fase móvil y matriz silo de maíz para DON y ZEA obtenidas por HPLC-PDA-FLUO

	DON		ZEA	
	o. origen	***pendiente***	***o. origen***	***pendiente***
fase móvil	28767	25143	161671,7	307960,4
matriz	-476372	28112	122366,5	318361,5

Como se puede observar en la tabla anterior, para la ZEA y para el DON apenas existía diferencia entre las pendientes de las curvas de regresión preparadas en matriz y las pendientes de las curvas de calibración estándar, siendo por tanto el ME matriz moderado para ambas micotoxinas.

3.4.3. Otros parámetros de calidad del método LC-MS/MS

El estudio que se presenta en esta Sección se llevó en paralelo con el desarrollo y validación del método multi-micotoxinas basado en la técnica LC-MS/MS en muestras de silo de maíz (Sección IV.C del presente Capítulo). Por ello, se han considerado para el presente estudio los mimos parámetros de calidad del método analítico (linealidad, límites de detección y cuantificación, reproducibilidad y reproducibilidad) que aquellos obtenidos en la validación del método multi-micotoxinas y que aparecen extensamente detallados en la siguiente Sección.

3.5. Incidencia y estabilidad de DON, 3-ADON y ZEA durante el proceso de ensilado en *silos de laboratorio*

El procedimiento de extracción y de purificación anteriormente descrito en el apartado 1.4 de la presente Sección, fue aplicado a un total de 64 muestras de maíz ensiladas en condiciones de laboratorio. Las valores de las concentraciones de DON, 3 –ADON y ZEA obtenidas fueron corregidos con el contenido de humedad residual.

El efecto del uso de inoculantes (agua como control y *L. Buchneri* como inoculante) y del tiempo de ensilado (0, 60, 120, 240 días) sobre la concentración DON, 3 –ADON y ZEA fueron evaluados para la primera y la segunda cosecha.

Las evoluciones de DON y ZEA analizadas en las muestras de silo de laboratorio, con los dos tratamientos de inoculante y para las dos cosechas, aparecen representados gráficamente en las figuras que se presentan a continuación:

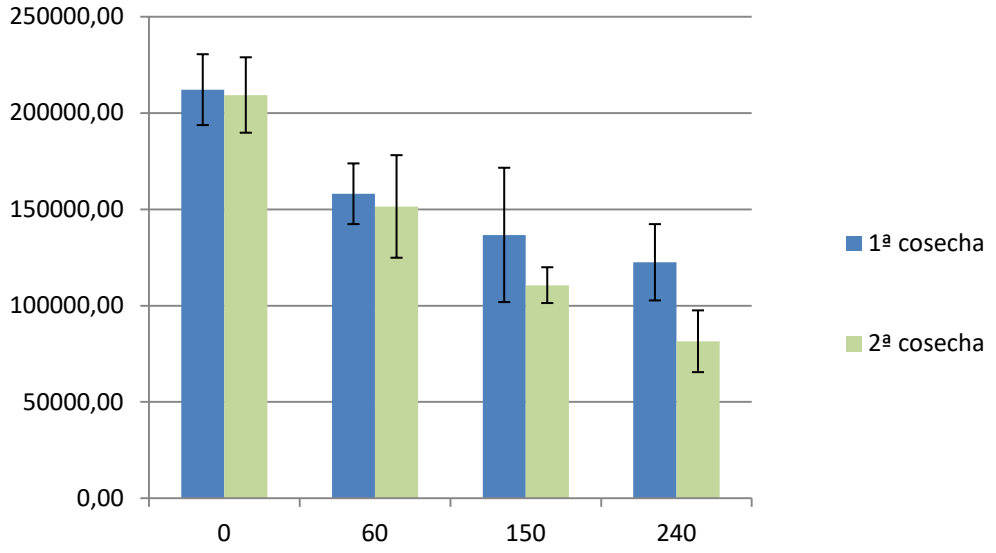


Figura IV.B.4. Evolución de DON en silos de laboratorios correspondientes a la 1ª cosecha y la 2ª cosecha y al tratamiento con agua (control)

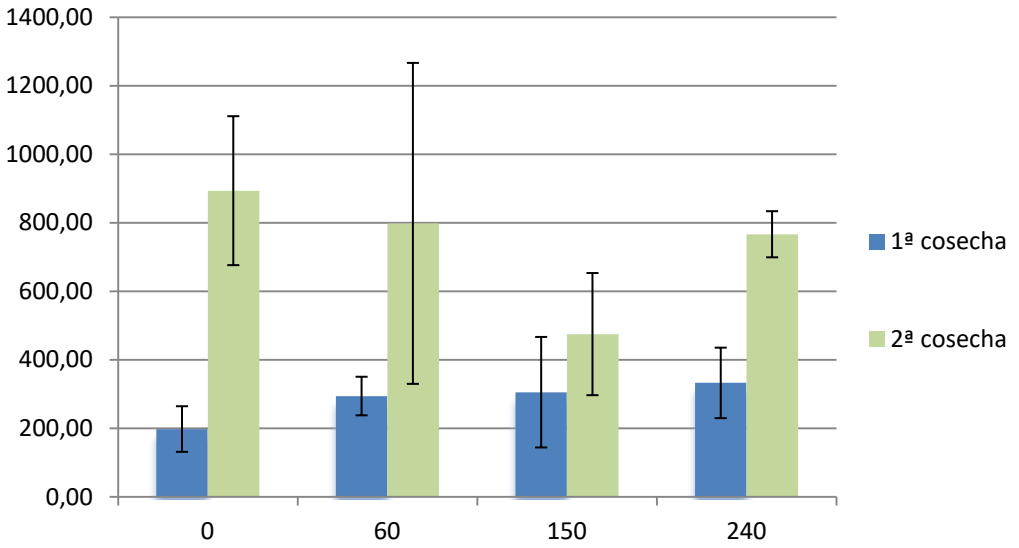


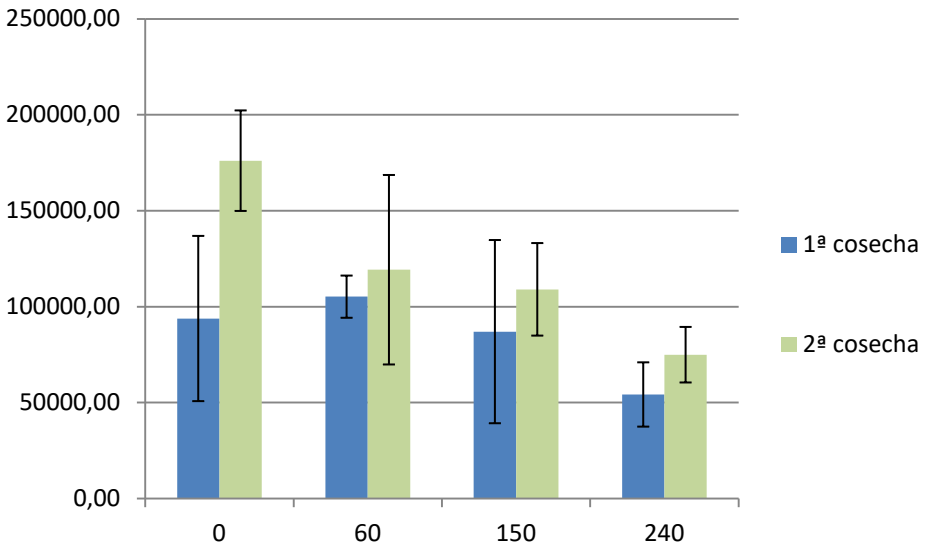
Figura IV.B.5. Evolución de ZEA en silos de laboratorios correspondientes a la 1ª cosecha y la 2ª cosecha y al tratamiento con agua (control)

Como se puede observar en las gráficas anteriores, la concentración de DON disminuyó en las dos cosechas para aquellas muestras que habían sido tratadas con agua. La cantidad del DON mostró una disminución de 42,2 % para la primera cosecha (11ª semana tras la floración femenina), mientras que para la segunda cosecha (15ª semana tras la floración femenina) el DON llegó a reducirse más de un 50% (61,1%). Un comportamiento similar se observó para el 3-ADON en la primera cosecha, que en el tratamiento con agua llegó a disminuir su contenido hasta un 80%. En cambio, para esta misma micotoxina, para aquellas muestras correspondientes a la segunda cosecha, la concentración para el tiempo de ensilado 0 días (maíz fresco) resultó ser inferior en comparación con las de las primera

cosecha, no siendo detectada en aquellas muestras correspondientes a los 60, 150 y 240 días de ensilado.

Resultados diferentes se obtuvieron para la ZEA en aquellas muestras tratadas con agua. En la primera cosecha, se observó un ligero aumento en la concentración de la ZEA durante los primeros 60 días de ensilado. Si la cantidad de ZEA detectada en el maíz fresco (tiempo de ensilado 0 días) fue de unos 200 µg kg^{-1}, ésta alcanzó un valor de casi 300 µg kg^{-1} al cabo de los 60 días de estar ensilada. Esta concentración se mantuvo prácticamente estable hasta los 240 días de almacenamiento.

En cambio en la segunda cosecha, el contenido de ZEA mostró un porcentaje de disminución de aproximadamente un 50% en aquellos silos de laboratorio que no habían sido tratados con *L. Buchneri* y abiertos a los 150 días de ensilado. Comparando la concentración media de ZEA en las muestras de maíz fresco con las concentraciones medias de ZEA después de 240 días de almacenamiento, se puede decir que para las muestras de maíz procedentes de la segunda cosecha y tratadas con agua, la cantidad de ZEA se mantuvo prácticamente constante.



FiguraIV.B.6. Evolución de DON en silos de laboratorios correspondientes a la 1ª cosecha y la 2ª cosecha y al tratamiento *L. Buchneri*

El efecto del uso del inoculante *L. Buchneri* sobre la evolución de la micotoxinas en los silos de laboratorio aparece representado en las tres figuras anteriores. En ambas cosechas, el contenido en DON se vio reducido en un 42% y 57% para la 1ª y para la 2ª fecha de cosecha, respectivamente. Este comportamiento fue muy similar al encontrado en aquellas muestras que habían sido tratadas con agua en lugar de con el inoculante *L. Buchneri*.

Las evoluciones en las concentraciones del 3-ADON para aquellas muestras tratadas con *L. Buchneri* fueron diferentes a las que correspondían al tratamiento con agua y que se han presentado con anterioridad. Así, en la primera cosecha, el uso de *L. Buchneri* aumentó la concentración de 3-ADON de 6182 µg kg^{-1} a 11550 µg kg^{-1} durante los 150 días de ensilado, volviendo a disminuirla a 7837 µg kg^{-1} durante los últimos 90 días de ensilado. En cambio, en

la segunda cosecha, sólo se detectó la presencia de 3-ADON en aquellas muestras abiertas a los 60 días de ensilado y en la que se había usado *L. Buchneri.*

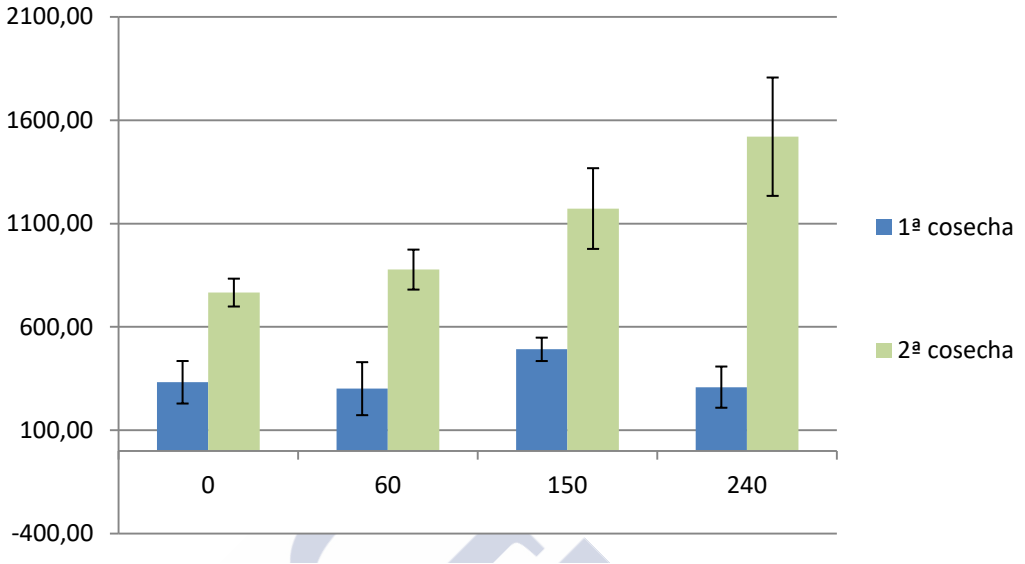


Figura IV.B.7. Evolución de ZEA en silos de laboratorios correspondientes a la 1ª cosecha y la 2ª cosecha y al tratamiento *L. Buchneri*

Mientras que, en la primera cosecha, el uso de inoculante *L. Buchneri* pareció mantener el contenido de ZEA prácticamente estable durante todo el tiempo de ensilado, un comportamiento muy diferente se observó para la segunda fecha de cosecha. Así, las muestras procedentes de la segunda cosecha y que habían sido tratadas con el *L. Buchneri,* mostraron un aumento en la cantidad de ZEA de casi un 50% durante el proceso de ensilado.

En silos de laboratorio, el uso de inoculantes a base de *L. Buchneri* retrasa y reduce el desarrollo de los hongos una vez abierto el silo [26] y en consecuencia podría reducir el contenido en micotoxinas [27]. La causa de esta reducción es presumiblemente la mayor producción de ácido propiónico, el cual posee un contrastado efecto inhibidor del desarrollo de los hongos [28] y de la formación de micotoxinas [29]. Sin embargo, se ha demostrado que inoculantes como el *L. Buchneri* no siempre tienen este efecto inhibidor sobre las micotoxinas una vez que estas ya se han formado [17]. Este hecho podría explicar lo ocurrido con el contenido de ZEA en las muestras de silos de laboratorio tratadas con *L. Buchneri* estudiadas en el presente trabajo, principalmente para aquellas procedentes de la segunda fecha de cosecha.

El empleo de *L. Buchneri* como inoculante no demostró un efecto significativo en el contenido del DON durante el tiempo de almacenamiento. De hecho, tanto las muestras tratadas con agua como aquellas tratadas con *L. Buchneri*, mostraron una clara disminución en el nivel de DON a lo largo del proceso de ensilado. Estos resultados estaban de acuerdo con aquellos publicados por Boudra y Morgavi [1], los cuales observaron una disminución en la cantidad de DON en muestras de silos de laboratorio, principalmente en los tres primeros meses de ensilado. Estos mismos autores también demostraron que para esas mismas muestras, el contenido de ZEA mostraba una mayor estabilidad durante el almacenamiento.

3.6. Incidencia y estabilidad de DON y ZEA durante el proceso de ensilado en *silos convencionales*

Se ha llevado a cabo la extracción de DON y ZEA en las 64 muestras de maíz fresco y ensilado procedentes de los 16 sacos distribuidos en el silo trinchera. Posteriormente, las micotoxinas se detectaron y cuantificaron por HPLC-PDA-FLD.

Los valores de concentración de DON y ZEA obtenidos tras el análisis de las muestras de este ensayo se recogen a en la siguiente tabla:

Tabla IV.B.9. Concentraciones medias de DON y ZEA calculadas para las 64 de muestras de maíz fresco y ensilado procedentes de los 16 sacos colocados a dos alturas y en dos secciones del silo trinchera

	DON		**ZEA**		**altura/sección**	
	concentración	RSD	concentración	RSD		
	(ug kg-1)		**(ug kg-1)**			
maíz fresco	108876,8	21207,9	1430,3	1136,1	*inferior*	*final*
	145671,5	27511,8	1362,0	200,4	*inferior*	*inicial*
	153455,3	21081,4	1473,9	784,5	*superior*	*final*
	173825,2	30513,7	1095,4	144,5	*superior*	*inicial*
	DON		**ZEA**		**altura/sección**	
	concentración	RSD	concentración	RSD		
	(ug kg-1)		**(ug kg-1)**			
maíz ensilado	105143,0	32032,6	788,4	143,7	*inferior*	*final*
	123644,6	27430,4	849,5	30,3	*inferior*	*inicial*
	139806,7	36326,8	1415,6	1186,0	*superior*	*final*
	121652,1	16973,5	1147,5	78,7	*superior*	*incial*

Comparando las concentraciones del DON en el maíz fresco y en el maíz ensilado en sacos, los resultados obtenidos han revelado un descenso en el contenido del DON para los sacos situados sección inicial del silo. Esta tasa de disminución ha sido más pronunciada en la parte superior alcanzado un 30% frente a un 15% para los sacos correspondientes a la parte más baja del silo. En cambio en la sección final, la última en ser muestreada, el análisis de los datos ha demostrado que la concentración de DON apenas había variado desde el maíz es su estado fresco hasta el ensilado en sacos en el silo trinchera.

Un comportamiento diferente se ha observado para la ZEA. En la parte más baja del silo es donde se ha encontrado una mayor reducción en el contenido de ZEA, siendo su porcentaje de disminución del 45% en la sección final y del 38% en la sección inicial. Por el contrario, la concentración de ZEA se ha mantenido prácticamente constante en la parte más alta del silo.

Tal y como se observa en la Tabla IV.B.9, aquellas muestras de silo de maíz correspondientes a los sacos situados en la parte más alta del silo presentaron unas concentraciones medias de ZEA (1415,6 µg kg^{-1} y de 1147,5 µg kg^{-1}) superiores a las

encontradas en a la altura más baja. Esto podría ser debido a que en las capas superiores de los silos, al estar más expuestas a la entrada de aire, existe un mayor riesgo de desarrollo de hongos y, consecuentemente, mayor riesgo de contaminación por micotoxinas [26].

4. BIBLIOGRAFÍA

[1] Boudra, H.; Morgavi, D.P.; Reduction in *Fusarium* toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time; *J. Agric. Food Chem.;* 56, **2008**, 4523-4528.

[2] Tangni, E. K.; Pussemier, L.; Van Hove F.; Mycotoxin Contaminating Maize and Grass Silages for Dairy Cattle Feeding: Current State and Challenges; *J. Anim. Sci. Adv*; 3, **2013**, 492-551.

[3] Trebstein, A.; Lauber, U.; Humpf H-U.; Analysis of *Fusarium* toxins via HPLC-MS/MS multimethods: matrix effects and strategies for compensation;; *Mycotox. Res.*; 25, **2009**, 201-213.

[4] Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mulé, C.; Moretti, A.; Perrone, G.; Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.***;** 109, **2003**, 645-667.

[5] European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General; Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on undesirable substances in feed; **2003**; En: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out127en.pdf (Consulta: 14-04-2015).

[6] Joany, J-P.; Diaz, D.E.; Effects of mycotoxins in ruminants. En: "The Mycotoxin Blue Book"; Diaz, D.E.; Ed. Nottingham University Press, **2005**, 295–321.

[7] Labuda, R.; Parich, A.; Berthiller, F.; Tančinová, D.; Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia; *Int. J. Food Microbiol.;* 105, **2005**, 19–25.

[8] Driehuis, F.; Spanjer, M. C.; Scholten, S. M.; Giffel, M. C. T.; Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands; *Food Addit. Contam. B.;* 1, **2008**, 41–50.

[9] Garon, D.; Richard, E.; Sage, l.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P.; 2006 Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study; *J. Agric. Food Chem.;* 54, **2006**, 3479-3484.

[10] Auerbach, H.; Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions; **2006;** En: http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mould-growth-mycotoxin-contamination-t219/p0.htm (Consulta: 17-04-2015).

[11] Scudamore, K.A.; Livesey, C.T.; Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review; *J. Sci. Food Agric.*; 77, **1998**, 1–17.

[12] Gonzalez Pereyra, M.L.; Alonso, V.A.; Sager, R.; Morlaco, M.B.; Magnoli, C.E.; Astoreca, A.L.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R.; Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage; *J. Appl. Microbiol.*; 104, **2008**, 1034-1041.

[13] Krska,R.; Welzig,E.; Boudra,H; Analysis of *Fusarium* toxins in feed**;** *Anim. Feed .Sci.Tech*.; 137, **2007**, 241-264.

[14] Recomendación de la Comisión del 17 de agosto de 2006 (2006/576/CE), sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal; DO L 229, **2006**, 7-9.

[15] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed; European Food Safety Authority (EFSA); **2004**; J. 73, 1–42.

[16] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed; European Food Safety Authority (EFSA); **2004**; J. 89, 1–35.

[17] Binder, E. M.; Managing the risk of mycotoxins in modern feed production; *Anim. Feed Sci. Tech*.; 133, **2007**, 149–166.

[18] Rasmussen, R.R.; Storm, I.M.L.D.; Rasmussen, P.H.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K.F.;. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS; *Anal. Bioanal. Chem.*; 397, **2010**, 765-776.

[19] Eckard, S.; Wettstein, F.E.; Forrer, H.; Vogelgsang, S.; Incidence of Fusarium species and mycotoxins in silage maize; *Toxins;* 3, **2011**, 949–967.

[20] Richard, E.; Heutte, N.; Sage, L.; Pottier, D.; Bouchart, V.; Lebailly, P.; Garon, D.; Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage; *Food Chem. Toxicol.*; 45, **2007**, 2420-2425.

[21] Van Pamel, E.; Verbeken, A.; Vlaemynck, G.; De Boever, J.; Daeseleire, E.; Ultrahigh-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multimycotoxin method for quantitating 26 mycotoxins in maize silage; *J. Agric. Food Chem.;* 59, **2011**, 9747-9755.

[22] Shephard, G.S.; Chromatographic separation techniques for determination of mycotoxins in food and feed. En: "Determing mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed"; De Saeger, S.; Ed. Woodhead Publishing; **2011**, 71-89.

[23] Langseth, W.; Rundberget, T.; Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes incereals, foodstuffs and cultures; *J. Chromatogr. A*; 815, **1998**, 103–121.

[24] Turner, N.W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S.A.; Analytical methods for determination of mycotoxins: A review; *Anal. Chim. Acta;* 632, **2009**, 168-180.

[25] Lattanzio, V. M. T.; Della Gatta, S.; Suman, M.; Visconti, A.; Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods; *Rapid Commun. Mass Spectrom*; 25, **2011**, 1869–1880.

[26] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Pereira, S.; Cardelle, M.; Efecto de la fecha de cosecha y el uso de inoculantes sobre la calidad fermentativa, la estabilidad aeróbica y la calidad higiénica en ensilados de maíz ; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba;36, **2008**, 337-346.

[27] Selwet, M.; Raczkowska-Werwinska, K.; Potkanski, A.; Grajewski, J.; Twarozek, M.; Miklaszewska, B.; Lukomska, V.; Gubala, A.; Chemical composition and microflora in silage from maize ensilage with bacterial and chemical additives; *Medycyna Weterynaryjna*; 64, **2008**, 477-479.

[28] Kung, L.Jr; Stokes, M.R..; Lin, C.J.; Silage additives. En:"Silage Science and Technology"; Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Madison, J.H.;WI, USA; **2003**, 305–360.

[29] Mansfield, M.A.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A.; Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *PenicillIum* mycotoxins; *Phytopathology;* 68, **2008**, 330-336.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV.C. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO MULTI-MICOTOXINAS BASADO EN LA TÉCNICA LC-MS/MS PARA MUESTRAS DE SILO DE MAÍZ

El estudio realizado formaba parte de dos proyectos de investigación: el primero de ellos, que llevaba por título *"Incidencia y estabilidad de aflatoxinas y micotoxinas del género Fusarium en ensilados de maíz. Diagnóstico en explotaciones ganaderas y estudio experimental"*, fue financiado por el INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) en el año 2010. El segundo de los proyectos, financiado por la Xunta de Galicia (2009-2012) llevaba por título "Efecto de las condiciones climáticas y del manejo de los silos sobre la contaminación con micotoxinas en ensilados de maíz de las explotaciones de vacuno de leche".

Otro proyecto sirvió de soporte a estas investigaciones. Se trataba de un proyecto FEADER (Fondo Europeo Agrario de Desarrollo Rural) llevado a cabo en colaboración con el LIGAL (Laboratorio Interprofesional Gallego de Análisis de Leche) en el año 2015 y titulado *"Avaliación do efecto da contaminación multi-micotoxinas en ensilaxes sobre a calidade do leite producido nas explotación de vacún en Galicia"*

Los resultados obtenidos han sido recogidos en el artículo "V*alidation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain"* (*Food Addit. Contam. Part A, 33, 2016, 1850-1863),* incluido en los Anexos finales de esta Memoria de Tesis.

1. INTRODUCCIÓN

La incidencia y la aparición de micotoxinas en alimentación animal, ha sido estudiada principalmente en cereales. Sin embargo, una gran variedad de micotoxinas ha resultado estar presente en concentrados, piensos, forrajes ensilados y heno [1].

El maíz forrajero es más susceptible que la hierba a la contaminación con hongos micotoxigénicos tanto en el campo [2], como cuando es ensilado [3], lo que convierte a los ensilados de maíz en el componente de la dieta de las vacas de leche que suministra la mayor parte de la ingesta de micotoxinas [4,5].

Con la intención de mantener los niveles de micotoxinas por debajo de los niveles de riesgo para la salud animal, se han establecido en el ámbito de la Unión Europea (UE) una serie de normas que regulan el contenido máximo de micotoxinas en productos destinados a la alimentación animal. Así, la Comisión Europea, fija los límites máximos para la aflatoxina B1 en alimentos para animales en su directiva 2003/100/CE [6] y aconseja además intensificar el seguimiento de la presencia de micotoxinas producidas por *Fusarium* en cereales y en productos a base de cereales en su Recomendación 2006/576/CE [7], estableciendo niveles máximos recomendados para deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina

A y fumonisinas (suma de fumonisina B_1 y B_2) en productos destinados a animales Más recientemente, de acuerdo con la Recomendación 2013/165/UE [8], se establecieron los límites máximos orientativos para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales y productos a base de cereales para alimentos y para piensos. La UE también sugiere incrementar los estudios de monitoreo de la presencia de estas micotoxinas en productos destinados a la alimentación animal. Además, la aparición simultanea de varias toxinas en un mismo alimento con posibles efectos aditivos y sinérgicos han sido encontrados [9]. Por todo ello, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda el desarrollo de métodos para el análisis simultáneo de múltiples micotoxinas, que, además, deberían ser correctamente validados [1].

Dada la gran diversidad de propiedades químicas y físicas de las micotoxinas, el desarrollo de una preparación de muestra adecuada y de un buen método de detección que permita el análisis simultáneo de un gran número de micotoxinas, no es tarea fácil [10].

Una amplia variedad de mezclas de disolventes de extracción tales como el acetonitrilo, metanol, acetona, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo, todos con agua, y agua se han empleado, siendo la mezcla acetonitrilo: agua (84:16, v / v) la más comúnmente utilizada [11]. Además, buenas recuperaciones para fumonisinas, ocratoxina A y ácido micofenólico se han observado mediante la adición de ácido a este extractante [12]. Varios estudios han descrito procedimientos de purificación en extractos de alimentos destinados a consumo humano y animal, basados en diferentes tipos de extracción sólida (SPE) [13, 14], el uso de columnas de inmunoafinidad para multiples micotoxinas (IAC) [15] y columnas Mycosep [16] y MultiSep [17] que permiten la purificación en un solo paso. Sin embargo, debido a la gran variedad de polaridades y propiedades físicas de las micotoxinas, evitar el paso de limpieza podría ser ventajoso, proporcionando además métodos multi-micotoxinas más rápidos [18]. De este modo, varios métodos QuEChERs (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*) que excluían la etapa de purificación basados en la dispersión en fase sólida (dSPE) fueron desarrollados por varios autores para análisis multi-micotoxinas en ensilados de maíz [19, 20]. Además, métodos rápidos basados en la inyección directa del extracto crudo sin etapa previa de limpieza también han sido propuestos para análisis multi-micotoxinas en distintos tipos de matrices alimentarias [12, 17, 21-25]. Estos métodos de extracción simple, gracias a la utilización de LC-ESI/MS/MS, han permitido la determinación simultánea de varias micotoxinas en extractos que no se sometían a ninguna etapa de purificación [12].

Aunque en los últimos años se han desarrollado métodos multiresiduos para la detección de micotoxinas en muestras de silo de maíz [9, 14, 26-29], debido a la complejidad de esta matriz, pocos métodos han sido debidamente validados [13, 19, 20, 26].

Un método LC-MS/MS y µHPLC-MS/MS fue validado para 6 y 26 micotoxinas respectivamente, en silo de maíz tras una SPE [26], mientras Rasmussen [19] siguiendo un procedimiento QuEChERs sin etapa dSPE con posterior análisis por LC-MS/MS, consiguió validar un procedimiento para 27 micotoxinas, en muestras de ensilado de maiz. Más recientemente, la optimización y validación para una amplia gama de micotoxinas en distintos alimentos para consumo animal, entre los que se encontraba el silo de maíz, ha sido publicada, usando un método QuEChERs seguido de una dSPE del extracto como etapa de purificación [20].

El objetivo del presente estudio era desarrollar y validar un método alternativo para la determinación simultánea de varias micotoxinas en ensilado de maíz utilizando una extracción sólida- líquida simple sin etapa de purificación y con etapa de purificación (columnas Mycospin^{TM} 400), basándose en la detección LC-HESI-MS/MS. El método fue validado para un total de 24 micotoxinas de acuerdo con una estrategia alternativa y simplificada propuesta por Van Loco y Beenaert [30], siguiendo las directrices de la ISO 11843-2 [31] y de la ISO 5725-2 [32].

Este método validado se aplicó a muestras de silo de maíz recogidas en explotaciones lecheras gallegas con el fin de evaluar la presencia y el grado de contaminación con micotoxinas. Los análisis realizados y los resultados obtenidos de dichas explotaciones serán discutidos en la siguiente Sección IV. D.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Patrones empleados. Preparación de las soluciones de trabajo

Se han utilizado estándares individuales de micotoxinas en disolución (acetonitrilo) para toxina T-2 (T-2), verruculogen (VERR), ocratoxina A (OTA), roquefortina C (ROQ-C), ácido penicílico (PA); la mezcla técnica de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2) preparada también en acetonitrilo y estándares de micotoxinas individuales en forma sólida para 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), α-zearalenol (α-ZOL), β-zearalenol (β-ZOL), toxina HT-2 (HT-2), fumonisina B_1 (FB_1), fumonisina B_2 (FB_2), eniantina B (ENN B), eniantina B1(ENN B_1), esterigmatocistina (STE), andrastina A (AND A), alternariol (AOH), penitrem A (PEN A), marcfortina (MAC A) y ácido micofenólico (MPA). En el caso de estos últimos, se prepararon disoluciones de micotoxinas por pesada del material sólido y dilución en acetonitrilo, excepto para FB_1 y FB_2, disueltas ambas en la mezcla acetonitrilo:agua (1:1; v/v).

Con el método multi-micotoxinas planteado se ha hecho indispensable trabajar con una mezcla de micotoxinas como solución de trabajo, preparada por la combinación de alícuotas de cada una de las disoluciones madre individuales y finalmente diluida en acetonitrilo.

Las concentraciones de micotoxinas tanto en las disoluciones madre (individuales) como en la solución mezcla, aparecen detalladas en la siguiente tabla:

Tabla IV.C.1. Patrones de micotoxinas utilizados

Micotoxinas	Patrón individual	Patrón mezcla
	µg mL^{-1}	µg mL^{-1}
15-ADON	1000	25
3-ADON	1000	25
AFB_1	2	1
AFB_2	0,5	0,3
AFG_1	2	1
AFG_2	0,5	0
AND A	10,0	1

AOH	500	20
DON	10000	50
ENN B	100	5
ENN B_1	100	5
FB_1	500	4
FB_2	500	4
HT-2	1000	25
MAC A	100	0,5
MPA	600	20
OTA	10	1,5
PA	100	10
PEN A	1000	30
ROQ-C	100	2
STE	100	2
T-2	100	0,5
VERR	100	2
α-ZOL	5000	30
β-ZOL	5000	30
ZEA	900	5

Además, la solución mezcla de micotoxinas ha sido diluida (1:10, v/v), para la preparación de las curvas de calibrado y el estudio del efecto matriz, como se explica en los siguientes apartados.

2.2. Fortificación de la muestra

Dado que no se dispone de materiales de referencia certificados para micotoxinas en ensilaje, el desarrollo y validación del método analítico muti-micotoxinas se realizó con ensilado de maíz procedente de la granja experimental del *Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo* (CIAM, Abegondo, A Coruña). Este silo, utilizado como blanco, fue secado durante 2 días a 40°C, molido con un tamaño de tamiz de 1 mm y conservado a 4°C hasta que el desarrollo del estudio tuvo lugar.

La fortificación de la muestra se llevo a cabo mediante la adición de distintos volúmenes de la disolución mezcla de micotoxinas preparada en acetonitrilo (Tabla IV.C.1). Las muestras fortificadas se dejaron reposar 30 minutos antes de proceder a su extracción, permitiendo de esta forma interacciones entre los analitos y la matriz.

2.3. Procedimientos de extracción y de purificación utilizados

Se pesó un gramo de silo de maíz molido en un tubo cónico de polipropileno de 50 mL, sobre el que se adicionaron 10 mL de acetonitrilo:agua (84:16; v/v) conteniendo un 1% de ácido acético. La mezcla fue agitada en un agitador orbital durante 90 minutos a 220 rpm y tras la agitación, el sobrenadante fue filtrado usando papel de filtro Whatman N.4.

En el desarrollo del método multi-micotoxinas que se discute a lo largo de esta sección, un paso de purificación utilizando columnas Mycospin^{TM} 400 Multi-toxin fue evaluado. Para ello, el filtrado obtenido anteriormente se dividió en dos alícuotas, siendo sólo una de ellas purificada con dichas columnas.

Una alícuota de 500 µL del extracto filtrado fue evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno y reconstituido en 500 µL de agua:metanol (80:20; v/v) conteniendo 3mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico, siendo ésta la concentración de la fase móvil en el momento de inyección en el cromatógrafo de líquidos. El extracto obtenido se filtró con un filtro de jeringa de PTFE de 0,45 µm.

Por otro lado, una segunda alícuota de 800 µL del extracto filtrado fue transferida a la columna Mycospin, agitada durante 1 minuto y posteriormente centrifugada en microcentrífuga durante 30 minutos a 10.000 rpm. A continuación, 500 µL de extracto purificado fue evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno y reconstituido en 500 µL de fase móvil.

Los extractos procedentes de ambas alícuotas (purificado y sin purificar) se analizaban a continuación en el LC-MS/MS.

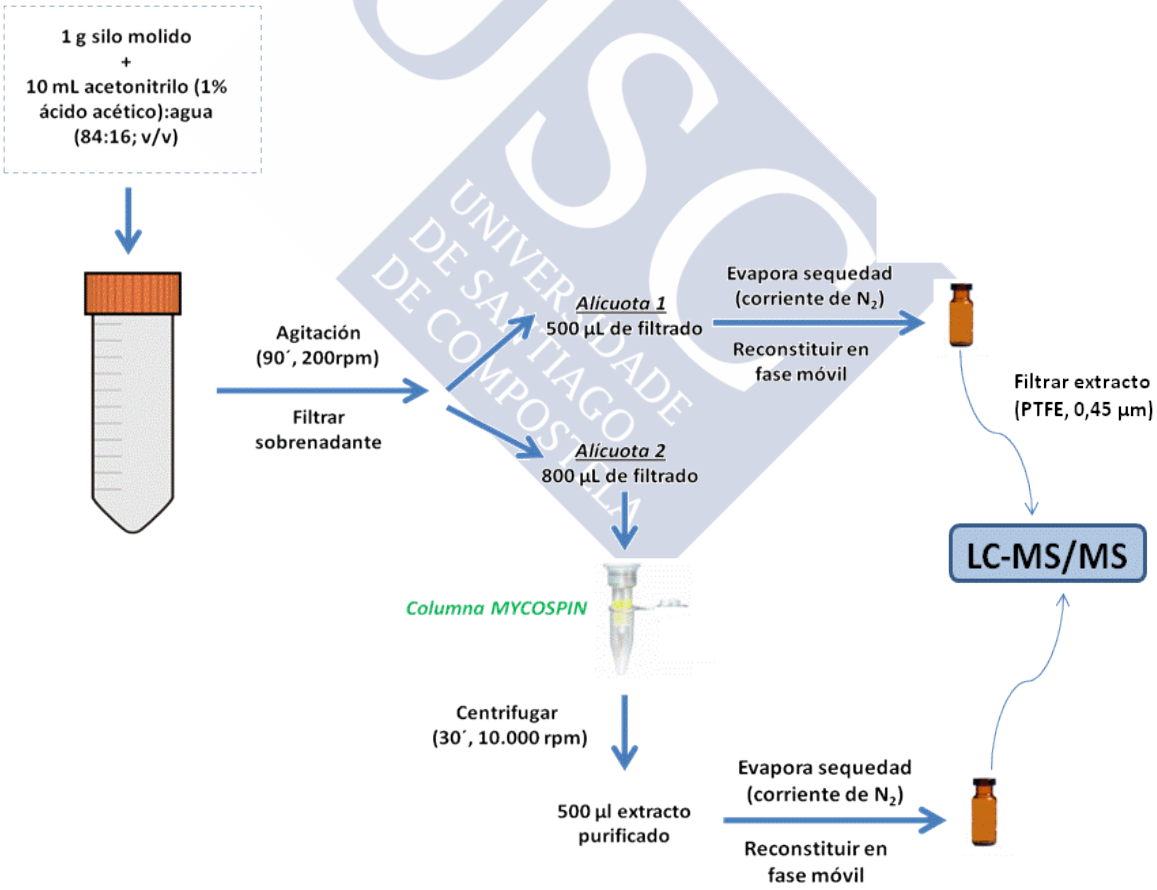


Figura IV.C.1. Procedimiento de extracción de micotoxinas en silo de maíz con y sin etapa de purificación (columna Mycospin)

2.4. Preparación de las curvas de calibrado

Dos tipos de curvas de calibrado han sido necesarias para la evaluación de parámetros analíticos de calidad de los métodos presentados, y serán discutidos posteriormente.

Por un lado, se han preparado curvas de calibración bajo la técnica "*matrix-matched calibration"*, que consistía en la elaboración de patrones de calibración preparados mediante la adición de distintos volúmenes de la solución de trabajo mezcla de micotoxinas (diluida 1:10, v/v) a extractos blancos de silo obtenidos a partir del procedimiento de extracción descrito anteriormente, conteniendo para todos los niveles un 100% de matriz silo de maíz.

Por otro lado, se han preparado curvas de calibración estándar por evaporación a sequedad de volúmenes adecuados de la solución trabajo mezcla de micotoxinas (diluida 1:10, v/v) y posterior reconstitución en 500 µL de agua:metanol (80:20; v/v) conteniendo 3mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico (fase móvil). Ambos tipos de curvas fueron realizadas a ocho niveles de concentración en el rango:

Tabla IV.C.2. Rangos de concentración de las micotoxinas en las curvas de calibrado

	Rango concentración µg L^{-1}	
3+15-ADON	177	2274
AFB_1	0,2	11
AFG_1	0,2	11
AND A	6,0	46
AOH	70,4	903
DON	134	1719
ENN B	10	132
ENN B_1	18	132
FB_1	20	150
FB_2	20	152
HT-2	87,1	1126
MAC A	1,7	21
MPA	72,4	926
OTA	5,4	69
PA	42	327
PEN A	100	1310
ROQ-C	7,2	92
STE	8,4	108
T-2	1,7	21,6
VERR	6,9	89
α-ZOL	88,3	1133
β-ZOL	83	1063
ZEA	15,5	199

2.5. Detección y cuantificación mediante LC-MS/MS

2.5.1. Preparación de fases móviles

Las fases móviles utilizadas para realizar los análisis en el LC-MS/MS fueron el agua y el metanol, ambas tamponadas con formiato amónico a concentración 3 mM y acidificadas con ácido fórmico al 0,1%.

Para la preparación de las mismas, se utilizaron disoluciones intermedias de formiato amónico en agua y en metanol, ambas a concentración de 300 mM, a partir de las cuales se prepararon en matraces aforados de 250 y 500 mL las disoluciones a concentración de 3 mM. Se adicionó en cada una de ellas el volumen pertinente de ácido fórmico para lograr la presencia del mismo al 0,1% del volumen total.

2.5.2. Condiciones cromatográficas y del detector de masas empleadas

La detección y cuantificación de las micotoxinas se realizó en un equipo LC-MS/MS TSQ Quantum Access de triple cuadrupolo equipado con una fuente de ionización por electrospray HESI, y el modo de adquisición fue SRM (Selected Reaction Monitoring), con ionización positiva y negativa. Las condiciones cromatográficas y del detector masas se resumen en la Tabla IV.C.3.

Se inyectaron 20 µL tanto de los patrones de micotoxinas como de los extractos de silo, mantenidos en el automuestrador a una temperatura de 10°C.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Optimización de las condiciones del LC-MS/MS

Se han optimizado principalmente los aspectos relacionados con la detección, esto es, la ionización y las energías de colisión de las micotoxinas.

De entre todos los parámetros a ser evaluados para una adecuada ionización, la selección de la composición de la fase móvil y del modo de ionización ESI (positivo o negativo) son dos de los más importantes, ya que de ellos dependerán las repuestas obtenidas y, por lo tanto, la sensibilidad.

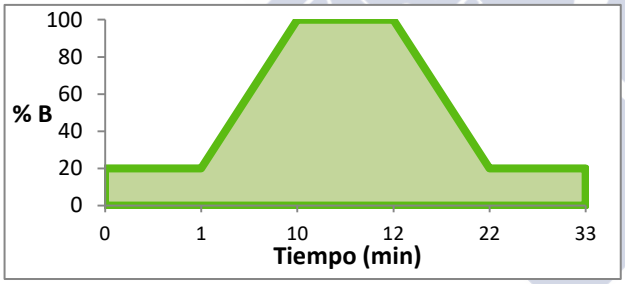
Se observó que mientras la mayoría de las micotoxinas se detectaban mejor en el modo de ionización positivo, otras como la ZEA, MPA, α-ZOL, β-ZOL, PEN A, AOH y AND A sólo ionizaban en el modo negativo. Ambos modos de ionización resultaron ser eficaces para micotoxinas como la FB_1, FB_2 y la OTA, siendo, para todas ellas, la señal más intensa cuando se trabajaba en modo positivo. Fue por tanto este modo el seleccionado para estas tres micotoxinas.

En relación con la composición de la fase móvil, se han obtenido mejores respuestas mediante el uso de la mezcla de disolvente metanol/agua, en comparación con la mezcla acetonitrilo/agua. Esto mismo ya había sido señalado por otros autores [12, 17], y podría atribuirse a que dada la naturaleza prótica del metanol, el uso de este disolvente mejoraría la respuesta de los iones $[M+H]^+$ en el modo positivo [33].

Tabla IV.C.3. Condiciones LC-MS/MS empleadas para el análisis multi-micotoxinas

COLUMNA		
KINETEX (Phenomenex)	Fase estacionaria	C18
	Dimensiones	100×2.1mm
	Tamaño de partícula	3 µm
	Tamaño de poro	100 Å
	Temperatura	25°C

FASE MÓVIL			
Régimen	Gradiente		
A	Agua con ácido fórmico al 0,1% y formiato amónico (3mM)		
B	Metanol con ácido fórmico al 0,1% y formiato amónico (3mM)		
Flujo	200 µL min^{-1}		
Temperatura	25°C		
Gradiente de fase móvil	**Tiempo** (min)	**% A**	**% B**
	0	80	20
	1	80	20
	10	0	100
	12	0	100
	22	80	20
	33	80	20



DETECTOR		
Modo de ionización	**Positivo**	**Negativo**
Voltaje del spray (V)	3000	2500
Tª del vaporizador (°C)	250	70
Tª del capilar (°C)	350	350
Gas de impulsión (u.a.)[1]	38	38
Gas auxiliar (u.a.)	5	5
Voltaje del *skimmer ofset* (V)	4	4
Tiempo de scan (mseg)	50	50
Presión argón (mbares)	0,002	0,002
Cono de barrido de iones (u.a.)[1]	3	3

[1]**unidades arbitrarias (u.a)**

Por otra lado, la presencia de grupos carboxílicos en la estructura molecular de las fumonisinas, exigía trabajar en condiciones cromatográficas ácidas [34]. De modo que ambas fases móviles fueron acidificadas con ácido fórmico (al 0,1 %) que proporcionó mejores intensidades de señal para las FB_1, FB_2 , así como para la OTA.

A pesar de que la mayoría de micotoxinas estudiadas ionizaban en modo positivo formando iones $[M+H]^+$, las micotoxinas T-2, HT-2, no presentaron ionización en la forma protonada. La mejor manera en la que dichas micotoxinas ionizaban era mediante la formación de aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ .Esto hizo necesario el trabajar con fases móviles tamponadas. Teniendo todo esto en cuenta, la fase móvil seleccionada fue el agua /metanol, conteniendo ambos tampón formiato amónico a una concentración 3 mmol L^{-1} y 0,1% de ácido fórmico.

Las energías de colisión de las transiciones MS/MS fueron optimizadas introduciendo patrones de micotoxinas de concentración 1 µg mL^{-1}, preparados en fase móvil (agua:metanol (80:20; v/v) conteniendo 3mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico. Trabajar con los patrones preparados en fase móvil, en lugar de acetonitrilo, contribuía a la ionización permitiendo una mejor selección de las transiciones adecuadas que aparecen detalladas en la Tabla IV.A.4.

Las diferentes condiciones de LC-MS/MS requeridas para cada micotoxina, no hicieron posible realizar un cambio de polaridades en una misma analítica, de modo que se dividió en dos ciclos cromatográficos, uno modo de ionización positivo y otro negativo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla IV.C.4. Tiempos de retención y parámetros MS/MS optimizados para el análisis de las micotoxinas

Analito	T_R (min)	Ionización	Ion precursor	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Energías de colisión (eV)
PA	4,7	HESI +	[M+H]+	171,1	72,3 / 125,2 / 153,4	23 / 23 / 11
DON	2,7	HESI +	[M+H]+	297	91,5 / 203,0 / 231,1 / 249,1/ 279,0	42 / 17/ 14 / 11 /11
AFB_1	8,3	HESI +	[M+H]+	313	141,2 / 285,1	49 / 23
AFG_1	7,7	HESI +	[M+H]+	329	199,1 / 214,2 / 243,1	52 / 33 / 29
3+15-ADON	6,5	HESI +	[M+H]+	339,1	137,0 / 202,9 / 213,1 / 231,0 / 261,1 / 321,0	14 / 17/ 17 / 12 / 11/ 5
ROQ-C	9,2	HESI +	[M+H]+	390,2	193,0 / 198,1 / 322,1	27 / 28 / 28
OTA	11	HESI +	[M+H]+	404,1	221,1/ 238,9 / 358,0	36 / 25 / 14
HT-2	9,3	HESI +	[M+NH4]+	442	105,3 / 145,2 / 263,1 / 425,4	7 / 13 / 22 / 37
T-2	9,9	HESI +	[M+NH4]+	484,4	143,2 / 169,0 / 305,2	15 / 32 / 33
VERR	11	HESI +	[M-H2O]+	494,3	199,1 / 227,1 / 352,1	40/ 32 / 16
FB_2	10,5	HESI +	[M+H]+	706,4	318,3 / 336,1 /354,4	35 / 35 / 34
FB_1	9,5	HESI +	[M+H]+	722,3	334,2 / 352,1	42 / 33
ENN B	12,4	HESI +	[M+H]+	640,1	86,3 / 196,0 / 214,2	49 / 29 /26
ENN B_1	12,5	HESI +	[M+H]+	654,1	195,9 / 210,0/ 214,0	29 / 28 / 27
STE	10,9	HESI +	[M+H]+	324,9	141,2 / 241,1/ 285,1	50 /40 / 20
MAC A	8,7	HESI +	[M+H]+	478,1	148,2/ 176,1 / 188,2 / 450,1	19 / 41/ 43/ 42
α-ZOL	9,5	HESI -	[M-H]-	318,8	129,9 / 159,9 / 173,9 / 275,1	40 / 34 / 26 / 24
β-ZOL	9,50	HESI -	[M-H]-	318,8	129,9 / 159,9 / 173,9 / 275,1	40 / 34 / 26 / 24
PEN A	11,80	HESI -	[M-H]-	632,0	418,9 / 545,9 / 548,6 / 586,3	38 / 34 / 5 / 5
AND A	11,00	HESI -	[M-H]-	485,0	123,3 / 166,8 / 180,8 / 181,8	57 / 52 / 48 / 43
AOH	9,500	HESI -	[M-H]-	256,8	146,9 / 156,7 / 188,6 / 212,6	35/ 29 / 29 / 24
ZEA	10,500	HESI -	[M-H]-	317,1	130,4 / 159,6 / 175,0 / 187,0	36 / 39 / 26 / 26
MPA	9,700	HESI -	[M-H]-	319,1	191,1 / 243,3 / 245,1 / 275,1	18 / 25 / 22/ 26

3.2. Evaluación del método de extracción

El ensilado de maíz es una matriz compleja que no solo contiene componentes característicos de la planta, como clorofilas y carotenoides, sino también productos derivados del proceso de fermentación [20]. La complejidad de esta matriz se ha tenido en cuenta a la hora de plantear el método de extracción.

El primer ensayo de extracción de micotoxinas planteado en silo de maíz, se basaba en el uso de un método QuEChERS, similar al propuesto por Rasmussen [19]. Consistía en la adición de 20 mL de una mezcla acetonitrilo/agua/ácido acético (79:20:1) a 1 gramo de silo de maíz. Posteriormente, se añadían 0,167 g de acetato de sodio y 0,4 g de sulfato de magnesio, agitando vigorosamente tras la adición de cada una de las sales. Después de una etapa de centrifugación (10 minutos, 4500 rpm, 20°C), una alícuota de 10 mL del sobrenadante, se evaporaba hasta un volumen de aproximadamente 3 mL con la ayuda de un evaporador a vacío en combinación con una bomba de vacío (80°C, 250 mbares) y de un recirculador de agua que proporcionaba un flujo de agua a una temperatura de 7,5°C. Una vez alcanzado el volumen 3 mL, el residuo era evaporado a sequedad con corriente de nitrógeno y finalmente reconstituido en 1 mL de fase móvil agua:metanol (80:20; v/v) conteniendo 3mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico. Antes de su inyección en el LC-MS/MS, el extracto se hacía pasar por un filtro PTFE de 0,22 µm.

En pruebas previas se fortificó una muestra de silo con algunas de las micotoxinas de interés y se compararon las áreas cromatográficas obtenidas con las de un patrón preparado en matriz silo, a partir de las cuales se calcularon los rendimientos de recuperación que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla IV.C.5. Recuperaciones obtenidas con el método QuEChERS

Analito	Concentración	Recuperación
	µg kg^{-1}	%
PA	40,4	68,5
DON	220,0	110,4
AFB_1	10,1	70,9
AFG_1	10,1	99,9
3-ADON	45,5	59,7
ROQ-C	41,8	5,2
OTA	47,0	27,5
HT-2	46,8	56,3
T-2	43,7	30,1
VERR	64,6	10,0
FB_1	45,2	3,5
FB_2	45,5	4,8
ZEA	100,0	4,6
MPA	400,0	89,6

A pesar de que los resultados de recuperación obtenidos en esta primera prueba, mostraban una buena recuperación para el DON, AFB_1 y AFG_1 y los ácidos micofenólico y

penicilíco, los bajos rendimientos de recuperación obtenidos para el resto de las micotoxinas de interés, principalmente OTA, FB_1, FB_2, T-2, ZEA y ROQ-C, creó la necesidad de emplear otra técnica de extracción en ensilados de maíz.

De modo que, otro procedimiento simple, rápido y sencillo de extracción sólido/líquido fue planteado. Así mismo, el uso de una etapa de purificación del extracto con columnas Mycospin^{TM} 400 Multi-toxin también fue evaluado. Ambos procedimientos han sido detallados previamente en el apartado 1.3 de esta Sección.

Al igual que el método QuEChERS planteado con anterioridad, el extractante seleccionado consistía en una mezcla acetonitrilo:agua (84:16; v/v) conteniendo un 1% de ácido acético. Estudios anteriores han demostrado mejor eficacia extractiva del acetonitrilo en comparación con el metanol en la extracción de micotoxinas en distintas matrices [12]. Por otra parte, la acidificación del extractante también ha mostrado mejorar los porcentajes de recuperación para micotoxinas de carácter ácido tales como las fumonisinas, OTA o MPA [12, 13]. Además, para una matriz tan sensible al pH como es el silo, la extracción a pH bajo resulta ser especialmente importante [19, 20].

3.2.1. Evaluación de la eficacia

Con el fin de evaluar la eficacia de estos dos métodos propuestos: extracción sólido-líquido sin etapa de purificación y extracción sólido-líquido con etapa de purificación, el cálculo de las recuperaciones de ambos fue llevada a cabo.

Como no todas la micotoxinas objeto de estudio tienen límites máximos de residuos establecidos para alimentación animal, un nivel *"cuttoff"* (CoV) fue establecido para cada una de las micotoxinas antes del estudio de evaluación que se discute en el presente apartado [35]. Experimentos preliminares destinados a la evaluación de los límites de cuantificación de las micotoxinas en muestras de ensilado de maíz se han realizado con el fin de evaluar tales niveles (CoV).

Por tanto, para evaluar la eficacia de estos dos métodos y evaluar la necesidad de un etapa de purificación, antes de la extracción, se realizó el fortificado por triplicado (n=3) de muestras de silo de maíz blanco a tres niveles de concentración (0,5xCoV, 1xCoV y 1,5xCoV). Dicho proceso fue llevado a cabo para ambos métodos, tres días independientes, lo que resultó en un total de 27 experimentos para cada método (3 repeticiones x 3 niveles de concentración x 3 días).

Las recuperaciones venían dadas por la relación entre el valor de la concentración de cada micotoxina en dichos experimentos obtenidas a partir de las curvas de calibración *"matrix-matched"* (ver apartado 2.4 de esta Sección) y los valores de concentraciones teóricos.

Las recuperaciones obtenidas con ambos métodos vienen detalladas en las siguientes tablas:

Tabla IV.C.6. Recuperaciones obtenidas a tres niveles para las micotoxinas SIN etapa de purificación

Analito	0,5xCoV (µg kg-1)	Recuperación (%)	RSD (%)	1,0xCoV (µg kg-1)	Recuperación (%)	RSD (%)	1,5xCoV (µg kg-1)	Recuperación (%)	RSD (%)
PA	66,9	82,6	12,8	134,7	77,4	7,5	203,9	80,8	1,7
DON	351,2	78,8	2,7	706,6	77,2	10,8	1069,9	77,5	3,1
AFB_1	4,7	98,9	16,7	9,7	87,8	16,8	14,5	84,4	11,7
AFG_1	4,6	92,4	7,9	9,6	93,3	8,6	14,4	90,7	8,1
3+15-ADON	464,6	81,3	7,4	934,6	75,9	8,2	1415,3	79,6	2,8
ROQ-C	18,8	59,8	2,6	37,9	50,5	1,4	57,4	45,9	4,8
OTA	14,1	141,0	17,7	28,5	127,2	10,5	43,1	112,0	12,6
HT-2	230,1	82,0	12,9	462,8	75,7	14,1	700,8	78,8	6,0
T-2	4,4	71,6	5,6	8,9	77,1	12,8	13,5	84,8	5,0
VERR	18,1	71,1	8,9	36,1	63,9	4,7	55,3	58,7	5,9
FB_1	30,6	110,4	2,8	61,5	108,1	9,2	93,2	113,8	2,0
FB_2	31,1	71,4	1,1	62,5	65,1	3,5	94,7	62,1	10,6
ENN B	26,9	57,4	5,8	54,2	49,5	2,1	82,0	46,7	6,5
ENN B_1	47,3	55,1	2,5	95,2	46,1	4,6	144,2	47,5	6,1
STE	22,0	67,9	8,5	44,2	58,5	4,1	67,0	55,0	5,9
MAC A	4,4	74,6	6,7	8,8	67,2	5,5	13,4	65,2	3,6
α-ZOL	231,6	73,9	1,6	465,8	62,7	2,9	705,4	58,8	5,3
β-ZOL	217,2	82,7	3,4	436,9	73,8	2,7	661,6	67,9	4,9
PEN A	268,7	126,5	11,4	540,5	70,2	7,3	818,4	56,9	6,8
AND A	9,4	72,0	1,7	18,8	61,7	1,7	28,5	57,3	9,3
AOH	184,5	67,4	5,7	371,2	58,0	3,1	562,1	57,2	6,4
ZEA	40,6	84,1	6,9	81,7	72,2	4,1	123,7	64,2	5,7
MPA	93,1	93,1	4,3	380,7	82,0	9,5	576,5	78,0	4,0

Tabla IV.C.7. Recuperaciones obtenidas a tres niveles para las micotoxinas CON etapa de purificación

Analito	0,5xCoV (µg kg-1)	Recuperación (%)	RSD (%)	1,0xCoV (µg kg-1)	Recuperación (%)	RSD (%)	1,5xCoV (µg kg-1)	Recuperación (%)	RSD (%)
PA	66,2	85,6	14,0	133,8	57,8	3,4	203,7	51,8	22
DON	346,5	102,6	21,3	694,2	94,9	13,5	1057,7	96,3	7,2
AFB_1	7,3	92,3	19,8	14,8	117,4	35,6	22,4	84,9	16,5
AFG_1	7,2	83,8	18,9	14,7	88,5	25,5	22,2	78,6	24,0
3+15-ADON	465,7	103,8	7,8	944,8	99,7	12,0	1429,9	101,4	7,3
ROQ-C	18,6	97,4	34,3	37,7	132,1	48,5	57,3	120,8	35,1
OTA	19,6	32,8	6,5	39,9	39,0	10,9	60,6	38,4	9,9
HT-2	227,0	101,5	13,3	454,7	103,1	18,7	692,8	111,1	15,2
T-2	4,4	99,9	9,7	8,8	99,1	12,1	13,5	107,2	7,6
VERR	17,9	100,1	36,9	35,9	144,8	49,2	55,2	129,5	50,2
FB_1	*no se detecta*			*no se detecta*			*no se detecta*		
FB_2	*no se detecta*			*no se detecta*			*no se detecta*		
ENN B	26,6	97,1	39,0	53,8	133,2	37,2	81,9	101	8,5
ENN B_1	46,8	92,3	38,4	94,6	140,0	49,3	144,0	95,5	6,7
STE	21,7	109,9	37,6	43,9	150,8	36,2	66,9	122,8	11,2
MAC A	4,3	98,5	24,4	8,8	115,9	27,4	13,3	112,9	22,3
α-ZOL	229	90,0	14,7	462,8	113,0	14,5	704,6	107	11
β-ZOL	214,8	51,6	0,4	434,1	55,1	1,0	660,9	57,5	5,8
PEN A	265,7	166,7	77,1	536,9	260,7	111,8	817,5	159,1	11,5
AND A	9,3	106,4	7,5	18,7	105,8	4,2	28,5	100	6,5
AOH	*no se detecta*			*no se detecta*			*no se detecta*		
ZEA	40,2	113,1	17,8	81,1	131,2	10,6	123,6	113,7	10,4
MPA	187,2	24,6	3,8	378,2	23,9	1,5	575,9	24,2	1,3

Como se puede observar en los datos expuestos en la tabla anterior, el uso de la etapa de purificación con columnas Mycospin proporcionaba unas recuperaciones favorables (>97%) en la mayoría de las casos, excepto para OTA, MPA y PEN A, cuyas recuperaciones alcanzaban el 36.8 %, 24,2% y 195,5%, respectivamente. Sin el uso de la etapa de limpieza, los valores medios de las recuperaciones para las micotoxinas estudiadas resultaron estar en un rango comprendido entre 60 y el 127%, excepto para ROQ-C y para las eniantinas.

Por otro lado, el uso de columnas Mycospin no permitía la recuperación de las fumonisinas y del AOH de los extractos de ensilado de maíz. Este fenómeno, podría ser debido a una retención de las fumonisinas en el material adsorbente de las columnas de purificación, lo que provocaría la pérdida total de estas moléculas cuando los extractos se someten a la etapa de limpieza. No obstante, es importante destacar que tales columnas Mycospin, proporcionadas por la casa comercial Romer Labs, tan solo habían sido utilizadas en distintos materiales (granos, silos, piensos) para micotoxinas tales como ZEA, T-2, HT-2, DON, 3 y 5 ADON, OTA, aflatoxinas, nivalenol, fusarenon-X diacetoscirpenol y neosolaniol, pero no para las demás micotoxinas estudiadas en este trabajo, como las fumonisinas y el AOH.

Además, teniendo en cuenta que la desviación estándar relativa (RSD) es una media asociada al grado de variabilidad de los datos, los valores de RSD obtenidos para el método de extracción que incluía la etapa de limpieza, pusieron de manifiesto una alta e inaceptable variabilidad (> 20%) asociada a las recuperaciones obtenidas con dicho procedimiento. En cambio, sin el uso de las columnas Mycospin las RSD no superaron el 11%, excepto para AFB_1, cuyo valor de RSD alcanzó el 15%.

Los resultados obtenidos sugerían que, aun habiendo proporcionado mejores valores de recuperación para la mayoría de las micotoxinas, incluir la etapa de purificación basada en el uso de columnas Mycospin no constituía mejora en la extracción simultánea de micotoxinas en muestras de silo de maíz debido a su poca precisión.

Por todo ello, el método de extracción sólido-líquido más sencillo, aquel que no incluía el uso columnas de purificación Mycospin, fue el que resultó ser más idóneo y el que se aplicaría en las muestras de silos reales que se discutirán en la siguiente Sección IV. D.

Así mismo, existen trabajos previos, en los que la posibilidad de un análisis simultaneo de varias micotoxinas en extractos sin etapa de limpieza previa mediante LC-MS/MS utilizando la fuente de ionizacion ESI, ya había sido empleada [12, 21].

3.2.2. Evaluación del efecto matriz

El efecto de supresión o aumento de iones en la fuente de ionización por interferencias con la matriz se evaluó para cada micotoxinas con los dos métodos anteriores (con y sin etapa de purificación).

Este efecto matriz (*matrix* effect, ME) se estudió mediante la comparación de las pendientes obtenidas con la curva de calibración *"matrix-matched"* (n=3) (A_{matriz}) con la curva de la calibración estándar ($A_{estándar}$), para el mismo intervalo de la concentración (ver apartado 1.4 de esta Sección), según la siguiente fórmula:

$$ME\ (\%) = [A_{matrix} / A_{\ estándar})] * 100 - 100$$

La presencia de componentes de la matriz que co-eluyen con el analito de interés puede tener un efecto adverso en sus respuestas analíticas cuando se trabaja con una fuente de ionización tipo ESI, lo que se traduce en una disminución (supresión de iones) o aumento de la señal analítica.

En la siguiente figura muestra el ME para cada una de las micotoxinas estudiadas en muestras de ensilado de maíz con el método de extracción sin etapa de purificación:

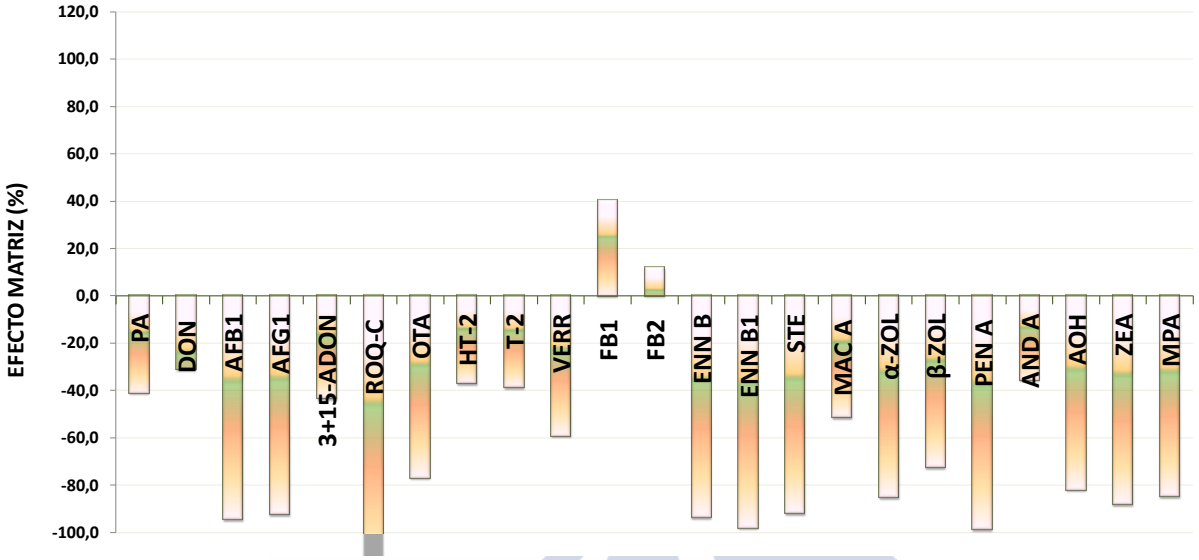


Figura IV.C.2. Representación del ME (%) para las micotoxinas extraídas de muestras de silo de maíz sin etapa de purificación

De acuerdo con las actuales directrices, el ME podría considerarse tolerable en un rango de entre -20% (relacionado con la supresión de iones) y 20% (en relación con el aumento de señal) [36]. Tal y como se puede apreciar en la Figura IV.C.2, los ME para todas las micotoxinas evaluadas se encontraban fuera de este rango. Los resultados indicaron que la mayor supresión de iones era la que presentaban AFB_1, AFG_1, OTA, ROQ-C, MPA, ENN B, $ENNB_1$, STE y AOH, con porcentajes entre el 70 y 120%. Por el contrario, se observó aumento de la señal analítica (aumento de iones) para las fumonisinas, no siendo éste muy pronunciado para la FB_2 (11,9%).

En la Tabla IV.C.8. se presenta una comparativa de los valores del ME para los dos métodos propuestos. Además, sabiendo que las micotoxinas FB_1, FB_2 y la OTA presentaban ionización también en el modo negativo, sus ME en dicho modos también fueron evaluados y presentados.

Como se puede observar en la tabla, incluso cuando se incluía la etapa de purificación, los valores de ME para las micotoxinas en muestras de ensilado de maíz continuaban siendo muy elevados para la mayoría de ellas, suponiendo una supresión de iones que oscilaba desde aproximadamente un 96% (AFB1 y ROQ-C) hasta el 23% (DON y OTA). Estos valores son similares a los obtenidos sin usar cartuchos Mycospin. Sin embargo, en el caso de OTA, AND A y MPA, la supresión de iones se vio fuertemente disminuida cuando se utilizaba la etapa de limpieza.

Tabla IV.C.8. Comparación de los valores del ME para las micotoxinas extraídas con los dos métodos de extracción propuestos y analizadas por LC-HESI-MS/MS

	Con etapa de purificación	***Sin etapa de purificación***	
Analito	**HESI +**	**HESI +**	**HESI -**
PA	-68,9	-41,1	
DON	-23,1	-31,1	
AFB_1	-96,3	-94,4	
AFG_1	-94,0	-92,4	
3+15-ADON	-31,2	-43,1	
ROQ-C	-109,1	-120,1	
OTA	-26,9	-76,7	-65,3
HT-2	-31,4	-37,0	
T-2	-38,9	-38,6	
VERR	-75,2	-59,0	
FB_1	ND	40,4	65,8
FB_2	ND	11,9	306,7
ENN B	-85,9	-93,7	
ENN B_1	-88,7	-98,1	
STE	-83,6	-91,9	
MAC A	-66,5	-51,2	
α-ZOL	-84,2	-85,1	
β-ZOL	-68,3	-72,3	
PEN A	-93,2	-98,5	
AND A	-24,2	-35,5	
AOH	ND	-82,0	
ZEA	-86,0	-87,9	
MPA	-57,9	-84,8	

Por otro lado, la existencia de un marcado ME para las micotoxinas en el modo de ionización negativo también ha sido confirmado, siendo el aumento de la señal para las fumonisinas mucho más elevado que el presentado en el modo de ionización positivo y especialmente pronunciado para la FB_2 (300,6%).

Concluyendo, el elevado ME, debido a la presencia de pigmentos, lípidos o productos de fermentación abundantemente presentes en ensilajes de maíz y tan común en la técnica de espectrometría de masas, fueron compensados mediante el uso de curvas de calibración que contenían un 100% de matriz (“*matrix-matched calibration”)*, siendo este tipo de calibración la utilizada para llevar a cabo la validación del método multi-micotoxinas en muestras de silo.

Otra posible estrategia para minimizar el ME y mejorar la calidad de los resultados analíticos, implicaría el uso de patrones internos marcados con isótopos (IS) para alguna de esas micotoxinas. Sin embargo, emplear compuestos marcados para cada micotoxina se traduciría en un coste analítico alto y un solo IS no podría compensar el ME para cada

compuesto en la matriz considerada. El uso de calibración "*matrix-matched*" ha evitado la necesidad del uso de estos isótopos marcados.

3.3. Parámetros de calidad del método

La Decisión 2002/ 657 de la Comisión Europea [37] por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, describe el protocolo de validación y los parámetros de calidad de métodos analíticos relacionados con el control en matrices alimentarias. Siguiendo este procedimiento, una gran cantidad de determinaciones analíticas tienen que ser realizadas para obtener los parámetros de calidad requeridos, lo que se traduce en un gran consumo de material y tiempo.

Como estrategia para simplificar este proceso, un método de validación alternativo propuesto por Van Loco [30], basado en las normas de calidad ISO 11843-2 [31] e ISO 5275-2 [32] y que cumple con las especificaciones propuestas por la Decisión 2002/657/ CE [37] sobre la actuación para proceder a la validación de métodos analíticos relacionados con matrices alimentarias, ha sido el desarrollado para validar el método analítico multi-micotoxinas (con y sin etapa de limpieza) en muestras de ensilados de maíz. De este modo, distintos parámetros de calidad del método de extracción sólido-liquido anteriormente presentado, tales como linealidad, efecto matriz, límites de detección y cuantificación instrumental, recuperaciones, repetibilidad y reproducibilidad, límites de decisión (CCα) y capacidad de detección (CCβ), han sido evaluados.

Para llevar a cabo el estudio de calidad del método, se fortificaron muestras de silo de maíz con las micotoxinas a concentraciones de 0,5, 1, 1,5 veces el nivel CoV Esto se ha realizado por triplicado y durante tres días, lo que proporcionó un total de 27 muestras de silo de maíz. La determinación de la recuperación, repetibilidad, reproducibilidad, límites de decisión (CCα) y capacidad de detección (CCβ), se hizo de forma simultánea a partir de estas 27 determinaciones.

A continuación se detalla el cálculo de los parámetros de calidad del método desarrollado:

3.3.1. Linealidad y límites de detección y cuantificación

Teniendo en cuenta algunos de los principales aspectos de la validación de un método analítico establecido por la Comisión Europea [37], se ha considerado el estudio de linealidad de las calibraciones externas para todas las micotoxinas estudiadas. Para ello, cinco rectas de calibrado independientes han sido evaluadas, con siete niveles de concentración en los rangos que se presentan en la Tabla IV.C.9.

Estas curvas de calibrado han sido preparadas por evaporación a sequedad de volúmenes adecuados de una solución mezcla de micotoxinas, posteriormente reconstituidos en agua:metanol (80:20; v/v) conteniendo 3mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico (fase móvil).

Por tanto, cinco curvas de calibración con siete niveles de concentración se obtuvieron para cada una de las micotoxinas.

A partir de los datos obtenidos, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante la aplicación del test F de Fisher y del test Q de Cochran a un nivel de confianza α=1% para evaluar respectivamente la linealidad del modelo y la homogeneidad de las varianzas. Para las 24 micotoxinas estudiadas, ambos tests han proporcionado resultados satisfactorios, por lo que se pudo afirmar que todas las calibraciones fueron lineales en el rango de concentración estudiado.

Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos para cada micotoxina y el intervalo de linealidad se presentan en la Tabla IV.C.9.

Además, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) también han sido determinado a partir de las curvas de calibración estándar (y = ax + b), de acuerdo con las formulas:

$$LOD = b + 3sb / a$$
$$LOQ = b + 10sb / a$$

Donde: b es la ordenada en el origen (o intercepto), sb la desviación estándar del valor de b, y a es la pendiente de la curva de calibración estándar. Los valores de LOD y LOQ obtenidos aparecen detallados en la Tabla IV.C.9.

Tabla IV.C.9. Linealidad y límites de detección y de cuantificación para las micotoxinas

Analito	Rango linealidad	Coeficientes de determinación	LODs	LOQs	LODs	LOQs
	µg L^{-1}	R^2	µg L^{-1}	µg L^{-1}	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}
PA	42-327	0,9956	8,5	28,2	4,2	14,1
DON	134-1719	0,9971	34,2	113,9	17,1	57,0
AFB_1	0,2-11	0,991	0,05	0,17	0,03	0,08
AFG_1	0,2-11	0,997	0,05	0,17	0,03	0,08
3+15-ADON	177-2274	0,9987	1,6	5,2	0,8	2,6
ROQ-C	7,2-92	0,9956	0,68	2,26	0,3	1,1
OTA	5,4-69	0,9956	0,29	0,97	0,15	0,48
HT-2	87,1-1126	0,9915	4,9	16,2	2,4	8,1
T-2	1,7-21,6	0,9985	0,29	0,96	0,1	0,5
VERR	6,9-89	0,9973	0,7	2,4	0,4	1,2
FB_1	20-150	0,999	1,7	5,8	0,9	2,9
FB_2	20-152	0,993	3,9	12,9	1,9	6,4
ENN B	10-132	0,9935	0,05	0,16	0,02	0,08
ENN B_1	18-132	0,9891	0,05	0,15	0,02	0,08
STE	8.4-108	0,9904	0,05	0,15	0,02	0,08
MAC A	1,7-21	0,9934	0,04	0,13	0,02	0,06
α-ZOL	88,3-1133	0,9864	17,3	57,7	8,7	28,9
β-ZOL	83-1063	0,992	10,4	34,6	5,2	17,3
PEN A	100-1315	0,9919	4,3	14,4	2,2	7,2
AND A	6,0-46	0,9888	1,2	4,0	0,6	2,0
AOH	70,4-903	0,9911	9,5	31,6	4,8	15,8
ZEA	15,5-199	0,9907	3,4	11,2	1,7	5,6
MPA	72,4-926	0,9921	19,3	64,3	9,6	32,1

Tal y como se puede observar en la tabla anterior, los valores de LODs y LOQs estaban comprendidos entre 0.02-17,1 µg kg^{-1} y 0,06-57 µg kg^{-1}, respectivamente.

3.3.2. Exactitud y precisión

La estimación de la exactitud asociada al procedimiento de extracción y análisis se llevó a cabo teniendo en cuenta las 27 determinaciones realizadas para cada una de las micotoxinas (3 niveles de concentración, por triplicado y repetidos tres días distintos).

Tabla IV.C.10. Recuperación media y desviación estándar relativa a los tres niveles de fortificación

	Sin etapa de purificación		*Con etapa de purificación*	
Analito	**Recuperación media**	**RSD**	**Recuperación media**	**RSD**
	%	%	%	%
PA	80,2	9,1	65,1	21,6
DON	77,9	7,1	97,9	14,2
AFB_1	90,4	15,1	98,2	24,0
AFG_1	92,1	8,2	83,6	22,8
3+15-ADON	78,9	7,8	101,6	8,9
ROQ-C	52,1	5,9	116,7	33,7
OTA	126,7	10,7	36,8	24,4
HT-2	78,9	14,0	105,2	15,0
T-2	77,8	10,1	102,1	9,7
VERR	64,6	10,0	124,8	36,5
iFB_1	110,8	4,3	*no se detecta*	
FB_2	66,2	8,0	*no se detecta*	
ENN B	51,2	9,5	110,5	25,5
ENN B_1	49,6	9,0	109,3	27,9
STE	60,5	10,1	127,8	22,5
MAC A	69,0	7,6	109,1	22,7
α-ZOL	65,1	5,3	103,3	13,2
β-ZOL	74,8	5,0	54,7	4,2
PEN A	84,5	10,4	195,5	32,1
AND A	63,7	7,1	104,1	5,8
AOH	60,9	8,3	*no se detecta*	
ZEA	73,5	7,6	119,3	11,0
MPA	84,4	7,1	24,2	9,0

La recuperación fue calculada a partir de las 9 réplicas preparadas para cada nivel de fortificación (0,5xCov, 1xCov, 1,5xCov), de modo que se obtienen tres estimaciones para cada una de las micotoxinas (una por cada día). Mediante el promedio de las recuperaciones de cada uno de los tres días en las que el cálculo se ha realizado, se han obtenido el valor de recuperación final para cada micotoxina estudiada. Además, la desviación estándar relativa

(RSD) de las determinaciones también ha sido calculada, cuyo dato pemitirá extraer una idea acerca de la precisión de dichas determinaciones.

Con respecto al uso de columnas Mycospin, las medias de las recuperaciones obtenidas se encontraban en un rango comprendido entre 24% y 128%, tal y como se puede observar en la tabla anterior. Para la mayoría de micotoxinas estudiadas, las recuperaciones resultaron ser mejores cuando se incluía la etapa de purificación. Sin embargo, usando las columnas Mycospin los valores de RSD obtenidos superaban en algunos de los casos el 20% e incluso el 30% y además micotoxinas como las fumonisinas no podían ser detectadas al quedar retenidas en el cartucho.

Como se puede observar en la tabla anterior, sin utilizar etapa de limpieza los valores promedios de las recuperaciones obtenidos para las 24 micotoxinas estudiadas variaban entre el 60.5 % y 127 %, excepto para las eniantinas. Tratándose de un método multiresiduo, tales porcentajes de recuperación se consideraron satisfactorios y suficientemente cuantitativos como para poder considerar el método multi-micotoxinas propuesto adecuado para el análisis de muestras de ensilado de maíz.

Los valores de RSD se han mantenido para cada caso por debajo del 16%, lo que indica una baja dispersión de los datos, y por tanto, una buena precisión de la metodología aplicada.

El valor de la precisión será evaluado más a fondo a partir del cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad, tal y como se expone en el siguiente apartado.

3.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad

La estimación de la precisión del método se realizó a partir de la evaluación de la repetibilidad y de la reproducibilidad. Para ello, se repitieron las extracciones de silo de maíz fortificado a 3 niveles, cada uno por triplicado (9 réplicas), y tal como establece la Decisión 2002/657/CE [37], en tres días distintos. Resultó un total de 27 experimentos a partir de los cuales, la repetibilidad y la reproducibilidad fueron calculadas.

La aplicación de un diseño experimental de un solo factor a los datos obtenidos generó un modelo de análisis de varianza (ANOVA), a partir del cual se obtuvieron los valores de varianza necesarios para el cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad del método.

La repetibilidad fue evaluada a partir de las 9 réplicas por cada nivel de fortificación (tres por cada día), mientras que la reproducibilidad se obtuvo del análisis de varianza de los tres replicados de cada uno de los niveles de fortificación de los análisis realizados en el mismo día. Los grados de libertad del diseño planteado con este método de validación alternativo, son iguales o mayores que los que corresponderían a una estrategia de validación convencional.

Como se puede observar en los datos expuestos en la Tabla IV.C.10, sin el uso de etapa de purificación, la repetibilidad y la reproducibilidad para las micotoxinas estudiadas variaron desde 5,2 hasta 23,2% y 7,2 a 23.9%, respectivamente. En cambio, si se utilizaban las columnas Mycospin, la repetibilidad y la reproducibilidad presentaron valores comprendidos entre 9 y 42% y 7 a 47%, respectivamente.

En vista de estos resultados, se puede deducir la baja precisión y baja robustez del método de extracción que incluía el uso de columnas Mycospin, en comparación con el método que no empleaba esta etapa de limpieza.

Tabla IV.C.11. Repetibilidad y reproducibilidad asociadas al método analítico de las micotoxinas

	Sin etapa de purificación		*Con etapa de purificación*	
Analito	**Repetibilidad**	**Reproducibilidad**	**Repetibilidad**	**Reproducibilidad**
	%	%	%	%
PA	7,9	8,5	30,8	36,1
DON	5,2	7,6	8,9	11,3
AFB_1	10,9	20,8	30	38,9
AFG_1	6,1	16,1	22,2	30,9
3+15-ADON	6,2	7,2	8,9	9,2
ROQ-C	19,2	19,3	26,5	32,9
OTA	10,1	18,3	13,9	7,3
HT-2	9,8	9,6	9,5	10,5
T-2	15,3	27,5	15	16
VERR	15	15,4	32,9	39,1
FB_1	10,3	10,8	*no se detecta*	
FB_2	23,1	22	*no se detecta*	
ENN B	14,5	15,4	37,1	38,7
ENN B_1	22	23,9	41,7	47,2
STE	12,4	14,1	30,7	31,5
MAC A	13,4	11,2	18,1	21,5
α-ZOL	13,6	14,5	18,2	18,5
β-ZOL	8,9	10,5	9,9	11,8
PEN A	32,1	33,5	50,7	57
AND A	12,1	14,8	10,9	12,6
AOH	13,2	15,3	*no se detecta*	
ZEA	11,9	13,9	26,3	20,1
MPA	6,8	8,4	10,1	12,5

3.3.4. Límite de decisión (CCα) y capacidad de detección (CCβ)

La Decisión 2002/657/CE [37] define el límite de decisión (CCα) como "el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme con una certeza estadística igual a 1- α", entendiendo por "no conforme" que la muestra estaría realmente contaminada con los analitos de interés en una concentración calculable. En la práctica, CCα corresponde a la máxima señal de ruido alcanzada por un blanco de muestra o a la señal analítica obtenida por una muestra que contiene el analito a una concentración igual a su límite máximo de residuo (LMR), permitido con un nivel de confianza de 1- α (α=5% para las sustancias con nivel máximo establecido y α=1% para sustancias prohibidas).

En esta misma Decisión de la Comisión Europea, también viene definida la capacidad de detección (CCβ) como "el valor límite de un analito para que pueda ser detectado, identificado y/o cuantificado (según las necesidades), con una probabilidad de error de β" (β

=5% para las sustancias con nivel máximo establecido). En la práctica, este parámetro representa la medición más baja por la que una muestra se puede declarar "no conforme", es decir, que contiene el analito (para sustancias prohibidas) o que contienen el analito a una concentración superior a los LMR (para el caso de sustancias con LMR establecidos).

El cálculo de estos dos parámetros, CCα y CCβ, se ha realizado de acuerdo con las ecuaciones proporcionadas en las ISO 11843-2 [31]. Para el cálculo del límite de decisión (CCα), se ha realizado la regresión lineal a partir de los resultados obtenidos en los 27 experimentos frente a las concentraciones de cada nivel de fortificación, obteniéndose la ecuación de la recta y= a+ bx.

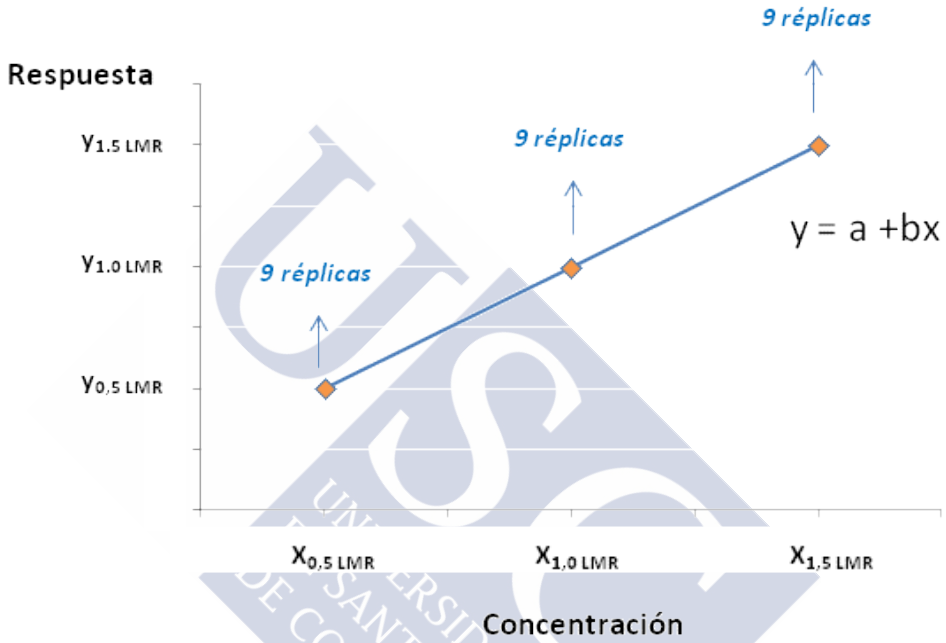


Figura IV.C.3. Regresión lineal de las 9 réplicas por nivel (en tres días distintos) para el cálculo de CCα

A partir de este momento, sería posible calcular el valor de y_c mediante la fórmula:

$$y_c = a + bx_{MRL} + t_{df,\alpha} Sy \sqrt{1 + \frac{1}{I.J} + \frac{(x_{MRL} - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

teniendo en cuenta que:

- a es la ordenada y b la pendiente proporcionadas por la rex $_{LMR)}$
- t de Student: 1,708 (25 grados de libertad y una probabilidad de 1%)
- S_y es la desviación estándar residual del modelo de regresión
- I es el número de niveles de fortificación (I=3)
- J es el número de réplicas por nivel de concentración (J=9)
- x_i es el promedio de los 27 valores de concentraciones
- x_{MRL} es la concentración máxima regulada

Se define y_c o valor crítico de la variable respuesta como "el valor de respuesta y que una vez excedido conduce, con una probabilidad de error α, a la conclusión de que el sistema observado no está en su estado básico". Esto es, y_c es la señal analítica obtenida a la menor concentración que provoca un cambio de señal apreciable con respecto a la señal de fondo, siendo la señal correspondiente a una concentración x_i igual a CCα (valor crítico de la variable de estado).

A partir de todo lo definido anteriormente, el valor de CCα se puede obtener directamente del siguiente modo:

$$CC\alpha = \frac{y_c - a}{b}$$

El cálculo de la capacidad de detección (CCβ) se lleva a cabo utilizando un procedimiento iterativo, siguiendo la ecuación:

$$y_c = a + bCC\beta - t_{df,\beta} Sy \sqrt{1 + \frac{1}{I.J} + \frac{(CC\beta - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Se trataría de encontrar el valor de concentración que al ser sustituido en la ecuación anterior, proporcione una respuesta igual a y_c.

Mediante la aplicación de las fórmulas matemáticas anteriormente presentadas, se han calculado CCα y CCβ para cada una de las micotoxinas estudiadas.

La Unión Europea ha establecido niveles máximos para la AFB_1 [6] y ha recomendado límites máximos para la OTA, DON, ZEA y la suma de fumonisinas [7] en alimentación animal. Para todas estas micotoxinas, los valores de CCα y CCβ se han calculado teniendo en cuenta el límite más bajo.

Por otro lado, y a pesar de no tratarse propiamente de límites de aplicación, los niveles indicativos establecidos por la Recomendación 2013/165/UE [8] para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales y productos de cereales han sido considerados para el cálculo de ambos límites.

Los resultados presentados la siguiente tabla (Tabla IV.C.12), muestran que los valores de CCα oscilan entre 10,2 y 5776 µg kg^{-1} mientras que los de CCβ lo hacen entre 15,2 y 6842 µg kg^{-1}. Para el caso de la AFB_1 y AG_1 estos parámetros han presentado valores bastante superiores al máximo nivel legal permitido (5 µg kg^{-1}), siendo 12,3 µg kg^{-1} y 10,2µg kg^{-1}, respectivamente. Teniendo en cuenta que para dichas micotoxinas, el valor del ME muestras de ensilado era muy elevado, llegando a suponer una supresión de iones superior al 90%, casi el 95%, alcanzar valores mucho más cercanos al límite legal establecido no ha resultado posible con ninguna de las metodologías propuestas (con y sin etapa de purificación).

En cambio, para las micotoxinas OTA, DON, ZEA y la suma de fumonisinas, los valores de CCα resultaron ser inferiores a los límites recomendados, por lo que se podría afirmar que, para tales micotoxinas, los métodos propuestos han presentado una alta fiabilidad.

A modo de ejemplo, se muestran en las siguientes figuras los cromatogramas (en HESI+ y HESI-) obtenidos tras el análisis con LC-MS/MS de 20 µL de uno de los patrones de calibrado de micotoxinas conteniendo un 100% de matriz silo de maíz.

Tabla IV.C.12. Valores de los límites de decisión y de las capacidades de detección

	Sin etapa de purificación		***Con etapa de purificación***		
Analito	**CCα**	**CCβ**	**CCα**	**CCβ**	**Límites máximos**
	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}
DON	985,2	1072	1009,2	1121,4	900 / 12000
AFB_1	12,3	19,2	24,0	45,1	5 / 50
AFG_1	10,2	15,2	20,0	35,3	5 / 50
3+15-ADON	1004,0	1108,5	1015,2	1130,8	900 / 12000
OTA	64,6	82,7	63,1	76,9	50 / 250
HT-2	326,0	400,5	331,6	411,7	Σ 250
T-2	306,2	396,3	270,8	295,5	
FB_1	5381,6	5827	*no se detecta*		Σ 5000 / 60000
FB_2	5776,4	6842	*no se detecta*		
α-ZOL	196,0	287,7	211,3	317,2	100 / 3000
β-ZOL	169,7	236,8	171,3	240,1	100 / 3000
ZEA	117,0	134,6	121,0	142,9	100 / 3000

En conclusión, teniendo en cuenta los parámetros de calidad de los dos métodos estudiados (con y sin etapa de purificación), principalmente aquellos relacionados con la exactitud y precisión, las bajas recuperaciones para OTA y MPA así como la pérdida de las fumonisinas y del AOH, el método idóneo y el aplicado a las muestras de silo de maíz fue aquel que no incluía el uso de columnas Mycospin.

Con el objetivo de evaluar el nivel de contaminación con micotoxinas, este método ha sido aplicado extensivamente a muestras de ensilado de maíz procedentes de explotaciones ganaderas de Galicia, tal y como se detalla en la siguiente Sección.

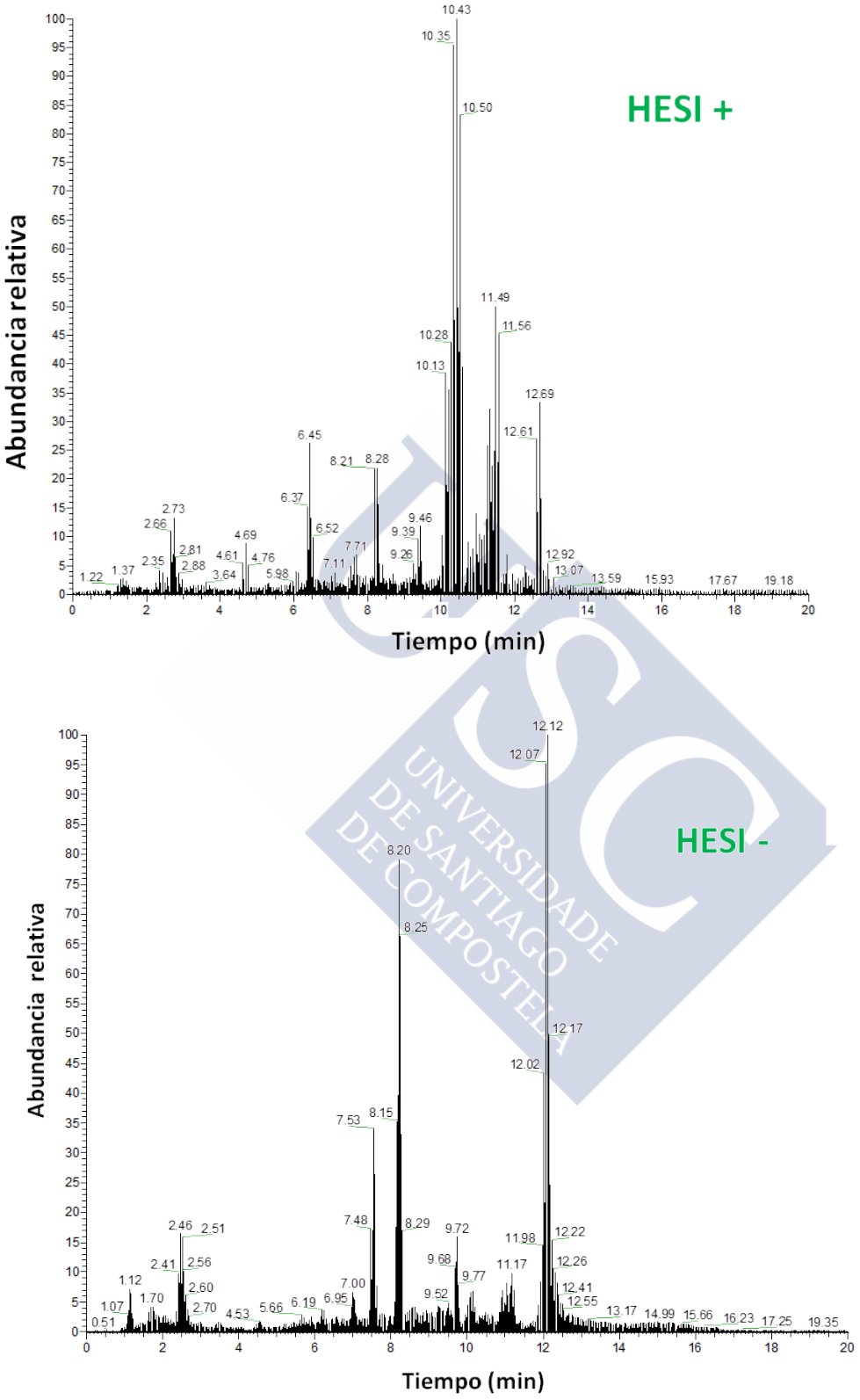


Figura IV.C.4. Cromatogramas obtenidos en los dos modos de ionización para un patrón de calibrado preparado en matriz silo y conteniendo 26 micotoxinas

4. BIBLIOGRAFÍA

[1] Cheli, F.; Campagnoli, A.; Dell´Orto V.; Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis; *Anim. Feed .Sci. Tech.*; 183, **2013**, 1-16.

[2] Jouany, J.P.; Methods for preventing, descontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed .Sci. Tech*., 137, **2007**, 342-362.

[3] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Castro, P.; Pereira, S.; Calidad higiénica de piensos, leche y ensilados de hierba y maíz en explotaciones lecheras de Galicia; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba; **2008**, 329-335.

[4] Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; Te Giffel, M.C.; Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes; *J. Dairy Sci.;* 91, **2008**, 4261-4271.

[5] Zachariasova, M.; Dzuman, Z.; Veprikova, Z.; Hajkova, K.; Jiru, M.; Vaclavikova, M.; Zachariasova, A.; Pospichalova, M.; Florian, M.; Hajslova, J.; Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals*; Anim. Feed Sci.Tech*.; 193,**2014,** 124-140.

[6] Directiva 2003/100/CE de la Comisión de 31 de octubre de 2003 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal; DO L 285, **2003**, 33-37.

[7] Recomendación de la Comisión del 17 de agosto de 2006 (2006/576/CE), sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal; DO L 229, **2006**, 7-9.

[8] Recomendación de la Comisión del 27 de marzo de 2013 (2013/165/UE), sobre la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en los cereales y productos a base de cereales animal; DO L 91, **2013**, 12-15.

[9] E. Streit, C.Schwab, M. Sulyok, K. Naehrer, R. Krska, G. Schatzmayr, Toxins 5 (2013) 504.

[10] Ates,E.; Godula, M.; Stroka, J.; Senyuva, H.; Screening of plant and fungal metabolites in wheat, maize and animal feed using automated on-line clean-up coupled to high resolution mass spectrometry; *Food Chem.;*142, **2014**, 276-284.

[11] Pereira, V.L.; Fernandes, J.O.; Cunha, S.C.; Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: a review on occurrence and recent methods of analysis; *Trends Food .Sci. Tech*.; 36, **2014**, 96-136.

[12] Sukyok, M.; Berthiller, F.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; 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, **2006**, 2649-2659.

[13] Garon, D.; Richard, E.; Sage, l.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P.; 2006 Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study; *J. Agric. Food Chem.;* 54, **2006**, 3479-3484.

[14] Richard, E.; Heutte, N.; Sage, L.; Pottier, D.; Bouchart, V.; Lebailly, P.; Garon, D.; Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage; *Food Chem. Toxicol.*; 45, **2007**, 2420-2425.

[15] Lattanzio, V.M.T.; Ciasca, B.; Powers, S.; Visconti. A.; Improved method for the simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in cereals and

derived products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry after multi-toxin immunoaffinity clean up; *J. Chromatogr. A*.; 1354, **2014**, 139-143.

[16] Ren, Y.; Zhang, Y.; Shao, S.; Cai,, Z.; Feng, L.; Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*.; 1143, **2014**, 48-64.

[17] Tanaka, H.; Takino, M.; Sugita-Konishi, Y.; Tanaka, T.; Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 20, **2006**, 1422-1428.

[18] Soleimany, F.; Jinap, S.; Abas, F.; Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry; *Food Chem.*; 130, **2012**, 1055-1060.

[19] Rasmussen, R.R.; Storm, I.M.L.D.; Rasmussen, P.H.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K.F.; Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS; *Anal. Bioanal. Chem.*; 397, **2010**,765-776.

[20] Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Lacina, O.; Veprikova, Z.; Slavikova, P.; Hajslova, J.; A rugged high-through put analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. *Talanta*; 121, **2014**, 263-272.

[21] Spanjer, M.C.; Rensen, P.M.; Scholten, J.M.; LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction and validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs.; *Food Addit. Contam. Part A*.; 25, **2008**, 472-489.

[22] Beltrán, E.; Ibáñez, M.; Portolés, T. Ripollés, C., Sancho, J.V.; Yusà, V., Marín, S., Hernández, F.; Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study; *Anal. Chim. Acta*.; 783, **2013**, 39-48.

[23] Abia, W.A.; Warth, B.; Sulyok, M.; Krska, R.; Tchana, A.N.; Njobeh, P.B.; Dutton, M.F.; Moundipa, P.F.; Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); *Food Control*.; 31,**2013**, 438-453.

[24] Kayode, O.F.; Sulyok, M.; Fapohunda, S.O.; Ezekiel, C.N.; Krska, R.; Oguntona , C.R.B.; Mycotoxins and fungal metabolites in groundnut- and maize-based snacks from Nigeria; *Food Addit. Contam. Part B*; 6, **2013**, 294-300.

[25] Warth, B.; Parich, A.; Atehnkeng, J.; Bandyopadhyay, R.; Schuhmacher, R.;Sulyok, M.; Krska R.; Quantitation of Mycotoxins in Food and Feed from Burkina Faso and Mozambique Using a Modern LC-MS/MS Multitoxin Method; J*. Agric. Food Chem*.; 60, **2012**, 9352-9363.

[26] Van Pamel, E.; Verbeken, A.; Vlaemynck, G.; De Boever, J.; Daeseleire, E.; Ultrahigh-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multimycotoxin method for quantitating 26 mycotoxins in maize silage; *J. Agric. Food Chem.;* 59, **2011**, 9747-9755.

[27] Boudra, H.; Morgavi, D.P.; Reduction in *Fusarium* toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time; *J. Agric. Food Chem.;* 56, **2008**, 4523-4528.

[28] Mansfield, M.A.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A.; Contamination of Fresh and Ensiled Maize by Multiple Penicillium Mycotoxins; *Phytopathology*; 98, **2008**, 330-336.

[29] Keller, L.A.M.; González Pereyra, M.L.; Keller, K.M.; Alonso, V.A.; Oliveira, A.A.;Almeida, T.X.; Barbosa, T.S.; Nunes, L.M.T.; Cavaglieri, L.R.; Rosa, C.A.R.; Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation; *J. Stored Prod. Res*.; 52, **2013**, 42-47.

[30] Van Loco, J.; Beernaert, H.; An Alternative Method Validation Strategy for the European Decision 2002/657/EC. Proceedings of the Euro Food Chem. XII: Strategies for Safe Food; 1, **2003**, 91-94.

[31] ISO 11843-2: 2000: Capability of detection-Part 2: Methodology in the linear calibration case (and Technical Corrigendum 1:2007). **2000**; En: http://www.iso.org

[32] ISO 5275-2: 1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (and Technical Corrigendum 1:2002). **1994**; En: http://www.iso.org

[33] Pereira, V.L.; Fernandes, J.O.; Cunha, S.C.; Mycotoxins in cereals ans related foodstuffs: a review on occurrence and recent methods of analysis; *Trends Food .Sci. Tech*.; 36, **2014**, 96-136.

[34] Berthiller, F.; Burdaspal,P.A.; Crews,C.; Iha,M.H.; Krska,R.; Lattanzio,V.M.T.; MacDonald, S.; Malone, R.J.; Maragos,C.; Solfrizzo, M.; Stroka,J.; Whitaker, T.B.; Developments in mycotoxin analysis:an update for 2012-2013; *World Mycotoxin J*.; 7, **2014**, 3-33.

[35] Monbaliu, S.; Van Poucke, C.; Detavernier, C.; Dumoulin, F.; Van de Velde, M.; Schoeters, E.; Van Dyck, S.; Averkieva, O.; Van Peteghem, C.; de Saeger, S.; Occurrence of Mycotoxins in Feed as Analyzed by a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method; *J. Agric. Food Chem.;* 58, **2010**, 66-71.

[36] Yogendrarajah, P.; Van Poucke, C.; De Meulenaer, B.; De Saeger, S.; Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices; *J. Chromatogr. A.*; 1297, **2013**, 1-11.

[37] European Commission. 2002. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; *Off. J. Eur. Union*; L221, **2002**, 8-36.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV.D. DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE SILO DE MAÍZ DE EXPLOTACIONES GALLEGAS

Este estudio tenía como objetivo evaluar la presencia de micotoxinas en muestras de ensilados de maíz recogidas en explotaciones lecheras gallegas. Esta labor de investigación estaba enmarcada dentro de un proyecto promovido y financiado por la Xunta de Galicia (2009-2012, PGIDIT, 09MRU015E), que llevaba por título: "Efecto de las condiciones climáticas y del manejo de los silos sobre la contaminación con micotoxinas en ensilados de maíz de las explotaciones de vacuno de leche". Este estudio fue posible a través de un contrato de colaboración con la empresa Seragro Soc. Coorperativa Gallega, que presta servicios técnicos de asesoramiento a explotaciones de vacuno de leche por toda la geografía gallega.

En concreto, con esta investigación, se trataba de esclarecer el grado de contaminación con distintas micotoxinas en silos de maíz reales mediante el muestreo de explotaciones en Galicia durante dos años, ya que era sabido que los ganaderos no llegaban a hacer controles de este tipo en sus silos, salvo, en ocasiones, para las aflatoxinas (aflatoxina B_1).

Los resultados obtenidos han sido recogidos en el artículo *"Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain"* (*Food Addit. Contam. Part A, 33, 2016, 1850-1863),* que se incluye en los Anexos finales de esta Memoria de Tesis.

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos de forma natural por ciertos hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium, Alternaria* y *Claviceps* [1]. Según ha estimado las Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) un 25% de los cultivos en todo el mundo se ven afectados por micotoxinas [2]. Además del riesgo que suponen para la salud humana y animal, niveles elevados de micotoxinas también están asociados a pérdidas de la productividad de las explotaciones debidas a factores como la disminución de la ingesta, pérdida de peso vivo, disminución de la producción de leche e incremento de los costes veterinarios [3].

Muchos de los hongos micotoxigénicos, pueden infectar el maíz forrajero y producir micotoxinas durante el cultivo y/o el proceso de ensilado. Aunque son varios los tipos de hongos que se han aislado de los ensilados, son las especies pertenecientes a los géneros *Penicillium* (70%), *Fusarium* (47%) *y Aspergillus* (34%) [4] las más frecuentemente aisladas. Mientras que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son más abundantes durante la etapa posterior a la cosecha (*postcosecha*), las especies de *Fusarium* son conocidas generalmente por infectar los cultivos en el campo (*precosecha*) [5,6].

En el año 2015, según datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, el sector productor de vacuno de vacuno de leche (principal consumidor de forrajes ensilados) suponía el 87,1% de la producción lechera total en España. Su peso económico y social es fundamental en las comunidades de la Cornisa Cantábrica, como Galicia, Asturias y Galicia. Entre estas comunidades, destaca Galicia en la producción de leche a nivel estatal, que cuenta aproximadamente con la mitad de las explotaciones.

En Galicia, más de un 50% de las explotaciones utilizan los ensilados de hierba y de maíz como la principal fuente de forraje, superando el 75% en las explotaciones de mayor tamaño. En ellas, el ensilado llega a constituir el 60% de la ingesta de materia seca de para las vacas en lactación [7].

En el caso del ganado lechero, se pueden observar distintos síntomas clínicos asociados a la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas, como: desequilibrios hormonales y metabólicos, reacciones inflamatorias e inmunodepresión, pudiendo desencadenar patologías como mamitis, desplazamiento del abomaso, laminitis o fiebre de la leche. Además, la metabolización parcial de las micotoxinas en el rumen también puede dar lugar a aparición de metabolitos nuevos y más tóxicos [8].

En España, se ha investigado sobre la ecofisiología de las especies micotoxigénicas y la incidencia de micotoxinas en cultivos de maíz y en alimentos a base de maíz. Los hongos aislados con más frecuencia en grano de maíz en Galicia, y en el resto de España pertenecen al género *Fusarium* [9-14] y la contaminación con micotoxinas como deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) y fumonisinas es observada con frecuencia. Sin embargo, en el momento de inicio de estos trabajos, no existía constancia alguna de estudios sobre micotoxinas en ensilados de maíz. La mayor parte de los trabajos sobre micotoxinas en alimentación animal, se centraban principalmente en alimentos concentrados.

No obstante, los datos obtenidos sobre la incidencia de micotoxinas en ensilados de maíz en otros países indicaban que el riesgo de contaminación no debía ser subestimado [1, 4,5, 15-24].

Además, es muy frecuente la aparición simultánea de varias micotoxinas en ensilados de maíz, como ya fue encontrada y publicada para micotoxinas del género *Penicillium* (roquefortina C, patulina, ácido micofenólico y ácido ciclopiazónico) [16] y para las micotoxinas del *Fusarium*, siendo la coexistencia del DON y ZEA la más prevalente [25,26].

Por otro parte, también se ha puesto de manifiesto la variación de tipo de micotoxinas y de los niveles de contaminación entre regiones, explotaciones de la misma región y muestras recogidas del mismo silo. El factor más predominante del contenido en hongos en silo de maíz es la posición que la muestra ocupa en el silo. Generalmente, la mayor contaminación por hongos se muestra en las capas superiores del silo, que presenta menos compactación y donde son más posibles las infiltraciones de aire. Es por tanto esta zona donde la contaminación de micotoxinas es presumiblemente mayor [27]. Otros factores correlacionados con el contenido en hongos es la duración del proceso de elaboración del silo y el mes de muestreo. En Galicia, en un estudio realizado sobre 232 muestras de silo de maíz, los ensilados que mostraron un mayor contenido en hongos fueron aquellos que se taparon antes (menor compactación) y los muestreados en verano [27]. Otro trabajo sobre ensilados de maíz en explotaciones italianas detectó mayor concentración de ZEA en las muestras recogidas en verano que en las de invierno [28].

Debido a la falta de técnicas de detoxificación eficaces en el ensilaje, la prevención de las micotoxinas en los ensilados debe requerir una especial atención [29]. Un monitoreo constante de los ensilados permitiría la obtención de una base de datos con las especies de hongos y micotoxinas que puedan estar presenten en los silos y avanzar en el conocimiento acerca de las causas que favorecen la contaminación con micotoxinas [5]. Para ello, el desarrollo y el uso de métodos analíticos multi-micotoxinas robustos, rápidos, fiables que proporcionen información exhaustiva sobre la amplia gama de micotoxinas en ensilados de maíz se hacen necesarios. Sin embargo, la complejidad de los ensilados como matriz analítica y la frecuente aparición simultánea de varias micotoxinas con características químicas muy diversas en un mismo silo, hace que los métodos multi-micotoxinas debidamente validados para el análisis de rutina para ensilajes, sean prácticamente inexistentes [5].

En el presente estudio, muestras de silo de maíz procedente de distintas explotaciones lecheras gallegas se han recogido en las épocas de invierno y de verano y a distintos niveles de silo durante dos años. Con el objetivo de evaluar la presencia y el grado de contaminación con micotoxinas en dichas explotaciones y de responder a la demanda de la Comisión Europea 2006/576/CE [30] sobre la presencia de varias micotoxinas en productos destinados a alimentación animal, el método multi-micotoxinas desarrollado y validado en la sección anterior (Sección IV. C.) se ha aplicado a las muestras recogidas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Selección de las explotaciones y muestreo de los silos de maíz

En primera instancia, se llevo a cabo la selección de explotaciones lecheras repartidas en las distintas áreas geográficas de Galicia con producción de leche. Un total de 19 explotaciones correspondientes a las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra, fueron seleccionadas, algunas de las cuales habían presentado algún problema de salud animal asociado a la alimentación en los últimos cinco años. Estas explotaciones contaban con un número de vacas en lactación igual o superior a 20. Para el proceso de selección y posterior muestreo se contó con la colaboración externa de los servicios técnicos de SERAGRO, empresa cooperativa que presta servicios veterinarios.

En cada una de las explotaciones seleccionadas, se realizaron muestreos de silo de maíz entre los meses de febrero-abril (muestreo de invierno) y en los meses de verano. Los muestreos consistieron en la recogida de dos submuestras de 1,5 kg cada una, tomadas tras la apertura del silo, en los primeros 15 cm del frente. Cada submuestra correspondía a dos niveles de altura del silo: la primera a situada en los 20 cm del silo (nivel superior) y la segunda a más de 100 cm del plástico (nivel inferior).

Cada muestra de ensilado fue embolsada herméticamente, debidamente etiquetada y trasladada al laboratorio en nevera refrigerada a 4°C, en un plazo máximo de 24 horas.

En paralelo a los muestreos, se realizaron encuestas en cada explotación con el fin de analizar el efecto de las técnicas de producción sobre el contenido en micotoxinas de los ensilados de maíz muestreados. Así mismo, se recogió información complementaria acerca de aspectos relativos al clima, agronomía y manejo de silos, así como datos relativos a la salud animal y a la ración del rebaño.

Este ensayo fue realizado durante dos años distintos: 2010 y 2011.

Durante el año 2010, se recogieron muestras de silo en 16 explotaciones durante los meses de invierno y durante los meses del verano. Teniendo en cuenta que en cada explotación se muestreaba a dos alturas del silo, el total de muestras correspondiente a este primer año fue de 64.

En el segundo año (2011), fueron 19 las explotaciones muestreadas durante la época de invierno y verano, en 8 de las cuales, además de las dos submuestras tomadas a dos niveles de altura del silo, una tercera submuestra correspondiente a una zona donde el silo mostraba un avanzado estado de podredumbre, también fue recogida. En este segundo año, además de las explotaciones mencionadas, también se muestrearon durante las dos épocas (verano e invierno) silos de maíz pertenecientes a la finca experimental del *Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo* (Abegondo, A Coruña). Fueron un total de 88 muestras de silo las correspondientes al año 2011.

Las muestras fueron recibidas en el laboratorio en un plazo de 24 horas como máximo y posteriormente procesadas y conservadas aplicando el mismo protocolo que el ya descrito en el capítulo anterior (Capítulo III, Apartado 1.4).

2.2. Procedimiento de extracción, detección y cuantificación de micotoxinas en las muestras de silo de maíz

El método de análisis multi-micotoxinas propuesto y validado en la Sección IV.C del presente Capítulo, basado en una extracción sólido-líquida sin etapa de purificación y en la posterior detección y cuantificación por LC-MS/MS, fue aplicado sobre las 148 muestras de silo totales recogidas durante los años 2010 y 2011.

Una alícuota de 20 g de cada una de muestras, secada y molida, era recibida en el laboratorio para proceder al análisis de micotoxinas.

2.3. Patrones empleados, soluciones de trabajo y preparación de las curvas de calibrado

Se han utilizado los mismos estándares individuales de micotoxinas que los ya descritos en la Sección IV.C. (Apartado 2.1) de este mismo capítulo.

Se ha trabajado con una mezcla de micotoxinas como solución de trabajo, preparada por la combinación de alícuotas de cada una de las disoluciones individuales. La concentración de esta micotoxinas en la solución mezcla está presentada en la Tabla IV.D.1.

Para cuantificar las micotoxinas presentes en las muestras de silo de maíz procedentes de las explotaciones, se han preparado curvas de calibrado bajo la técnica "*matrix-matched calibration",* intentando reducir el indeseable efecto matriz. Con tal fin, se han elaborado patrones de calibración a través de la adición de distintos volúmenes de la solución de trabajo de micotoxinas a extractos de silo blancos obtenidos mediante el mismo procedimiento de extracción al que eran sometidas las muestras. Para generar los extractos de silo blancos, se utilizaron ensilados procedentes de la granja experimental *Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo,* asegurándose previamente que no presentaban contaminación con ninguna de las micotoxinas objeto de estudio.

De este modo, los patrones de los distintos niveles que constituían la curva de calibrado contenían un 100% de matriz silo de maíz. Las curvas fueron realizadas a ocho niveles de concentración en el rango que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla IV.D.1. Concentración de cada micotoxina en la solución mezcla empleada y el rango de concentraciones de las curvas de calibrado con 100% matriz silo

Micotoxina	Concentración mezcla	Rango concentración	
	µg mL^{-1}	µg kg^{-1}	
3+15-ADON	50	1700	22700
AFB_1	1	1	110
AFG_1	1	1	110
AND A	1	9,1	460
AOH	20	70,4	903
DON	50	143,1	17200
ENN B	5	100	1300
ENN B_1	5	98,7	2300
FB_1	4	10,4	1500
FB_2	4	10,7	1500
HT-2	25	990	11300
MAC A	0,5	8,2	210
MPA	20	600	9300
OTA	1,5	50	700
PA	10	250	3200
PEN A	30	1000	13100
ROQ C	2	29,6	900
STE	2	80	1000
T-2	0,5	10	220
VERR	2	29,6	900
α-ZOL	30	500	11330
β-ZOL	30	300	10600
ZEA	5	63,5	2000

Los valores de concentración de las micotoxinas obtenidos fueron corregidos según la recuperación del método obtenida para cada micotoxina. Estos valores de recuperación están recogidos en la Tabla IV.C.6 de la Sección IV.C de este capítulo.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados procedentes de los análisis multi-micotoxinas realizados en las 148 muestras de silo procedentes de 19 explotaciones gallegas muestreadas durante los años 2010 y 2011, revelaron que un 62% de los ensilados presentaban contaminación con micotoxinas.

Globalmente, se pudo constatar que cinco de las 148 muestras llegaron a contener simultáneamente más de cuatro micotoxinas, observándose un total de hasta 7 micotoxinas en una de ellas. Estos casos aparecieron en aquellas submuestras tomadas en el nivel superior del silo y en aquellas donde el silo mostraba cierto estado de podredumbre correspondientes al muestreo de invierno durante el segundo año (2011). Conviene recordar que en las capas superiores de los silos, normalmente menos compactadas y más expuestas a las posibles infiltraciones de aire, el riesgo de contaminación con micotoxinas es presumiblemente mayor [27].

Por otro lado, tan sólo dos de las explotaciones lecheras muestreadas en el 2011, estaban completamente "libres" de micotoxinas.

A continuación, aparecen recogidos los valores de concentraciones medias, mínimas y máximas de las diferentes micotoxinas detectadas en las 148 muestras de ensilados de maíz durante los años 2010 y 2011.

Tabla IV.D.2. Concentraciones (µg kg^{-1}) de las micotoxinas detectadas en las 64 muestras de silo de maíz durante el 2010

Micotoxinas	Concentración media	Concentración mínima	Concentración máxima	Frecuencia
	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}	%
DON	1316,4	143,1	6685,6	12,5
ENN B	151,2	96,9	393,9	71,9
FB_1	489,0	116,5	857,4	4,7
FB_2	76,1	50,3	137,0	14,1
MAC A	22,1	12,4	31,0	4,7
ZEA	255,8	89,4	820,2	20,3
AND A	20,6	15,4	31,4	6,3
3+15-ADON		*nd*		
PA		*nd*		
HT-2		*nd*		
T-2		*nd*		
OTA		*nd*		
STE		*nd*		
AOH		*nd*		
PEN A		*nd*		
AFB_1		*nd*		
AFG_1		*nd*		

Tabla IV.D.3. Concentraciones (µg kg^{-1}) de las micotoxinas detectadas en las 64 muestras de silo de maíz durante el 2011

Micotoxinas	Concentración media	Concentración mínima	Concentración máxima	Frecuencia
	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}	µg kg^{-1}	%
DON	2054,4	183,4	4843,5	9,5
ENN B	163,3	105,4	300,3	31,0
ENN B_1	133,7	98,7	206,7	6,0
FB_1	136,9	10,4	994,1	13,1
FB_2	41,5	10,7	87,3	28,6
MAC A	763,1	8,2	2044,3	10,7
ROQ C	575,8	29,6	1651,4	11,9
VERR	121,8	121,8	121,8	1,2
MPA	2194,7	506,0	3678,7	4,8
ZEA	197,4	63,5	608,7	22,6
α-ZOL	1833,3	606,6	2889,4	3,6
β-ZOL	779,3	326,1	1721,1	4,8
AND A	310,7	9,1	885,6	16,7
3+15-ADON		*nd*		
PA		*nd*		
HT-2		*nd*		
T-2		*nd*		
OTA		*nd*		
STE		*nd*		
AOH		*nd*		
PEN A		*nd*		
AFB_1		*nd*		
AFG_1		*nd*		

Como se observa en las tablas anteriores, de las 24 micotoxinas analizadas con el método multi-micotoxinas propuesto, un total del 13 han sido detectadas en las muestras de ensilados de maíz: MPA, ROQ-C, FB_1, FB_2, DON, ENN B, ENN B1, MAC A, VERR, ZEA, α-ZOL, β-ZOL y AND A.

A modo de ejemplo, se muestran en la Figura IV.D.1. cromatogramas reconstituidos en base a las transiciones SRM, correspondientes a 5 muestras de silo de maíz de explotaciones contaminadas con 847,5 ug kg^{-1} de DON (a), 1439 ug kg^{-1} de ROQ-C (b), 29,6 ug kg^{-1} de FB_2 (c), 1721 ug kg^{-1} de β-ZOL (d), 247,2 ug kg^{-1} de ZEA (e), 3159 ug kg^{-1} de MPA (f), 821 ug kg^{-1} de AND A (g).

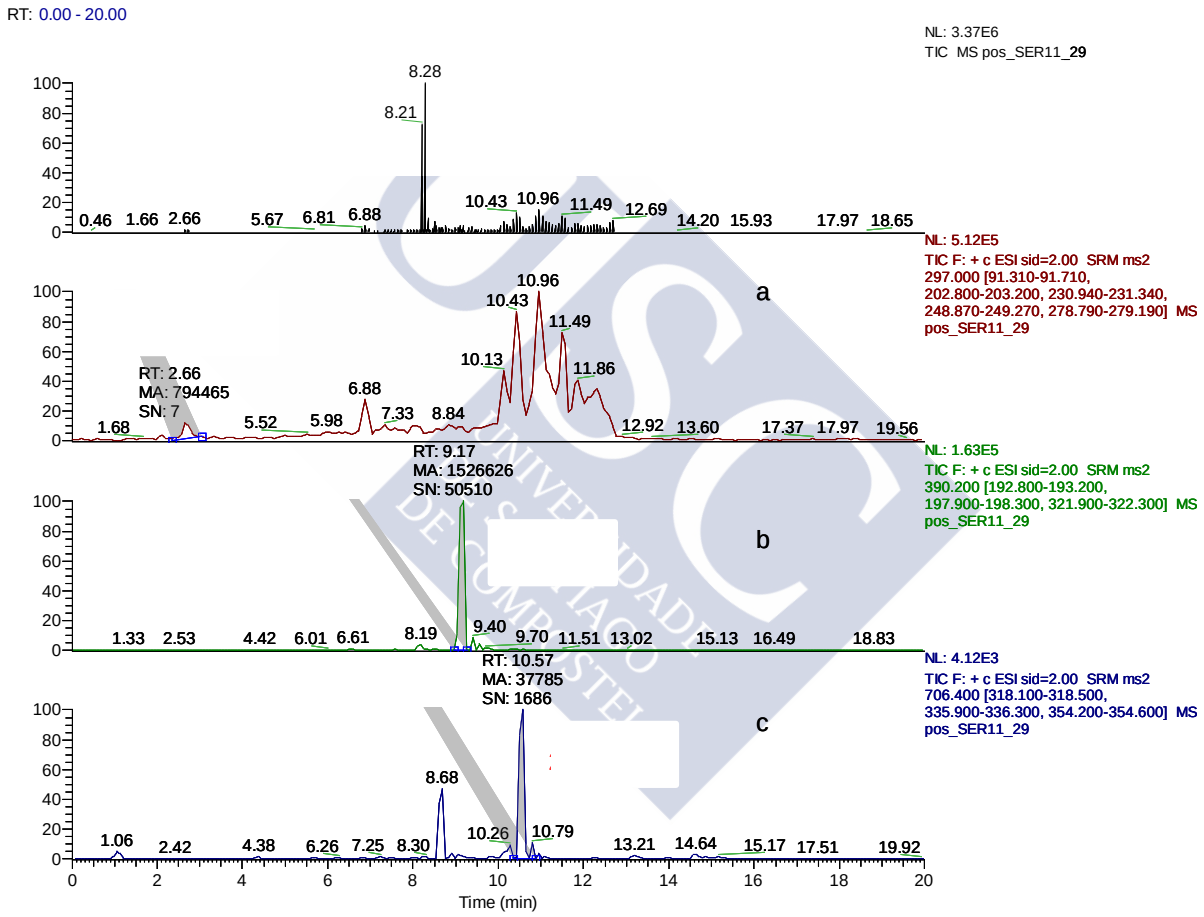
Entre las muestras que mostraron resultados positivos en micotoxinas, las más frecuentes fueron ENN B, ZEA y FB_2, constituyendo un 51,4%, 21,5% y 21,3% del total, respectivamente.

Los niveles máximos de concentración encontrados correspondieron al DON (6686 µg kg^{-1}) y al MPA (3679 µg kg^{-1}).

DON es una micotoxina muy frecuente en los cultivos de cereales de toda Europa y es utilizada como indicador de contaminación con otras micotoxinas del *Fusarium* [31].

Es importante comentar que todas las muestras de silo contaminadas con DON presentaban también contaminación con ZEA. Recordamos que la aparición simultanea de estas dos micotoxinas es común, y ya ha sido encontrada y publicada en estudios anteriores que analizaban micotoxinas en muestras de ensilado de maíz [18,26].

DON y ZEA son micotoxinas producidas por los hongos del *Fusarium*, cuyas especies son conocidas por infectar los cultivos en etapa previa a la cosecha (*precosecha*) [5]. Por tanto, DON y ZEA pueden ser producidas en el campo y posteriormente encontrarse en el ensilaje [6].



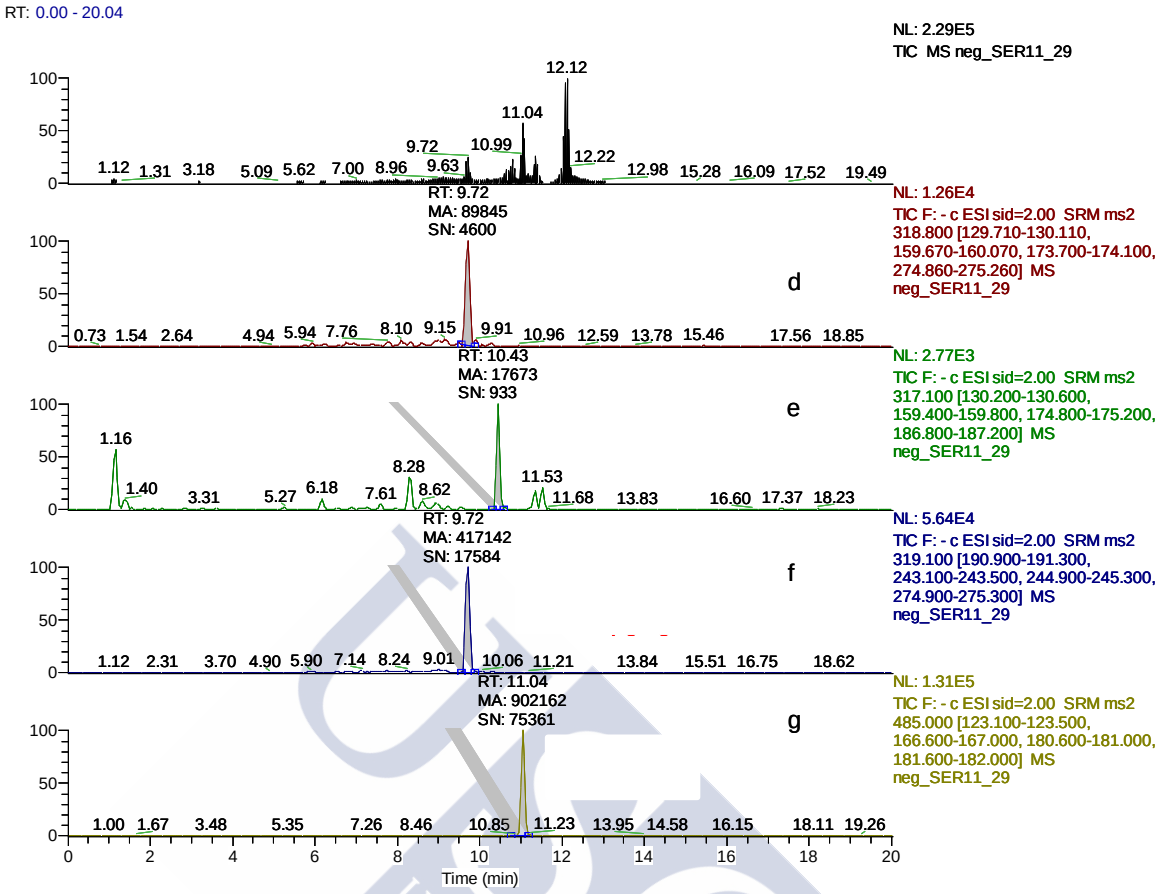


Figura IV.D.1. Transiciones SRM de DON (a), ROQ-C (b), FB_2(c), β-ZOL (d), ZEA (e), MPA (f) y AND A (g) en muestras de silo de maíz de explotaciones gallegas

Teniendo en cuenta que el valor máximo de ZEA recomendado en piensos (destinado al ganado lechero) es de 500 µg kg^{-1}, los resultados obtenidos en dos de las muestras analizadas en este estudio (608,7 y 820,2 µg kg^{-1}) han superado el límite de referencia permitido.

Además, los dos metabolitos de la ZEA (α-ZOL y β-ZOL) también han sido detectados en tres y cuatro de las muestras de silo analizadas, respectivamente, con unos niveles de concentración muy elevados que iban desde 606 µg kg^{-1} hasta 2889 µg kg^{-1} para α-ZOL y desde 326 µg kg^{-1} hasta 1721 µg kg^{-1} para β-ZOL. Es importante resaltar que α-ZOL, que presenta un carácter estrogénico, se detectó con concentraciones unas tres o cuatro veces superior al de la ZEA [32].

Por lo general, el género *Penicillium* causa problemas durante el almacenamiento, siendo muy habitual en las etapas posteriores de la cosecha [6]. Las toxinas del *Penicillum*, tales como la MPA, ROQ-C, AND A y MAC A, son considerados el segundo grupo de metabolitos propios de la post-cosecha más comúnmente encontrado en ensilados de maíz [33, 34].

Concretamente, MPA y ROQ-C son dos micotoxinas generadas principalmente por el hongo *Penicillium roqueforti* [35], una de las especies que ha mostrado ser la más abundante en los ensilados de maíz [22, 36].

En el presente estudio, MPA y ROQ-C estuvieron presentes en cuatro y diez del total de las muestras de silo de maíz analizadas, respectivamente. Las concentraciones de estas toxinas oscilaron entre 506 y 3679 μg kg^{-1} para el MPA, y entre 29,6 a 1651 μg kg^{-1} para la ROQ-C. Además, en las cuatro muestras donde el MPA estaba presente, la ROQ-C también fue detectada.

La presencia simultánea de micotoxinas del género *Penicillium* ya fue señalada en trabajos anteriores [16,26], si bien es cierto, que para el caso del estudio de Tagni et al. [26], donde se estudiaban silos procedentes de explotaciones belgas, el valor del MPA detectado era muy superior al encontrado en nuestro estudio (hasta 20000 μg kg^{-1}).

Las otras dos micotoxinas propias de la post-cosecha, AND A y MAC A, también fueron detectadas en los silos de maíz procedentes de explotaciones gallegas analizadas en el presente trabajo. Concretamente, un 11,5% del total de las muestras recogidas resultaron estar contaminadas con AND A, con unos valores de concentración que iban desde 9,1 hasta 885,6 μg kg^{-1}, mientras, la MAC A se detectó en un total de 7,7%, siendo su promedio de concentración de 740 μg kg^{-1}, con un nivel máximo de hasta 2044 μg kg^{-1}.

Con respecto a las fumonisinas, otras micotoxinas del genero *Fusarium*, FB_1 y FB_2 fueron detectadas en el 9% y en el 21% de las muestras analizadas, respectivamente; siendo la concentración media mayor para FB_1 (282,6 μg kg^{-1}) que para FB_2 (58,8 μg kg^{-1}). Tan sólo en 5 de los silos donde fueron detectadas, FB_1 y FB_2 estaban presentes simultáneamente. Además, los residuos de aquellas muestras que resultaron estar contaminadas con fumonisinas fueron sometidos a hidrólisis alcalina para la posible liberación de sus derivados hidrolizados (HFB_1 y HFB_2), con el procedimiento explicado en la Sección IV.A del presente Capítulo. Sin embargo, las fumonisinas "modificadas" no fueron detectadas en dichas muestras, siendo esto debido, probablemente, a la baja concentración de fumonisinas encontradas en las muestras.

Tal y como se puede observar en las Tabla IV.D.2. y Tabla IV.D.3., fue la micotoxina del Fusarium ENN B, la más frecuentemente encontrada, con una frecuencia media de aparición entre los dos años del 51%. En cambio, su análogo ENN B_1 sólo fue detectado en un 3.4% de las muestras analizadas. En un trabajo similar en ensilaje de maíz llevado a cabo en Dinamarca [33], también se demostró que la ENN B era una de las micotoxinas más prevalente, aunque con una menor incidencia que la observada en el presente estudio (28%). Además, en comparación con este estudio danés, las concentraciones medias de ENN B resultaron ser significativamente mayores en los silos estudiados en el presente trabajo (157 μg kg^{-1} en comparación con 53 μg kg^{-1}). Lo mismo ocurrió con la ZEA: 226.7 μg kg^{-1} en comparación con 53 μg kg^{-1} en los silos daneses.

En la Tabla I.A.3. presentada en el primer capítulo de esta Memoria, aparecen recogidos los valores límites orientativos que la Comisión Europea establece en su Recomendación 2006/576/CE [30], sobre la presencia de DON, ZEA, OTA, T-2, HT-2 y suma de fumonisinas en productos destinados a alimentación animal. Teniendo en cuenta tales valores, es importante insistir sobre el hecho que, en este estudio, las concentraciones de ZEA en dos de las muestras y la de sus metabolitos (α-ZOL y β-ZOL) en tres muestras, fueron superiores a los niveles máximos permitidos /recomendados por la Unión Europea en piensos.

Por otro lado, para las otras micotoxinas reguladas (DON, ZEA y FB_1+FB_2), las concentraciones obtenidas en las muestras analizadas eran inferiores a aquellos que la

Unión Europea recomienda como valores máximos en productos a base de maíz destinados a la alimentación animal.

Concluyendo, en el presente trabajo llevado a cabo en silos de maíz procedentes de explotaciones de Galicia, se ha demostrado la ocurrencia simultanea de más de una micotoxina, procedentes tanto de la etapa de pre-cosecha como la de post-cosecha, lo que convierte a los ensilados de maíz en uno de los alimentos para el ganado lechero que puede proporcionar una mayor ingesta de micotoxinas [37,38].

Esto pone de manifiesto la necesidad de establecer controles rigurosos en las muestras de ensilado, pues existe una gran posibilidad de efectos sinérgicos entre las micotoxinas presentes en un mismo alimento, además de los posibles efectos adversos debidos a las exposición crónica, tal y como ya fue confirmado en estudios anteriores [33,37].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. BIBLIOGRAFÍA

[1] Scudamore, K.A.; Livesey, C.T.; Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review; *J. Sci. Food Agric.*; 77, **1998**, 1–17.

[2] Bhat, R.; Rai, R.V.; Karim, A.A.; Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns; *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*; 9, **2010**, 57–81.

[3] Whitlow, L.W.; Hagler, W.M.Jr.; Diaz, D.E.; Mycotoxins in feed; *Feedstuffs*; 15, **2010**, 74–84.

[4] Dunière, L. ; Sindou, J. ; Chaucheyras-Durand, F. ; Chevallier, I. ;Thévenot-Sergentet, D.; Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms; *Anim. Feed .Sci. Tech*., 182, **2013**, 1-15.

[5] Cheli, F.; Campagnoli, A.; Dell´Orto V.; Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis; *Anim. Feed .Sci. Tech.*; 183, **2013**, 1-16.

[6] Boudra, H.; Morgavi, D.P.; Reduction in fusarium toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time; *J. Agric. Food Chem.;* 56, 2008, 4523-4528.

[7] Boudra, H.; Morgavi, D.P.; Reduction in fusarium toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time; *J. Agric. Food Chem.;* 56, 2008, 4523-4528.

[8] Fink-Gremmels, J.; The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows; *Vet. J.;* 176, **2008**, 84-92.

[9] Muñoz, L.; Cardelle, M.; Pereiro, M.; Riguera, R.; Occurrence of corn mycotoxins in Galicia (northwest Spain); *J.Agric. Food. Chem.;* 38, **1990**, 1004-1006.

[10] Sala, N.; Sanchís, V.; Vilaro, P.; Viladrich, R.; Torres, M.; Viñas, I.; Canela, R.; Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain; *J. Food. Protect.;* 57, **1994**, 915-917.

[11] Doko, M.B.; Rapior, S.; Visconti, A.; Schorith, J.E.; Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa; *J.Agric. Food. Chem.;* 43, **1995**, 429-434.

[12] Castellá, G.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J.; Surveillance of fumonisin contamination in maize based feeds and cereals from Spain; *J.Agric. Food. Chem.;* 47, **1999**, 4707-4710.

[13] Bakan, B.; Melcion, D.; Richard-Molard, D.; Cahagnier, B.; Fungal growth and *Fusarium* mycotoxins content in isogenic traditional and genetically modified maize grown in France and Spain; *J.Agric. Food. Chem.;* 50, **2002**, 728-731.

[14] Butrón, A.; Santiago, R.; Mansilla, P.; Pintos-Varela, C.; Ordás, A.; Malvar, R.A.; Maize (Zea mays L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination; *J.Agric. Food. Chem.;* 54, **2006**, 6113-6117.

[15] Schneweis, I.; Meyer, K.; Hormansdorfer, S.; Bauer, J.; Mycophenolic acid in silage; *Appl. Environ. Microbiol.;* 66, **2000**, 3639–3641.

[16] Mansfield, M.; Jones, A.; Kuldau, A.D.G.A.; Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins; *Phytopathol.;* 98, **2008**, 330–336.

[17] Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; Te Giffel, M.C.; Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes; *J. Dairy Sci.;* 91, **2008**, 4261-4271.

[18] Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; Te Giffel, M.C.; Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands; *Food Addit. Contam. Part B*; 1, **2008**, 41-50.

[19] Whitlow, L.W.; Hagler, W.M.Jr.; Mycotoxins in feed; *Feedstuffs*; 38, **2005**, 69-79.

[20] Mansfield, M.A.; Archibald, D.D.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A.; Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices; *Phytopathology;* 93, **2007**, 504-510.

[21] Garon, D.; Richard, D.; Sage, I.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P.;Mycoflora and multimycotoxina detection in corn silage: experimental study;*J.Agric. Food Chem.;* 54, **2006**, 3479-3484.

[22] Auerbach, H.; Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions; **2006;** En: http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mould-growth-mycotoxin-contamination-t219/p0.htm (Consulta: 14-02-15).

[23] Schollenberger, M.; Muller, H.M.; Rüfle, M.; Suchy, S.; Plank, S.; Drochener, W.; Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany; *Mycopathol.*; 161, **2006**, 43-52

[24] Cavallarin, L.; Borreani, G.; Tabacco, E.; Mycotoxin occurrence in farm maize silages in Northern Italy; Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation.; **2004**, 1023-1025.

[25] Signorini, M.L.; Gaggiotti, M.; Molineri, A.; , C.A.; Zapata de Basílico, M.L.; Basílico, J.C.; Pisani, M.; Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina; *Food Chem. Toxicol*.; 50, **2012**, 250-257.

[26] Tangni, E.K.; Pussemier, L.; Van Hove, F.; Mycotoxin contaminating maize grass silages for dairy cattle feeding: current state and challenges; *J. Anim. Sci. Adv.*; 3, **2013**, 492–511.

[27] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Pereira, S.; Cardelle, M.; Calidad higiénica de piensos, leches y ensilados de hierba y maíz en explotaciones lecheras de Galicia ; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba; **2008**, 329-335.

[28] Borreani, G.; Tabacco, E.; Antoniazzi, S.; Cavallarin, L.; Zearalenone contamination in farm maize silage; *Ital. J. Anim. Sci.*; **2005**, 4(2), 162-165.

[29] Queiroz, O.; Rabaglino, M.B.; Adesogan, A. ; Mycotoxins in silage. Deperatament of Animal Sciences, University of Florida ; **2013,** En: http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mould-growth-mycotoxin-contamination-t219/p0.htm (Consulta: 14-02-15).

[30] Recomendación de la Comisión del 17 de agosto de 2006 (2006/576/CE), sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal; DO L 229, **2006**, 7-9.

[31] Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on undesirable substances in feed; European Commission; Adopted on 20 February **2003**.

[32] Keller, L.A.M.; González Pereyra, M.L.; Keller, K.M.; Alonso, V.A.; Oliveira, A.A.;Almeida, T.X.; Barbosa, T.S.; Nunes, L.M.T.; Cavaglieri, L.R.; Rosa, C.A.R.; Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation; *J. Stored Prod. Res*.; 52, **2013**, 42-47.

[33] Drejer Storm, I.M.L.; Rasmussen, R.R.; Rasmussen, P.H.; Occurrence of pre-and post-harvest mycotoxins and other secondary metabolites in Danish maize silage; *Toxins*.; 6, **2014**, 2256-2269.

[34] Gallo, A.; Giuberti, G.; Frisvad, J.C.; Bertuzzi, T.; Nielsen, K.F.; Review on mycotoxins issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects; *Toxins*; 7, **2015**, 3057–3111.

[35] Pelhate, J.; Maize silage: Incidence of moulds during conservation; *Folia Vet. Lat.*; 7, **1977**, 1-16.

[36] Sumarah, M.W.; Miller, J.D.; Blackwell, B.A.; Isolation and metabolites production by Penicillium roqueforti, P. paneum and P. crustosum isolated in Canada; *Mycopathol.*; 159, **2005**, 571–577.

[37] Streit, E.; Schwab, C.; Sulyok, M.; Naehrer, K.; Krska, R.; Schatzmayr, G..; Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingridients; *Toxins;* 5 , **2013**, 504-523.

[38] Zachariasova, M.; Dzuman, Z.; Veprikova, Z.; Hajkova, K.; Jiru, M.; Vaclavikova, M.; Zachariasova, A.;Pospichalova, M.; Florian, M.; Hajslova, J.; Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals*; Anim. Feed Sci.Tech*.; 193,**2014,** 124-140.

V. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

V. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

Following the presentation and discussion of the results obtained in the research presented, it is convenient to assess whether it has achieved the aims set initially, and to what extent.

Therefore, in order to evaluate in more detail the scope of the results achieved, presented in this Chapter are the main conclusions related to the studies developed throughout Chapter IV.

1. Assessing the stability of *Fusarium* mycotoxins during the ensiling process in laboratory and conventional silos (*Section IV.A and IV.B).*

- The inoculations of corn plants with strains of *Fusarium* proved to be effective. Corn contaminated with fumonisins (inoculated with *F.verticilloides*) and deoxynivalenol, zearalenone and 3-acetyldeoxynivalenol (inoculated with *F.graminearum*) were obtained.
- This study enabled the assessment of the stability of fumonisins B_1 y B_2, deoxynivalenol, zearalenone and 3-acetyldeoxynivalenol in corn and corn silage samples contaminated with *Fusarium verticilloides* and *Fusarium graminearum* both in laboratory silos and conventional silos.
- Free forms of fumonisins (FB_1 and FB_2) were extracted by a simple solid-liquid extraction procedure followed by an alkaline hydrolysis of the residues resulting in the release of hydrolysed derivates (HFB_1 and HFB_2). Subsequently, the analytes were detected and quantified by LC-HESI-MS/MS.
- The high concentrations of HFB_1 and HFB_2 in corn silage samples have shown the existence of fumonisins that, due to the interactions with some matrix constituents, were "undetectable" after a common extraction procedure. Therefore an alkaline hydrolysis of the residue was needed. These "*modified*" fumonisins found in corn silage samples could be formed through non-covalent bound between fumonisins and matrix macro-constituents.
- Also, an analytical method based on a solid-liquid extraction followed by SPE to purify the extract was performed to determine deoxynivalenol, zearalenone and 3-acetyldeoxynivalenol in raw corn and corn silage samples. Subsequently, these mycotoxins were detected and quantified by using LC-HESI-MS/MS. In addition, deoxynivalenol and zearalenone were also analysed by HPLC-PDA-FLD.
- The methodologies proposed were acceptable and effective in determining the target mycotoxins in raw corn and corn silage samples.
- The results obtained from the analysis of laboratory silo samples have shown that the ensiling time was a significant factor ($P < 0,05$) but only on the stability of free forms of fumonisins B_1 and B_2, for those samples from the second harvest. On the other

hand, the use of *Lactobacillus Buchneri* as an inoculant has proven to be a significant factor ($P < 0,05$) for "total" and "modified" FB_1 for both harvest dates.

- The analysis of fumonisins in laboratory corn silo samples under aerobic conditions has shown higher levels of FB_1 and FB_2 "*modified*" and "*total*" than in those samples not exposed to air.
- For conventional silos, the data confirmed a higher presence of fumonisins in those bags placed on top of the silo, especially for FB_1 whose amount was 76% higher in the most superficial layer. This layer is the least compacted and more exposed to air leaks, presumably assisting the growth of fungi and the consequent appearance of mycotoxins. However, the section of the silage (initial or final) has proven to be a non-significant variable in the fumonisin amounts. In comparing the concentration of both mycotoxins in fresh corn and ensiled corn, the data has shown a decrease in the concentration of fumonisins in the lower parts of the silo, especially for FB_1.
- For all corn silage samples contaminated with *F. verticilloides,* "*modified*" fumonisins were found in higher amounts than in their "*free*" forms. In laboratory silos, "*modified*" fumonisins represented 65% for FB_1 and 39% for FB_2, and 75% for FB_1 and 45% for FB_2 in those samples under aerobic conditions. The higher percentages were obtained in the samples corresponding to the conventional silos, for which 79% and 69% of the total FB_1 and FB_2 concentrations, respectively, were due to "*modified*" fumonisins. This fact emphasises the need to quantify "*modified*" fumonisins in corn silage.
- Since no comprehensive survey in "*modified*" forms of fumonisins in corn silage has been carried out yet, the present study has provided very useful information regarding the risk of underestimation of total fumonisin levels in the matrix and subsequently on the underestimation of the likely toxicity to cattle.
- For both harvests, the analysis of laboratory silos has shown a decrease in the deoxynivalenol content during the ensiling process for both treatment with water and treatment with *Lactobacillus Buchneri*. In contrast, the amount of zearalenone remained practically constant in all cases except for those samples treated with the inoculant *Lactobacillus Buchneri* from the second harvest date, for which a 50% increase in zearalenone concentration was observed during storage time.
- In conventional silos, higher concentrations of zearalenone were detected in those bags placed in the upper part of the silo. Comparing the concentrations of deoxynivalenol and zearalenone between raw corn and corn silage contained in the bags (during a period of about two months), the zearalenone content decrease was higher in the lowest layer of the silo, whereas the deoxynivalenol content was mainly reduced in the higher parts corresponding to the initial section of the silo.

2. Development and validation of a multi-mycotoxin method based on LC-MS/MS in corn silage. Assessment of mycotoxins in corn silage samples from Galician dairy farms (*Section IV.C and IV.D*).

- A multi-analyte method for the simultaneous detection and quantification of mycotoxins in corn silage by using a simplified solid-liquid extraction without clean-up and with clean up on Mycospin^{TM} 400 columns followed by LC-HESI-MS/MS was developed.

- An alternative validation strategy (based on the ISO 11843-2 and ISO 5275-2) was performed in order to validate the multi-mycotoxin analytical method with and without a clean-up step. Different quality parameters such as linearity, matrix effect, recoveries, repeatability, within-lab reproducibility, decision limit (CCα) and detection limit capability (CCβ) were assessed.
- The method was successfully validated for 24 mycotoxins in maize silage, among which the regulated and recommended ones are included, as well as some of the most frequently occurring in corn silage.
- Taking into account the method performance parameters, especially those related to the poor trueness and precision, and the total loss of some of the mycotoxins by using Mycospin columns, all the corn silage samples from Galician farms were extracted without including the clean-up step.
- The highly suppressed and enhanced signals (fumonisins) of the target mycotoxins in the presence of matrix (matrix effect) were compensated for by using *matrix-matched standard* calibration curves to quantify the mycotoxins in the silage samples.
- In order to assess the multi-mycotoxin occurrence in corn silage, the validated method was applied to 148 samples collected from 19 dairy farms in Galicia, in two different seasons (winter and summer) over two years. 62% of the analysed samples contained at least one mycotoxin. 13 mycotoxins were detected and five out of the 148 samples were contaminated with more than four mycotoxins simultaneously. Zearalenone, deoxynivalenol, fumonisins B_1 and B_2, roquefortine C, α-zearalenol, β-zearalenol, enniantin B and B_1, andrastin A, marcfortine A, verruculogen and mycophenolic acid were quantified, the highest average detection frequency being for enniantin B_1 (51%) and zearalenone (21%). Deoxynivalenol, mycophenolic acid and zearalenone plus metabolites (α-zearalenol y β-zearalenol) were the most abundant mycotoxins.
- The concentrations of zearalenona and its metabolites (α-zearalenol y β-zearalenol) in two and three of the analysed samples in this survey respectively, were above the EU recommended maximum levels in feed.
- The work presented has also shown the co-existence of more than one mycotoxin in the same corn silage sample, emphasising the need for thorough controls, as there is the possibility of additive and synergistic effects.

It should also be emphasised that part of the work collected in this Thesis has been published in high impact factor journals, such as *Food Chemistry* and *Food Additives and Contaminants Part A*, and has been presented in national and international conferences.

A third manuscript dealing with the results decribed in the Chapter IV (Section IV.B) is currently under preparation to be submitted to the *Journal Animal Food Science and Tecnology*.

This Thesis has highlighted the results of an exhaustive research into the behaviour of mycotoxins in corn silages. This research will continue focusing on the identification and quantification of new modified forms of mycotoxins in silages and raw materials.

Tras la presentación y discusión de los resultados derivados de este trabajo de investigación, es conveniente evaluar si se ha cumplido los objetivos marcados inicialmente, y en qué medida.

Por tanto, para tratar de conocer con más detalle el alcance de los resultados obtenidos, se recogen en el presente Capítulo las principales conclusiones relacionadas con los estudios desarrollados a lo largo del Capítulo IV.

1. Evaluar la estabilidad de micotoxinas del género *Fusarium* durante el proceso de ensilado, en silos de laboratorio y en silos convencionales (trinchera) (*Sección IV.A y IV.B).*

- Las inoculaciones de las plantas de maíz con las cepas micotoxigénicas de *Fusarium* resultaron ser efectivas, obteniéndose maíz contaminado con fumonisinas (inoculación con *F.verticilloides*) y maíz contaminado con deoxinivalenol, zearalenona y 3-acetildeoxinivalenol (inoculación con *F.graminearum*).
- Este estudio permitió evaluar la estabilidad de fumonisinas B_1 y B_2, deoxinivalenol, zearalenona y 3-acetildeoxinivalenol en muestras de maíz y de ensilado de maíz contaminado con *Fusarium verticilloides* y *Fusarium graminearum* tanto en silos elaborados en condiciones de laboratorio como en silos convencionales.
- Se ha llevado a cabo la extracción en muestras de maíz y silo de maíz de las fumonisinas en su forma libre (FB_1 y FB_2) basado en un sencillo procedimiento sólido-líquido, seguida de una hidrólisis alcalina de los residuos para la liberación de los derivados hidrolizados (HFB_1 y HFB_2). Posteriormente, los analitos se detectaron y cuantificaron por LC-HESI-MS/MS.
- Las elevadas concentraciones de HFB_1 y HFB_2 pusieron de manifiesto que en las muestras de silo maíz existían fumonisinas que, debido a uniones con componentes de la matriz, eran "no detectables" tras un método de extracción común, haciendo necesaria la posterior hidrólisis alcalina del residuo. Estas fumonisinas "modificadas" encontradas en las muestras de silo de maíz podían ser formadas a través de uniones "no covalentes" entre las fuminisinas y unos macrocomponentes de la matriz.
- También se desarrolló un método analítico para la determinación de deoxinivalenol, zearalenona y 3-acetildeoxinivalenol en muestras de maíz fresco y maíz ensilado basado en una extracción sólido-líquido seguido de una SPE para purificar el extracto seguido de una detección por LC-HESI-MS/MS. Además, el deoxinivalenol y la zearalenona también se analizaron utilizando HPLC-PDA-FLD.
- Las metodologías analíticas propuestas resultaron válidas y eficaces para la determinación de las micotoxinas objeto de estudio en las muestras de maíz y silo de maíz.
- Los datos obtenidos del análisis de las muestras de silos de laboratorio demostraron que el tiempo de ensilado sólo fue un factor significativo ($P < 0,05$) sobre la estabilidad de las fumonisinas B_1 y B_2 en sus formas libres en aquellas muestras procedentes de la segunda cosecha. Por otro lado, para ambas cosechas, el uso de *Lactobacillus Buchneri* como inoculante sí ha demostrado ser un factor significativo ($P < 0,05$), pero tan sólo para el "*total*" de la FB_1 y para la FB_1 en su forma "*modificada*".

- EL análisis de fumonisinas en las muestras de silos de de laboratorio bajo deterioro aeróbico mostraron mayores niveles de FB_1 y FB_2 "*modificadas*" y "*totales*" para las muestras de silo que no habían sido expuestas al aire.
- Los resultados extraídos del ensayo de silos convencionales revelaron mayores cantidades de fumonisinas en aquellos sacos colocados en la parte superior del silo, especialmente para la FB_1, cuyo contenido resultó ser un 76% superior en la capa más superficial. Esta capa es la menos compactada y más expuesta a filtraciones de aire, por lo que el crecimiento de hongo y la consecuente aparición de micotoxinas están presumiblemente favorecidos. En cambio, la sección del silo (inicial y final), no resultó ser una variable significativa sobre los contenidos de fumonisinas. Comparando las concentraciones de ambas micotoxinas en el maíz fresco y en el maíz ensilado en sacos, los resultados obtenidos revelaron un descenso en las concentraciones de fumonisinas en las partes más bajas de silo, siendo esta disminución especialmente acusada para la FB_1.
- Para todas las muestras de silo de maíz contaminado con *F. verticilloides*, la cantidad de fumonisinas "*modificadas*" era muy superior a la cantidad de fumonisinas en sus formas "*libres*". En el ensayo concreto con silos de laboratorio, las fumonisinas en sus formas modificadas representaban un 65% para la FB_1 y un 39% para la FB_2, y un 75% para la FB_1 y un 45% para la FB_2 en las muestras de silos de laboratorio bajo condiciones aeróbicas. Los mayores porcentajes se obtuvieron en las muestras correspondientes a los silos trinchera, para los cuales un 79% y un 69% del contenido total de FB_1 y FB_2, respectivamente, procedían de las formas modificadas. Este hecho enfatiza la necesidad de cuantificar sistemáticamente las fumonisinas "*modificadas*" en muestras de silo de maíz.
- Dado que hasta ahora no existía ningún estudio exhaustivo sobre fumonisinas en sus formas modificadas en muestras de silo de maíz, el trabajo presentado proporciona información muy útil sobre el riesgo de subestimación de los niveles de fumonisinas totales en ensilados de maíz, y consecuentemente, sobre la subestimación de la toxicidad real para el ganado.
- Para ambas cosechas, el análisis de los silos de laboratorio demostró que durante el proceso de ensilado el contenido del deoxinivalenol disminuía tanto en el tratamiento con agua como en el tratamiento con *Lactobacillus Buchneri*. En cambio, la cantidad de zearalenona se mantuvo prácticamente constante para todos los casos, excepto para aquellas muestras tratadas con el inoculante *Lactobacillus Buchneri* y correspondientes a la segunda cosecha, para las cuales se observó un aumento en la concentración de zearalenona de casi un 50% durante el tiempo de almacenamiento.
- En los silos convencionales, se detectaron mayores concentraciones de zearalenona en aquellos sacos colocados en la parte más superior del silo trinchera. Comparando las concentraciones de deoxinivalenol y de zearalenona en el maíz fresco y en el maíz ensilado en los sacos (durante aproximadamente unos dos meses), se puede deducir que la tasa de disminución para la zearalenona fue mayor en la capa más baja del silo, mientras que el contenido en deoxinivalenol se vio más reducido en las partes más altas y correspondientes a la sección inicial del silo.

2. Desarrollo y validación de un método multi-micotoxinas basado en la técnica LC-MS/MS para muestras de silo de maíz. Determinación de micotoxinas en muestras de silo de maíz de explotaciones gallegas (*Sección IV.C y IV.D*).

- Se desarrolló un método para la determinación simultánea de varias micotoxinas en ensilado de maíz utilizando una extracción sólida-líquida simple sin etapa de purificación y con etapa de purificación con columnas Mycospin^{TM} 400, basándose en la detección LC-HESI-MS/MS.
- Se empleó una estrategia de validación alternativa (basada en las normas de calidad ISO 11843-2 e ISO 5275-2) para validar el método analítico multi-micotoxinas con y sin etapa de limpieza en muestras de ensilados de maíz. De este modo, se evaluaron los distintos parámetros de calidad: linealidad, efecto matriz, límites de detección y cuantificación, recuperaciones, repetibilidad y reproducibilidad, límites de decisión (CCα) y capacidad de detección (CCβ).
- El método se validó con éxito para un total de 24 micotoxinas, entre las cuales, además de aquellas cuyos contenidos máximos están regulados y recomendados en alimentación animal, también se encontraban micotoxinas que con frecuencia contaminan el silo de maíz.
- Teniendo en cuenta los parámetros de calidad del método relacionados principalmente con la exactitud y la precisión, así como la pérdida de alguna de las micotoxinas, al usar las columnas Mycospin, el método aplicado en las muestras de silo procedentes de las explotaciones gallegas fue aquel que no incluía etapa de limpieza.
- Las elevadas supresiones y aumentos (fumonisinas) en las señales de las micotoxinas estudiadas en presencia de la matriz silo (efecto matriz), se compensaron mediante el uso de curvas de calibración adquiridas con un 100% de matriz (*matrix-matched standard)* para la cuantificación de las muestras.
- Para evaluar el nivel de contaminación con micotoxinas, el método validado se aplicó a 148 muestras de ensilado de maíz procedentes de 19 explotaciones de Galicia, recogidas en dos épocas (invierno y verano), durante dos años. Un 62% de las muestras analizadas contenían al menos una micotoxina. 13 micotoxinas fueron detectadas y en cinco de las 148 muestras se llegaron a detectar más de cuatro micotoxinas simultáneamente. Zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas B_1 y B_2, roquefortina C, α-zearalenol, β-zearalenol, eniantina B y B_1, andrastina A, marcfortina A, verruculogen y ácido micofenólico, siendo la eniantina B_1 (51%) y la ZEA (21%) las más frecuentemente encontradas. Las micotoxinas detectadas con mayores concentraciones fueron el deoxinivalenol, ácido micofenólico, zearalenona y sus metabolitos (α-zearalenol y β-zearalenol).
- Las concentraciones de zearalenona en dos de las muestras analizadas en este estudio, y la de sus metabolitos (α-zearalenol y β-zearalenol) en tres muestras, fueron superiores a los niveles recomendados por la Unión Europea en piensos.
- El presente trabajo también ha puesto de manifiesto la coexistencia de más de una micotoxina en una misma muestra de ensilado de maíz, enfatizando la necesidad de realizar controles exhaustivos, ya que existe la posibilidad de efectos aditivos y sinérgicos.

Resaltar que parte de los trabajos recogidos en esta Tesis se han publicado en revistas de alto índice de impacto como *Food Chemistry* y *Food Additives and Contaminants Part A,* y se han presentado en congresos nacionales e internacionales. Un tercer trabajo relacionado con los resultados descritos en el Capítulo IV (Sección IV.B) está en fase de preparación en estos momentos para mandar a la revista *Animal Food Science and Technology*.

Esta Tesis ha expuesto los resultados de una exhaustiva investigación acerca del comportamiento de las micotoxinas en ensilados de maíz. Esta investigación continuará enfocada en la identificación y cuantificación de nuevas formas modificadas de micotoxinas en ensilados y en materias primas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. ANEXOS

OTRAS DETERMINACIONES REALIZADAS EN LAS MUESTRAS DE MAIZ FRESCO Y ENSILADO

Análisis de la composición química

Se determinó el contenido en materia orgánica, proteína bruta, fibra ácido detergente, fibra neutra detergente, fibra neutra detergente, carbohidratos solubles y almidón mediante análisis por espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRs), utilizando las ecuaciones desarrolladas en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM, Mabegondo, A Coruña) para maíz fresco y ensilado. Este análisis se realizó sobre las muestras secas (40°C, 48 horas) y molidas (1mm).

Análisis de la calidad fermentativa

Para evaluar si la fermentación había sido correcta, se determinaron los siguientes parámetros: pH, alcohol, ácido de la fermentación (láctico, acético, propiónico y butírico), nitrógeno amoniacal y nitrógeno soluble.

El valor del pH se determinó por métodos electrométricos sobre 20 g de muestra fresca macerada en 15 mL de agua destilada. Los contenidos en ácidos de la fermentación y alcohol se realizaron en el Laboratorio Agrario y Fitopatológico de Galicia (LAFIGA, Mabegondo, A Coruña) por cromatografía de gases **[1]**. El nitrógeno amoniacal y nitrógeno soluble se determinó mediante electrodo selectivo Orion y por destilación Kjeldhal, respectivamente, tras la maceración de la muestra fresca con agua a 80°C.

Para la corrección del valor de la materia seca estufa por las pérdidas de constituyentes volátiles (ácidos, alcoholes y amoniaco) durante el proceso de secado, se utilizaron los coeficientes de volatilidad propuesto por el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Francia) **[1]**.

Análisis de hongos y levaduras

Los análisis de hongos y levaduras de las muestras de maíz fresco y ensilado se realizaron en el Laboratorio Agrario y Fitopatológico de Galicia (LAFIGA, Mabegondo, A Coruña). Se identificaron las especies de los géneros *Penicillum*, *Fusarium* y *Aspergillus*, mediante técnicas clásicas de cultivo en medio selectivo e identificación con microscopio **[2]** y técnicas moleculares de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real **[3]**.

Se suspendieron 100 g de la muestra en 500 mL de disolución de dodecil sulfato de sodio en agua destilada (0,05% p/v) y al cabo de una hora de agitación, se sembró en placa en medio de cultivo extracto de malta de agar (MEA) con cloranfenicol (0,05% p/v). A continuación, se incubaron a 24 y 37°C y se realizó un seguimiento periódico del crecimiento de las colonias y un replicado a partir de las zonas en crecimiento para obtener cultivos puros.

Para las especies pertenecientes al género *Penicillum*, se utilizaron también otros dos medio selectivos en agar, Czapek autolizado de levadura (CYA) y glicerol nitrato (G25N),

incubándolas a 5, 22 y 37°C; y las especies de *Fusarium* se cultivaron también en medio agar papa dextrosa (PDA).

Los hongos aislados se identificaron mediante examen de morfología macro y microscópica y mediante PCR en tiempo real, extrayendo ADN a partir de la muestra con kits comerciales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[1] Fernández-Lorenzo, B.; Barreal, M.L.; Flores, G.; González-Arráez, A.; Valladares, J.; Pereira, S.; Cardelle, M.; Efectos de la fechas de cosecha y el uso de inoculantes sobre la calidad fermentativa, la estabilidad aeróbica y la calidad higiénica en ensilados de maíz ; *Actas de la XLVII Reunión Científica de la SEEP,* Córdoba;36, **2008**, 337-346.

[2] Garon, D.; Richard, E.; Sage, L.; Bouchard, V.; Pottier, D.; Lebailly, P.; Mycoflora and multimycotoxin detection on corn silage: experimental study; *J. Agric. Food Chem.*; 54, **2006**, 3479–3484.

[3] White, P.L.; Barnes, R.A.; *Aspergillus* PCR- Platforms, strengths and weaknesses; *Medical Mycology September*; 44, **2006**, 191–198.

Concentraciones de FB_1 y FB_2 "*libres*", "*modificadas*" y "*totales*" en silos de laboratorio

				Fumonisinas *"libres"*		**Fumonisinas *"modificadas"***		**Fumonisinas *"totales"***	
Muestra	Cosecha	Inoculante	Tiempo de ensilado (días)	FB_1 (ug kg^{-1})	FB_2 (ug kg^{-1})	FB_1 (ug kg^{-1})	FB_2 (ug kg^{-1})	FB_1 (ug kg^{-1})	FB_2 (ug kg^{-1})
1	1ª	agua	0	8770,0	3208,7	14478,5	1945,0	23248,6	5153,6
2	1ª	agua	0	6960,6	1919,9	13734,3	3172,1	20694,9	5092,0
3	1ª	agua	0	9797,8	3071,9	18862,2	2725,2	28660,0	5797,1
4	1ª	agua	0	7917,8	2674,5	15391,4	2288,4	23309,2	4963,0
5	1ª	agua	0	8941,1	2989,5	20453,0	1806,9	29394,1	4796,4
6	1ª	agua	0	11780,7	2937,2	11410,9	2613,7	23191,6	5550,9
7	1ª	agua	0	10484,8	3703,9	10469,9	2643,4	20954,7	6347,3
8	1ª	agua	60	7149,0	2208,6	12098,9	2401,7	19247,9	4610,4
9	1ª	agua	60	9730,5	3973,7	16816,8	1608,5	26547,3	5582,2
10	1ª	agua	60	12497,1	4002,6	12098,9	2401,7	24596,0	6404,4
11	1ª	agua	60	7826,0	1470,5	12402,5	971,4	20228,5	2441,8
12	1ª	agua	60	11558,9	3953,5	14323,3	1040,4	25882,2	4993,9
13	1ª	agua	60	6377,3	1267,4	12098,9	2401,7	18476,3	3669,1
14	1ª	agua	60	7562,4	1746,6	18800,0	1930,2	26362,4	3676,8
15	1ª	agua	120	8025,7	4092,1	8717,2	2551,9	16742,9	6644,0
16	1ª	agua	120	6743,4	1438,2	11957,3	1119,5	18700,7	2557,7
17	1ª	agua	120	10487,0	3482,9	18942,7	1406,2	29429,7	4889,2
18	1ª	agua	120	10907,6	4112,3	8717,2	2551,9	19624,8	6664,2
19	1ª	agua	120	6462,2	1145,2	13020,3	1148,6	19482,5	2293,8
20	1ª	agua	120	7647,8	5106,1	8717,2	2551,9	16365,0	7658,0
21	1ª	agua	120	6030,3	1394,6	15119,3	1192,4	21149,6	2587,0
22	1ª	agua	120	10062,8	5489,1	8717,2	2551,9	18780,0	8041,0
23	1ª	agua	240	6713,9	1387,9	9443,6	2824,7	16157,5	4212,6
24	1ª	agua	240	6699,2	1182,5	9531,7	885,6	16230,8	2068,2
25	1ª	agua	240	6150,2	1637,4	18298,5	4503,3	24448,6	6140,8
26	1ª	agua	240	6099,1	1374,8	20742,7	1585,1	26841,8	2959,9
27	1ª	agua	240	8559,1	3064,0	16445,8	4612,0	25004,9	7676,1
28	1ª	agua	240	11904,3	5035,3	13904,7	1415,0	25808,9	6450,3
29	1ª	agua	240	6805,3	1596,8	16946,2	4246,8	23751,6	5843,5
30	1ª	agua	240	6265,7	1579,6	11477,9	1288,7	17743,7	2868,3
31	1ª	*L.Buchneri*	0	7924,2	2427,1	15337,5	1382,4	23261,7	3809,6
32	1ª	*L.Buchneri*	0	8548,0	2797,4	19578,7	1766,1	28126,8	4563,4
33	1ª	*L.Buchneri*	0	7339,3	1549,0	20355,6	1413,2	27694,9	2962,2
34	1ª	*L.Buchneri*	0	6665,9	1790,9	16778,0	3765,8	23443,9	5556,7
35	1ª	*L.Buchneri*	0	5265,1	807,6	12331,2	2961,9	17596,3	3769,5

36	1ª	*L.Buchneri*	0	8413,8	2415,2	10415,2	1126,6	18829,0	3541,8
37	1ª	*L.Buchneri*	0	10072,9	2213,3	15307,7	3095,1	25380,6	5308,4
38	1ª	*L.Buchneri*	0	9668,4	3112,2	15660,8	3977,2	25329,2	7089,4
39	1ª	*L.Buchneri*	60	6205,8	1123,1	15473,2	4749,5	21679,0	5872,6
40	1ª	*L.Buchneri*	60	7171,6	1690,0	21811,6	2133,4	28983,3	3823,5
41	1ª	*L.Buchneri*	60	10950,0	4702,0	13686,8	2499,7	24636,8	7201,7
42	1ª	*L.Buchneri*	60	7135,2	1899,4	16083,9	3526,8	23219,1	5426,2
43	1ª	*L.Buchneri*	60	6126,2	1801,9	20329,5	2283,7	26455,8	4085,6
44	1ª	*L.Buchneri*	60	8387,0	2803,4	14139,1	2628,0	22526,1	5431,4
45	1ª	*L.Buchneri*	60	4967,2	929,6	22480,5	3500,6	27447,7	4430,3
46	1ª	*L.Buchneri*	60	4271,3	786,6	25793,1	1837,6	30064,4	2624,2
47	1ª	*L.Buchneri*	120	7466,2	1797,2	21909,9	2201,1	29376,1	3998,3
48	1ª	*L.Buchneri*	120	8073,4	4421,8	14672,6	3169,2	22746,0	7591,0
49	1ª	*L.Buchneri*	120	9579,8	3754,3	18636,4	3078,3	28216,2	6832,6
50	1ª	*L.Buchneri*	120	4550,3	780,3	18743,2	2014,1	23293,5	2794,4
51	1ª	*L.Buchneri*	120	7033,4	2090,9	13954,6	1642,3	20988,0	3733,2
52	1ª	*L.Buchneri*	120	9434,5	6145,7	13552,3	2967,2	22986,8	9112,9
53	1ª	*L.Buchneri*	120	4991,2	1405,4	24330,5	2516,7	29321,7	3922,1
54	1ª	*L.Buchneri*	120	11259,3	4461,3	18633,0	3983,4	29892,3	8444,7
55	1ª	*L.Buchneri*	240	6459,6	1822,9	19935,5	3889,3	26395,1	5712,2
56	1ª	*L.Buchneri*	240	10101,6	2983,2	18470,2	3538,3	28571,7	6521,5
57	1ª	*L.Buchneri*	240	6081,5	1891,4	9779,4	1330,1	15860,9	3221,5
58	1ª	*L.Buchneri*	240	7729,4	2156,3	12734,3	1896,1	20463,7	4052,4
59	1ª	*L.Buchneri*	240	10685,4	3859,6	11322,8	1470,5	22008,2	5330,1
60	1ª	*L.Buchneri*	240	9150,4	2660,1	15943,6	2378,3	25094,1	5038,4
61	1ª	*L.Buchneri*	240	8217,0	2705,6	15943,6	2378,3	24160,6	5083,9
62	2ª	agua	0	10098,6	4433,9	19234,7	4455,3	29333,3	8889,1
63	2ª	agua	0	18592,6	14227,8	31619,3	6339,7	50211,9	20567,5
64	2ª	agua	0	10265,4	8281,0	36239,6	7531,0	46505,0	15812,0
65	2ª	agua	0	14226,0	6880,3	43647,4	2529,3	57873,4	9409,5
66	2ª	agua	0	16211,1	13521,8	39935,4	1842,1	56146,5	15363,9
67	2ª	agua	0	13844,7	12482,9	24573,0	2541,8	38417,6	15024,7
68	2ª	agua	0	14322,0	11665,4	37821,6	1824,5	52143,6	13489,9
69	2ª	agua	0	14150,6	7048,0	30790,0	6032,0	44940,6	13080,1
70	2ª	agua	60	31217,5	40895,8	38098,6	4869,4	69316,2	45765,3
71	2ª	agua	60	15030,7	7374,4	26676,0	3812,7	41706,7	11187,1
72	2ª	agua	60	12443,3	5367,3	37661,1	8290,2	50104,5	13657,5
73	2ª	agua	60	17363,6	8683,5	11773,6	2479,2	29137,1	11162,7
74	2ª	agua	60	13462,2	6035,6	26039,8	2680,0	39502,0	8715,6
75	2ª	agua	60	16260,0	9816,4	25162,0	3365,2	41422,0	13181,5
76	2ª	agua	60	16740,0	10970,4	24352,9	3883,9	41092,8	14854,3
77	2ª	agua	60	15009,3	8399,2	22861,5	3421,4	37870,8	11820,6
78	2ª	agua	120	14953,8	7986,7	24862,9	4107,4	39816,7	12094,1
79	2ª	agua	120	15657,2	8021,4	31441,0	4694,4	47098,2	12715,9

80	2ª	agua	120	10592,9	6085,8	21923,5	4282,9	32516,4	10368,6
81	2ª	agua	120	15347,3	8590,8	21546,2	2125,8	36893,5	10716,5
82	2ª	agua	120	16252,6	11036,6	20700,2	3264,1	36952,8	14300,7
83	2ª	agua	120	14565,8	21107,0	24203,0	3313,1	38768,7	24420,0
84	2ª	agua	120	15022,2	7652,0	28244,4	4593,7	43266,6	12245,7
85	2ª	agua	120	12686,5	6529,4	27978,2	4307,7	40664,7	10837,2
86	2ª	agua	240	12521,4	7445,3	31997,2	5789,9	44518,7	13235,2
87	2ª	agua	240	15256,8	6403,4	35316,9	2727,9	50573,7	9131,3
88	2ª	agua	240	11332,4	5480,3	28234,7	4013,2	39567,1	9493,5
89	2ª	agua	240	13521,5	7165,5	30260,2	2803,7	43781,7	9969,2
90	2ª	agua	240	10104,4	5995,6	18591,2	3072,2	28695,6	9067,8
91	2ª	agua	240	10973,9	4885,6	26384,0	3010,8	37358,0	7896,4
92	2ª	agua	240	12472,1	7561,3	22278,9	3348,8	34751,0	10910,1
93	2ª	agua	240	14404,3	7366,1	37163,4	3301,8	51567,7	10667,9
94	2ª	*L.Buchneri*	0	9147,1	11575,0	28008,9	4147,3	37156,0	15722,4
95	2ª	*L.Buchneri*	0	16098,5	10461,0	48803,7	4488,7	64902,1	14949,7
96	2ª	*L.Buchneri*	0	13953,2	8326,9	33123,3	4532,7	47076,5	12859,6
97	2ª	*L.Buchneri*	0	11550,8	9397,7	26793,9	3739,0	38344,7	13136,7
98	2ª	*L.Buchneri*	0	16575,6	12942,5	32277,0	3853,3	48852,6	16795,8
99	2ª	*L.Buchneri*	0	11746,4	14355,4	29835,7	5688,1	41582,1	20043,5
100	2ª	*L.Buchneri*	0	16932,4	7957,9	24073,7	3030,9	41006,0	10988,8
101	2ª	*L.Buchneri*	60	17613,8	33739,5	34892,5	4986,8	52506,2	38726,3
102	2ª	*L.Buchneri*	60	15469,3	7316,3	30277,0	4486,5	45746,3	11802,8
103	2ª	*L.Buchneri*	60	22885,8	21440,1	33121,8	6258,9	56007,6	27699,0
104	2ª	*L.Buchneri*	60	13667,0	8210,1	26394,3	4947,0	40061,3	13157,1
105	2ª	*L.Buchneri*	60	14701,4	7986,8	48445,7	5999,7	63147,1	13986,5
106	2ª	*L.Buchneri*	60	17758,8	30158,1	25840,4	4132,2	43599,3	34290,3
107	2ª	*L.Buchneri*	60	19421,8	14457,6	34464,9	7704,8	53886,7	22162,4
108	2ª	*L.Buchneri*	60	16666,1	10218,0	33877,0	4457,2	50543,1	14675,2
109	2ª	*L.Buchneri*	120	14208,9	12308,5	27046,9	3945,4	41255,8	16254,0
110	2ª	*L.Buchneri*	120	15230,8	8035,5	36743,2	8022,9	51974,0	16058,4
111	2ª	*L.Buchneri*	120	12341,7	5208,2	49680,0	2649,4	62021,7	7857,6
112	2ª	*L.Buchneri*	120	11503,0	5835,4	52056,5	5632,6	63559,5	11468,1
113	2ª	*L.Buchneri*	120	12300,6	7854,6	46821,3	5853,1	59121,8	13707,7
114	2ª	*L.Buchneri*	120	13524,4	21949,6	29718,2	4865,9	43242,6	26815,5
115	2ª	*L.Buchneri*	120	14071,1	9691,9	38240,8	2191,2	52311,9	11883,2
116	2ª	*L.Buchneri*	120	15784,8	9243,2	18630,7	2867,9	34415,5	12111,1
117	2ª	*L.Buchneri*	240	14576,2	11544,9	26100,8	5001,5	40677,1	16546,4
118	2ª	*L.Buchneri*	240	15486,3	11135,6	51018,3	9484,8	66504,6	20620,4
119	2ª	*L.Buchneri*	240	16696,9	12115,3	15191,2	3786,8	31888,1	15902,1
120	2ª	*L.Buchneri*	240	13194,9	10407,8	50972,1	7971,5	64167,1	18379,3
121	2ª	*L.Buchneri*	240	21730,9	11229,2	28611,0	5676,9	50341,9	16906,1
122	2ª	*L.Buchneri*	240	15378,4	6295,4	41825,4	4839,6	57203,8	11135,0
123	2ª	*L.Buchneri*	240	14602,0	5106,6	43583,4	6800,1	58185,4	11906,7

124	2ª	*L.Buchneri*	240	11484,8	2602,1	47106,3	4836,8	58591,1	7438,9

Concentraciones de FB_1 y FB_2 "*libres*", "*modificadas*" y "*totales*" en silos de laboratorio bajo **deterioro aeróbico**

				Fumonisinas *"libres"*		**Fumonisinas *"modificadas"***		**Fumonisinas *"totales"***	
	Cosecha	Inoculante	Tiempo de ensilado (días)	FB_1 (ug kg^{-1})	FB_2 (ug kg^{-1})	FB_1 (ug kg^{-1})	FB_2 (ug kg^{-1})	FB_1 (ug kg^{-1})	FB_2 (ug kg^{-1})
1	1ª	agua	60	10875,4	3487,5	24414,3	3446,7	35289,7	6934,2
2	1ª	agua	60	13046,1	5032,5	28471,2	3454,2	41517,3	8486,7
3	1ª	agua	60	9435,0	2936,8	21397,2	2993,6	30832,3	5930,4
4	1ª	agua	60	7892,0	1870,5	24472,6	4181,8	32364,5	6052,3
5	1ª	agua	120	9317,4	2060,3	33125,7	4203,9	42443,1	6264,2
6	1ª	agua	120	10896,5	3994,2	32937,9	4575,1	43834,4	8569,3
7	1ª	agua	120	12298,5	2571,5	24480,4	3594,7	36778,9	6166,2
8	1ª	agua	120	15295,2	4055,7	30829,7	3928,6	46124,9	7984,4
9	1ª	agua	240	11265,4	3514,4	32459,8	2902,6	43725,2	6417,0
10	1ª	agua	240	9614,2	2637,9	30658,0	4038,9	40272,3	6676,7
11	1ª	agua	240	7646,2	1567,5	34287,8	4124,3	41934,0	5691,8
12	1ª	agua	240	12376,9	4281,6	28336,8	3606,6	40713,6	7888,2
13	1ª	*L.Buchneri*	60	13185,4	3934,3	26107,7	3848,4	39293,0	7782,6
14	1ª	*L.Buchneri*	60	7898,3	1998,4	30810,4	2533,0	38708,7	4531,5
15	1ª	*L.Buchneri*	60	9934,6	2354,2	26434,3	4290,6	36369,0	6644,8
16	1ª	*L.Buchneri*	60	9960,5	3228,3	25201,1	2425,2	35161,6	5653,5
17	1ª	*L.Buchneri*	120	9067,8	2526,4	28636,5	3724,0	37704,3	6250,4
18	1ª	*L.Buchneri*	120	9505,9	2656,1	29001,7	5324,3	38507,6	7980,4
19	1ª	*L.Buchneri*	120	11890,6	6319,5	24588,2	3587,0	36478,8	9906,6
20	1ª	*L.Buchneri*	120	10241,9	1399,8	20418,2	3469,7	30660,1	4869,5
21	1ª	*L.Buchneri*	240	7677,6	1090,7	32642,8	2149,6	40320,3	3240,3
22	1ª	*L.Buchneri*	240	8531,2	1554,1	24935,8	3455,1	33467,0	5009,2
23	1ª	*L.Buchneri*	240	8641,5	1400,2	27194,5	2458,9	35836,0	3859,1
24	1ª	*L.Buchneri*	240	15733,2	3682,2	24934,3	4586,2	40667,6	8268,4
25	2nd	agua	60	13973,1	7028,6	42626,8	5411,0	56599,9	12439,6
26	2nd	agua	60	16974,2	11522,3	49616,2	5654,1	66590,5	17176,4
27	2nd	agua	60	14224,3	8639,9	48421,5	6978,5	62645,7	15618,4
28	2nd	agua	60	17579,8	11110,1	54887,2	4486,1	72466,9	15596,1
29	2nd	agua	120	11555,5	5963,2	59406,3	8039,0	70961,8	14002,2
30	2nd	agua	120	11633,4	7001,9	61215,9	7388,9	72849,3	14390,8
31	2nd	agua	120	14588,4	8287,6	49094,7	7180,5	63683,1	15468,1
32	2nd	agua	120	11544,2	4962,9	42106,9	3280,4	53651,1	8243,3
33	2nd	agua	240	13602,6	6290,7	50640,0	5756,3	64242,7	12047,0
34	2nd	agua	240	11700,5	5544,3	45806,8	4041,1	57507,3	9585,4

35	2nd	agua	240	12749,0	7948,1	46858,3	4386,6	59607,3	12334,7
36	2nd	agua	240	15494,5	12370,9	47645,1	6105,9	63139,6	18476,8
37	2nd	*L.Buchneri*	60	17202,3	9493,1	68896,7	3752,6	86099,1	13245,7
38	2nd	*L.Buchneri*	60	18460,3	10558,0	68879,1	4370,1	87339,4	14928,2
39	2nd	*L.Buchneri*	60	15395,2	8055,3	44530,6	3822,3	59925,8	11877,6
40	2nd	*L.Buchneri*	60	16627,6	11751,3	61893,4	6036,4	78521,0	17787,6
41	2nd	*L.Buchneri*	120	20478,5	19819,3	67625,7	7486,8	88104,2	27306,0
42	2nd	*L.Buchneri*	120	16815,2	14355,1	60453,5	4967,0	77268,7	19322,1
43	2nd	*L.Buchneri*	120	14632,8	7043,0	72850,2	6810,7	87483,0	13853,7
44	2nd	*L.Buchneri*	120	19713,1	12376,2	69648,3	4585,3	89361,4	16961,5
45	2nd	*L.Buchneri*	240	15240,2	8105,7	54241,2	3498,0	69481,4	11603,7
46	2nd	*L.Buchneri*	240	18411,9	12221,3	55872,6	3907,0	74284,5	16128,3
47	2nd	*L.Buchneri*	240	12923,0	6488,1	73872,8	6495,1	86795,9	12983,2
48	2nd	*L.Buchneri*	240	18146,0	16863,9	66271,3	6406,9	84417,3	23270,7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTA DE ACRÓNIMOS

15-ADON 15-acetildeoxinivalenol

3-ADON 3-acetildeoxinivalenol

ADN Ácido desoxirribonucleico

AFB_1 Aflatoxina B_1

AFB_2 Aflatoxina B_2

AFG_1 Aflatoxina G_1

AFG_2 Aflatoxina G_2

AND A Andrastina A

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

AOAC Official Methods of Analysis

AOH Alternariol

CCα Límite de decisión

CCβ Capacidad de detección

CE Comunidad Europea

CEN Comité Europeo de Normalización

cfu (Colony forming unit) Unidad formadora de colonias

CIAM Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo

CoV (Cutoff Value)

DO Densidad óptica

DON Deoxinivalenol

dSPE (Dispersive Solid Phase Extraction) Extracción en fase sólida dispersiva

ECD (Electron Capture Detector) Detector de captura de electrones

EFSA (European Food Safety Authority) Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

ELISA (Enzymed-Linked InmunoSorbent Assay) Ensayo por inmunoabsorción ligado a encimas

ENN B Eniantina B

ENN B_1 Eniantina B_1

ESI (Electrospray ionization) Ionización por electrospray

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas

FB_1 Fumonisina B_1

FB_2 Fumonisina B_2

FB_3 Fumonisina B_3

FLD Detección de fluorescencia

GC (Gas Chromatography) Cromatografía de gases

HFB_1 Fumonisina B_1 hidrolizada

HFB_2 Fumonisina B_2 hidrolizada

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Cromatografía líquida de alta resolución

HSCAS (Hydrated *sodium* calcium aluminosilicate) Silicato de aluminio, sodio y calcio hidratado

HT-2 Toxina HT-2

IDL (Instrument Detection Limit) Límite de detección instrumental

IQL (Instrument Quantification Limit) Límite de cuantificación instrumental

ISO (International Organization for Standardization) Organización Internacional para la Estandarización

LC (Liquid Chromatography) Cromatografía líquida

LIGAL Laboratorio Interprofesional Gallego de Análisis de la Leche

LLE (Liquid-Liquid extraction) Extracción líquido-líquido

LOD (Limit of Detection) Límite de detección

LOQ (Limit of Quantification) Límite de cuantificación

LRM Límite máximo de residuo

MAC A Marcfortina A

MAE (Microwave-Assited Extraction) Extracción asistida por microondas

ME (Matrix effect) Efecto matriz

MIP (Moleculary Imprinted Polymers) Polimeros molecularmente impresos

MPA Ácido micofenólico

MRC Material de Referencia Certificado

MS (Mass Spectrometry) Espectrometría de masas

OMS Organización Mundial de la Salud

OPA ortoftaldehido

OTA Ocratoxina A

PA ácido penicílico

PDA (Photodiode array) Fotodiodo array

PEN A Penitrem A

PLE (Pressurised Liquid Extraction) Extracción por líquido presurizados

PSA (Primary Secondary Amine) Amina primaria y secundaria

QuEChERS Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe

ROQ-C Roquefortina C

RSD (Relative Standard Deviation) Desviación estándar relativa

SAX (Strong Anion Exchanger) Intercambio aniónico fuerte

SDS (Sodium Dodecyl Sulfato) Dodecilsulfato sódico

SDS Dodecilsulfato sódico

SFE (Supercritical Fluid Extraction) Extracción con fluidos supercríticos

SIM (Single Ion Monitoring) Monotorización de un solo ion

SPE (Solid Phase Extraction) Extracción en fase sólida

STE Esterigmatocistina

T-2 Toxina T-2

TLC (Thin layer chromatography) Cromatografía de capa fina

UE Unión Europea

UV Ultravioleta

VERR Verruculogen

ZEA Zearalenona

α-ZOL α-zearalenol

β-ZOL β-zearalenol

ARTÍCULOS:

Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain

http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2016.1243806

Occurrence and stability of masked fumonisins in corn silage samples

http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.156

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA