



Trabajo fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Evaluación del riesgo por aflatoxina M1 en leche de
oveja procedente de explotaciones Aragonesas

Risk assessment of M1 aflatoxin in ewe's milk from
Aragon's farms

Autora

Natalia Sánchez González

Director

Teresa Juan Esteban

Facultad de Veterinaria

2016

Agradecimientos

En primer lugar a mis padres y hermana quienes me han apoyado en todos mis proyectos y decisiones sin ustedes esto no hubiese sido una realidad...

A Teresa por su ayuda, colaboración y confianza para desarrollar el proyecto.

También agradecer a Noemi por su paciencia y cooperación para sacar adelante el trabajo, y a Gala por su apoyo y compañía durante este tiempo.

El presente trabajo ha sido financiado por el Fondo de Inversiones de Teruel (FITE), a través del proyecto “Proceso integrado de mejora de la calidad del queso de Teruel”, así como por el Grupo de Investigación Consolidado A01 “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria” del Gobierno de Aragón y el Fondo Social Europeo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Mohos productores de micotoxinas y contaminación en piensos	3
1.2 Aflatoxinas: origen, definición y características.....	5
1.3 Efectos toxicológicos de las aflatoxinas	7
1.4 Incidencia de aflatoxinas en piensos y leche	9
1.5 Índices de transferencia B1 A M1 en leche de oveja.....	10
1.6 Normas y límites para las aflatoxinas en piensos y leche	11
1.7 Técnicas de análisis de aflatoxinas	12
2. OBJETIVOS	14
3. METODOLOGIA	15
3.1 Material, equipos y reactivos	15
3.1.1 Material	15
3.1.2. Equipos.....	15
3.1.3 Reactivos	16
3.2 Toma de muestras	17
3.3 Acondicionamiento de las muestras de ración alimenticia	17
3.4 Determinación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2) en raciones de alimentación para ganado ovino lechero.....	18
3.5 Determinación de aflatoxina M1 en leche de ganado ovino.....	19
3.5.1 Recuperación (Exactitud)	20
3.5.2 Reproducibilidad	20
3.5.3 Repetibilidad.....	21
3.5.4 Descripción del procedimiento analítico.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	22

4.1	Determinación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2) en raciones de alimentación para ganado ovino lechero alimentación para ganado ovino lechero....	22
4.2	Determinación de aflatoxina M1 en leche de ganado ovino	30
4.3.1	Recuperación.....	33
4.3.2	Reproducibilidad	34
4.3.3	Repetibilidad	35
4.4	Resultados obtenidos en las muestras de leche.....	35
5	CONCLUSIONES	38
6	BIBLIOGRAFIA.....	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales especies toxigénicas de mohos y sus micotoxina.....	5
Tabla 2. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.....	25
Tabla 3. Resultados de las muestras de raciones alimenticias para ganado ovino contaminadas con aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2).....	26
Tabla 4. Tasas de contaminación por aflatoxinas encontradas por otros autores en materias primas o ración alimenticia.....	29
Tabla 5. Temperaturas registradas en Aragón 2016.....	30
Tabla 6. Determinación porcentaje de recuperación en muestras enriquecidas.....	33
Tabla 7. Coeficientes de variación en términos de reproducibilidad.....	34
Tabla 8. Coeficientes de variación en términos de repetibilidad.....	35
Tabla 9. AFM1 esperada después de transferencia del 0,33% a partir de AFB1	36

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de las aflatoxinas más importantes como contaminantes de alimentos.....	6
Figura 2. Procedimiento de purificación haciendo uso de columnas de inmunoafinidad.....	13
Figura 3. Cromatograma muestra MPO 12 con aflatoxina B1	23
Figura 4. Cromatograma muestra MPO5A con aflatoxina G2.....	23
Figura 5. Cromatograma patrón G2,G1,B2,B1 a 2,5 ng/mL.....	23
Figura 6. Curva de calibración aflatoxina G2 0,15-3 ng/mL.....	24
Figura 7. Curva de calibración aflatoxina B2 0,15-3 ng/mL.....	24
Figura 8. Curva de calibración aflatoxina G1 0,5-10 ng/mL.....	25
Figura 9. Curva de calibración aflatoxina B1 0,5-10 ng/mL.....	25
Figura 10. Positividad (%) de la contaminación por aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en raciones alimenticias para ganado ovino de leche (n=31).....	28
Figura 11. Cromatograma muestra de leche enriquecida a 50 ng/L con aflatoxina M1.....	31
Figura 12. Cromatograma muestra blanco de leche sin enriquecer.....	32
Figura 13. Cromatograma patrón M1 a 500 ng/L.....	32
Figura 14. Curva patrón aflatoxina M1 500-50 ng/L.....	33

RESUMEN

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas producidas por especies fúngicas del género *Aspergillus* en determinadas condiciones, pre- y post- cosecha, asociándose a productos agrícolas de las regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, recientes informes manifiestan contaminación por aflatoxinas (B2, B1, G2 y G1) en cereales producidos en Europa, así como tasas de aflatoxina M1 en leche por encima del límite legal, lo que pone de manifiesto una problemática en la seguridad alimentaria, puesto que las aflatoxinas, particularmente la B1, y su metabolito hidroxilado M1 han sido clasificadas como carcinógenas por la International Agency for Research on Cancer (IARC).

Se han realizado numerosos estudios sobre la incidencia de aflatoxinas en leche de vaca, sin embargo existen pocas investigaciones acerca de las tasas de contaminación en leche de oveja, de menor producción pero con gran importancia en la economía rural en el área mediterránea. Por ello el objetivo de este trabajo de máster es conocer la incidencia de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en muestras de ración alimenticia, así como la de aflatoxina M1 en leche de oveja y de este modo tratar de establecer la tasa de transferencia de la aflatoxina B1 procedente de raciones alimenticias a su metabolito M1 en la leche de oveja.

Para llevarlo a cabo, se tomaron 31 muestras de leche de tanque y 31 de ración alimenticia de ovino lechero en 7 explotaciones ovinas ubicadas en la comunidad de Aragón durante la estación de finales de invierno-primavera. Las muestras se analizaron siguiendo protocolos de extracción con solventes orgánicos, purificación con columnas de inmunoafinidad y determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia y derivatización fotoquímica.

Una vez analizadas las muestras de ración alimenticia se detectó la presencia de alguna de las aflatoxinas investigadas en el 23% de las muestras, a niveles de contaminación muy bajo. En el caso concreto de la aflatoxina B1, solo se detectó en tres muestras, con valores muy por debajo del límite máximo establecido por la legislación vigente para este contaminante en alimentación de ovino lechero (5 ng/g). En cuanto a las muestras de leche de oveja, no se detectó la presencia de aflatoxina M1 en ninguna de las muestras analizadas.

ABSTRACT

Aflatoxins are a group of mycotoxins produced by different fungal species, of the genus *Aspergillus*, in determined conditions of pre and post harvest, these ones are related to agricultural products in tropical and subtropical regions. However, recently studies have shown contamination by aflatoxins (B2, B1, G2, G1) in cereals produced in Europe, as well as presence of aflatoxin M1 (AFM1) in milk over the legal limit. This situation shows a problem in food safety due to aflatoxins, specially aflatoxin B1 (AFB1), and its hydroxylated metabolite M1, have been classified as carcinogenic compounds by the International Agency for Research on Cancer (IARC).

Several studies have been published about the incidence of aflatoxins in cow's milk, however there a few research about contamination rates in ewe's milk, which has a lower production but has an important role in the rural economy in the Mediterranean area. For this reason the aim of this master's work is to know the incidence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in animal feed, as well as aflatoxin M1 in ewe's milk , and so to establish the carry over rate of AFB1 from animal feed to AFM1 in ewe's milk.

In order to do that, 31 samples of milk tank and 31 samples of feed for dairy ewe were taken, from 7 farms located in Aragón, Spain, during the end of winter and beginning of spring. Samples were analyzed following the procedure of extraction using organic solvents, purification with immunoaffinity columns and determination through high performance liquid chromatography (HPLC).

Once the feed samples were analyzed, 23% of them were positive for any of the aflatoxins studied, contamination levels were low. Particularly for aflatoxin B1, only in three samples was detected, with values below than the legal limit for this contaminant in feed animal (5 ng/g). Milk samples did not showed aflatoxin M1 presence.

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por mohos que pueden ocasionar daños en la salud de los vertebrados ya sea por ingesta, inhalación o contacto con la piel. Pueden aparecer en la cadena alimenticia por la contaminación del moho en los cultivos, ya sea consumido directamente por personas o usado para alimentar ganado. Una vez son ingeridas por los animales de abasto, podrían acumularse en diferentes órganos o tejidos, entrando así a la cadena alimentaria a través de carne, leche o huevos (Marin *et al.*, 2013).

La acumulación de las micotoxinas o sus metabolitos en los alimentos y los piensos representa una amenaza importante para la salud humana y la sanidad animal, puesto que son la causa de afecciones de distintos tipos, como inducción de cáncer, mutagenicidad y trastornos estrogénicos, gastrointestinales, urogenitales, vasculares, renales y nerviosos. Algunas micotoxinas son también inmunodepresoras, por lo que pueden reducir la resistencia a las enfermedades infecciosas. (FAO, 2016)

Se estima que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, incluidos muchos alimentos básicos, se ven afectados por hongos micotoxigénicos. La presencia de micotoxinas contribuye a importantes pérdidas económicas asociadas con sus efectos negativos en la salud humana, la productividad animal, el comercio tanto nacional como internacional y el costo de programas dirigidos al análisis y control (Cheli *et al.*, 2013; Campagnollo *et al.*, 2016).

1.1 Mohos productores de micotoxinas y contaminación en piensos

Los principales géneros productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Alonso *et al.*, 2013). Los metabolitos secundarios no están asociados con el crecimiento celular, usualmente son producidos en respuesta a alguna señal del ambiente donde se encuentra el moho productor, mientras que el metabolismo primario es común en todas las especies fúngicas e interactúa con rutas metabólicas para la síntesis y catabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas; el metabolismo secundario puede ser específico para cada especie. (Yiannikouris y Jouony, 2002)

La producción de micotoxinas por los mohos, así como la contaminación con sus esporas puede ocurrir en los cultivos agrícolas en diferentes momentos pre y

post-cosecha en determinadas condiciones de temperatura, actividad de agua y disponibilidad de nutrientes. Prácticas agrícolas incorrectas, secado inadecuado, mala manipulación, embalaje, almacenamiento y transporte son algunas de las condiciones que promueven el crecimiento del moho, aumentando así el riesgo de producción de micotoxinas. (Marin *et al.*, 2013). Así mismo la acción de roedores, aves e insectos pueden facilitar la contaminación causando lesiones físicas en las plantas o el cultivo, generando así una ruta de acceso para las esporas del moho. (Yiannikouris y Jouony., 2002).

El crecimiento del moho en el producto está influenciado por diferentes parámetros físico-químicos, entre los que se incluyen actividad del agua (A_w), temperatura, presencia de oxígeno, y condiciones de pH. Una vez que los alimentos han sido procesados, la producción de micotoxinas puede controlarse mediante el almacenamiento en condiciones que previenen la contaminación y propagación fúngica. En líneas generales, el control de la A_w permite prevenir el crecimiento y producción de micotoxinas, que pueden acumularse en alimentos ya procesados en los casos que este parámetro se incremente lo suficiente para permitir crecimiento del moho. (Marin *et al.*, 2013)

Hasta el momento se han identificado más de 300 tipos de micotoxinas, y el número se encuentra en aumento, ya que aún están siendo descubiertos nuevos metabolitos y en espera de la evaluación de su potencial y contribución sinérgica a las enfermedades en animales (Fink-Gremmels, 2008). En la Tabla 1 se pueden observar las micotoxinas más conocidas y sus mohos productores, aunque las de mayor importancia en los alimentos, y por tanto en la salud pública son las aflatoxinas, la ocratoxina A, las fumonisinas, la zearalenona y la toxina T-2 (Rubio, 2011).

Especies de mohos	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> y <i>A. nomius</i>	Aflatoxinas
<i>A. nidulans</i> y <i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina
<i>A. flavus</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>A. ochraceus</i> y <i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>P. griseofulvum</i>	Patulina
<i>P. roqueforti</i>	Roquefortina
<i>Penicillium spp.</i>	Rubratoxina B
<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> y <i>F. sporotrichioides</i>	Deoxinivalenol o Vomitoxina y Zearalenona
<i>F. sporotrichioides</i> y <i>F. poae</i>	Toxina T-'2
<i>F. verticilloides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i> y <i>Alternaria alternata</i>	Fumonisin
<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> y <i>F. poae</i>	Diacetoxiciscirpenol
<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Monascus spp.</i>	Citrinina
<i>Claviceps spp.</i>	Alcaloides de ergotamina
<i>Neotyphodium lolii</i>	Lolitre B
<i>N. coenophialum</i>	Ergovalina
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Fomopsinas
<i>Pithomyces chartarum</i>	Esporidesminas
<i>Rhizoctonia leguminicola</i>	Esiaframinas

Tabla 1. Principales especies toxigénicas de mohos y sus micotoxinas.

1.2 Aflatoxinas: origen, definición y características

Las micotoxinas de mayor relevancia en alimentos y piensos son las aflatoxinas. Este término fue acuñado a comienzos de 1960, tras la muerte de 100.000 pavipollos y patos en granjas británicas a causa de una enfermedad conocida como "enfermedad X de los pavos", que se atribuyó a la presencia de toxinas de *A. flavus*, en el pienso que contenía torta de cacahuete importado de Brasil. En el examen post-mortem de los animales se revelaba la completa degeneración de las células del parénquima hepático asociada con una proliferación del conducto biliar (Blout, 1961; Sargeant *et al.*, 1961).

Las aflatoxinas son producidas principalmente por tres especies del género *Aspergillus*: *A.flavus*, *A.parasiticus* y *A. nonius*. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de los que solamente 6 se consideran de importancia como contaminantes de los alimentos: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 y AFM2. Todas las aflatoxinas contienen en su molécula una mitad dihidrofurano, unida a un anillo cumarina (Figura 1), y son fuertemente fluorescentes bajo luz ultravioleta (AFBlue-azul o AFGreen-verde), propiedad que se ha aprovechado para su detección en los procedimientos analíticos. Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350 Daltons y la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolvente orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol. (Soriano, 2007).

Figura 1: Estructura de las aflatoxinas más importantes como contaminantes de alimentos. (Campagnollo *et al.*, 2016)

Los factores condicionantes para el desarrollo de los mohos no siempre coinciden con los necesarios para la producción de aflatoxinas. *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 45°C, con una actividad de agua (A_w) de alrededor de 0,78. Sin embargo, la temperatura óptima para la producción de toxinas se sitúa entre los 25 y los 30°C, y una A_w de 0,95 a 0,99, si bien puede ser inferior. *A. parasiticus* presenta unas pautas similares, aunque la A_w óptima para su crecimiento es inferior (de 0,83), y para la producción de toxinas es de 0,87, con unas temperaturas entre 28 y 30°C (Sanchís y Magan, 2004; Ribeiro *et al.*, 2006). En cuanto a la composición gaseosa, al tratarse de mohos aerobios su crecimiento se detiene a concentraciones de CO_2 del 25%, mientras que se necesitan concentraciones superiores a 50% para detener la síntesis de aflatoxinas (Giorni *et al.*, 2008).

Estos mohos infectan los cultivos y producen aflatoxinas en diferentes productos vegetales antes de la recolección, pero incrementan esa producción cuando el producto ya se ha recolectado y las condiciones de almacenamiento permiten o estimulan su crecimiento (Soriano, 2007)

La incidencia de aflatoxinas en alimentos y piensos es relativamente alta en zonas tropicales y subtropicales con humedad y temperatura alta que promueve el crecimiento del moho, aunque la contaminación también puede producirse en desiertos cálidos en regadío y en zonas templadas donde se produce una época de sequía (Cotty y Jaime-García, 2007). Los cultivos más afectados son maíz, cacahuete, y semilla de algodón, aunque de igual manera otras materias primas en la industria agrícola como arroz, soja, pistacho y cebada pueden ser altamente contaminadas (Ariño *et al.*, 2009; Oplatowska-Stachowiak, *et al.*, 2016).

1.3 Efectos toxicológicos de las aflatoxinas

La ingesta de aflatoxinas por el hombre o los animales provoca el desarrollo de una enfermedad conocida como aflatoxicosis, la cual presenta una serie de síntomas entre los que se incluyen pérdida de apetito, poca ganancia de peso, diarrea, sangre, defectos en nacimientos, y daño en riñón, hígado o pulmón (Scudamore y Livesey, 1998). Esto conlleva a la disminución en la ingesta de alimentos, lo cual explica la reducción en producción de leche en ganado expuesto a aflatoxinas. (Fink-Gremmels, 2008).

La aflatoxicosis no necesita obligatoriamente al moho productor de la toxina, ya que es un peligro abiótico pero con origen biótico. Las características del diagnóstico de las micotoxicosis incluyen: la enfermedad no es transmisible, el tratamiento con medicamentos y antibióticos tiene poco o nulo efecto, los brotes son frecuentemente por temporadas, y dichos brotes están usualmente asociados con productos alimenticios específicos (Marin *et al.*, 2013).

Por otra parte, es poco lo que se conoce acerca de los posibles efectos sinérgicos de las micotoxinas, además de la dificultad de un diagnóstico preciso sobre micotoxicosis, ya que otras enfermedades presentan los mismos síntomas (Storm *et al.*, 2014).

La dosis y el periodo de exposición del organismo a la toxina son influyentes en el cuadro de sintomatología. Las manifestaciones clínicas de la aflatoxicosis aguda son, vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, así como infiltración grasa y necrosis del hígado. No obstante la aparición de estos cuadros en seres humanos es sumamente escasa, puesto que habitualmente los alimentos deteriorados por hongos se desechan o se destinan a alimentación animal. (Kensler *et al.*, 2011).

Del conjunto de aflatoxinas destaca por su toxicidad la aflatoxina B1, que ha sido clasificada como carcinogénico para humanos en el grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2002). Cuando los animales de abasto, en este caso las ovejas, ingieren la aflatoxina B1 a través del pienso contaminado, ésta es degradada en el rumen por la flora microbiana allí presente, resultando en la formación de aflatoxicol. La porción de aflatoxina B1 remanente es absorbida en el tracto digestivo por difusión pasiva e hidroxilada en el hígado hacia aflatoxina M1, la cual puede ser conjugada con ácido glucurónico, y posteriormente excretada vía bilis, o ser recirculada hacia otros lugares, en los que puede derivar su excreción en la orina, leche y otros fluidos del animal. (Fink-Gremmels, 2008; Campagnollo *et al.*, 2016).

La aflatoxina M1 se encuentra clasificada dentro del grupo 2B como posible carcinogénico para humanos, pero cabe destacar que presenta suficiente evidencia como agente potencial carcinogénico en animales (IARC, 2002). Diferentes estudios llevados a cabo en primates, peces y roedores, ponen de manifiesto la alta susceptibilidad de éstos últimos a estas sustancias.

El hígado es el principal órgano afectado por la acción tóxica de la aflatoxina B1. Sin embargo, dependiendo de la especie animal, dosis, vía de exposición y factores en la dieta, también han sido descritos tumores en otros órganos tales como riñón y colon (Kensler *et al.*, 2011). Dentro de los pasos claves en el mecanismo de acción incluyen el metabolismo hacia la formación del exo-epóxido el cual se une al ADN y genera aductos y error en la codificación para replicación del DNA, lo que conlleva al desarrollo de mutaciones con formación eventual de tumores (IARC, 2002).

Teniendo en cuenta su riesgo y potencial cancerígeno, hoy en día el Comité mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Unión Europea, no ha establecido un límite de seguridad respecto al nivel sin efecto adverso observable (NOAEL). Por lo que se recomienda que el nivel de ingesta se reduzca, siendo tan bajo como sea posible (JECFA, 2001)

1.4 Incidencia de aflatoxinas en piensos y leche

La contaminación primaria de los cultivos agrícolas en Europa no ha sido considerada un problema durante muchos años. Sin embargo, la contaminación provocada por aflatoxinas en el maíz cultivado en todo el sur de Europa debido a condiciones favorables, tales como las altas temperaturas, sequía y fuertes daños por insectos, ha supuesto un giro a los acontecimientos, posiblemente influenciado por los cambios en el clima y las prácticas agrícolas. Esto ha culminado en cantidades relativamente altas de aflatoxinas en las últimas cosechas de maíz y en los piensos derivados, dando como resultado tasas de aflatoxina M1 en muestras de leche por encima del límite legal.

En el año 2013, la Junta de Andalucía informó que se había detectado la presencia de aflatoxina M1 por encima de los límites máximos establecidos en leche procedente de animales alimentados con maíz contaminado con aflatoxina B1 en explotaciones ganaderas andaluzas. Se destruyeron más de un millón de litros de leche así como también se inmovilizaron más de 800 toneladas de maíz en explotaciones.

Entre el año 2014 y lo transcurrido del 2016, en Europa se han notificado 51 casos de contaminación con aflatoxinas en piensos a través del sistema de alerta rápida para piensos y alimentos (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF). En el caso de la leche y sus derivados el número desciende a tan solo 5 casos, siendo Italia el principal país implicado en dichas notificaciones (RASFF, 2016).

1.5 Índices de transferencia B1 A M1 en leche de oveja

La producción de leche de oveja es de gran importancia en el área Mediterránea, pese a ser notablemente inferior a la de vaca. España es la tercera potencia en producción europea en leche de pequeños rumiantes, en el año 2014 hubo una producción de 574,4 millones de litros de leche de oveja, destacando las comunidades Autónomas de Castilla de León y Castilla de la Mancha, a pesar que Aragón presenta una producción más baja de leche de oveja, 2246 miles de litros (MAGRAMA, 2014). Pese a su baja incidencia en el sector lácteo, diversas circunstancias relacionadas con los sistemas de producción y su ubicación, así como las especiales características de los productos que con ellas se elaboran, hacen que la leche de pequeños rumiantes tenga notable importancia en el medio rural, destinada principalmente a la elaboración de queso.

De acuerdo a lo publicado por Battacone y colaboradores (2005), el índice de transferencia de aflatoxina B1 a M1 en leche de oveja varia en un rango entre 0,08% a 0,33%, mientras que para leche de vaca es 0,33% a 3%. Otras publicaciones concluyen que la variabilidad observada en dicho índice de transferencia entre animales se puede deber a la diferencia en la actividad de degradación originada en el rumen, en la formación de aflatoxicol, en el sistema enzimático de oxidación (AFB1) así como en la permeabilidad de las glándulas mamarias. La excreción de aflatoxina M1 en leche empieza entre 12 y 24 horas después de haber ingerido el pienso contaminado, alcanzando los máximos niveles en pocos días y desapareciendo 24 horas después de haber eliminado la aflatoxina de la dieta (Campagnollo *et al.*, 2016).

Es importante resaltar que la tasa de transferencia de la aflatoxina desde el pienso hasta la leche puede variar, ya que dicho proceso se ve influenciado por factores nutricionales y fisiológicos, en donde se incluye también regímenes de alimentación, proporción de ingesta, velocidad de digestión, salud del animal, capacidad hepática de biotransformación, producción actual de leche, localización geográfica y estación del año. Todos estos factores influyen en que la velocidad de absorción de las aflatoxinas, y la excreción de aflatoxina M1 en leche, varíe entre los diferentes animales individuales (vaca, oveja, cabra, entre otros), así como entre días de ordeño y entre explotaciones de ganado lechero (Fink-Gremmels, 2008).

La aflatoxina M1 es termoestable, no se destruye por el procesado de la leche y los productos lácteos, ni por los tratamientos efectuados durante el procesado del queso, por

lo que permanece inalterable en leches tratadas térmicamente y productos lácteos. En todo caso se ha verificado un ligero descenso en leche UHT tras largo almacenamiento (Anfossi *et al.*, 2011). La leche y derivados son productos habituales en la dieta, con lo que la aflatoxina M1 es un factor de un riesgo para el consumidor.

Teniendo en cuenta la implicación en salud pública y el riesgo que representa la existencia de aflatoxina M1 en leche debido a su previa transferencia a partir de piensos contaminados, son numerosos los estudios realizados hasta la fecha relacionados con el tema, si bien en su mayoría hacen referencia a la leche de vaca (Rodríguez *et al.*, 2003; Fink-Gremmels. 2008; Prandini *et al.*, 2009; Campagnollo *et al.*, 2016; Becker-Algeri *et al.*, 2016;). Diferentes estudios se han enfocado en la importancia y riesgo en leche de oveja (Benedetti *et al.*, 2005; Bognanno *et al.*, 2006; Rahimi *et al.*, 2010; Fallah *et al.*, 2016;).

1.6 Normas y límites para las aflatoxinas en piensos y leche

La contaminación de alimentos y piensos con aflatoxinas es estrictamente contralada en muchos países alrededor del mundo. Por tal razón y en pro de favorecer la inocuidad y reducir el riesgo con aflatoxinas, se han establecido límites para diferentes tipos de alimentos. En la Unión Europea se ha determinado que el límite máximo para piensos destinados a vacas lecheras y terneros, ovejas lecheras y corderos, cabras lecheras y cabritos, lechones y aves de corral jóvenes no debe superar 5 ug/kg de aflatoxina B1 calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12 % (Reglamento UE n ° 574/2011, que modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE). Actualmente solo se encuentra regulada la aflatoxina B1 en productos destinados a la alimentación animal debido a su potencial peligro en la salud de los animales y posible transferencia hacia los consumidores.

Por otro lado para el caso de la aflatoxina M1, la Unión Europea ha establecido su nivel máximo como 50 ng/kg en leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos (Reglamento 1831/2003/CE) en contraste con la Food and Drug Administration (FDA), quienes han establecido el nivel máximo de AFM1 en 500 ng/kg.

1.7 Técnicas de análisis de aflatoxinas

Con el paso de los años y el interés en identificar la presencia de aflatoxinas en alimentos de una manera sencilla y eficaz, se han implementado diferentes técnicas buscando solventar esta necesidad. El análisis de aflatoxinas consta de diferentes etapas dentro de las cuales cabe destacar: muestreo, extracción y purificación.

El muestreo juega un papel muy importante en la precisión del análisis de contenido de aflatoxinas en la matriz de interés, por tal razón se debe tomar una muestra homogénea y representativa a analizar. Los métodos para llevar a cabo dichos muestreos están regulados por el Reglamento (CE) 401/2006, posteriormente modificado por los Reglamentos (UE) N° 178/2010 y N° 519/2014.

Continuando, la extracción consiste en liberar de la matriz alimentaria las aflatoxinas de interés, para lo que se utilizan diferentes solventes. El uso de determinado solvente o combinación de estos depende de la polaridad de la aflatoxina, del tipo de muestra a analizar y del procedimiento de purificación que se haya elegido. Posteriormente se realiza una etapa de purificaciones, con la que se consigue eliminar las sustancias o componentes de la muestra que pueden generar un error de interpretación al comportarse similar que la aflatoxina de interés, interfiriendo así en su detección y cuantificación.

Posteriormente se realiza la purificación (clean- up), la cual busca llevar a cabo una separación de las aflatoxinas de interés del resto de analitos co-extraídos en la etapa de extracción.

La purificación con columnas de inmunoafinidad es una de las técnicas más utilizadas en los últimos años, gracias a su facilidad de uso y alta selectividad. Dichas columnas constan de anticuerpos monoclonales, anti-toxina que se encuentran inmovilizados en un gel de agarosa (Kensler *et al.*, 2011)

Para llevar a cabo dicha purificación se añade la muestra a analizar, en donde las aflatoxinas se unirán a los anticuerpos específicos fijados en la columna, acto seguido se realiza un lavado, y finalmente se realiza una elución con disolvente para romper la unión antígeno-anticuerpo, liberando así la aflatoxina de interés.

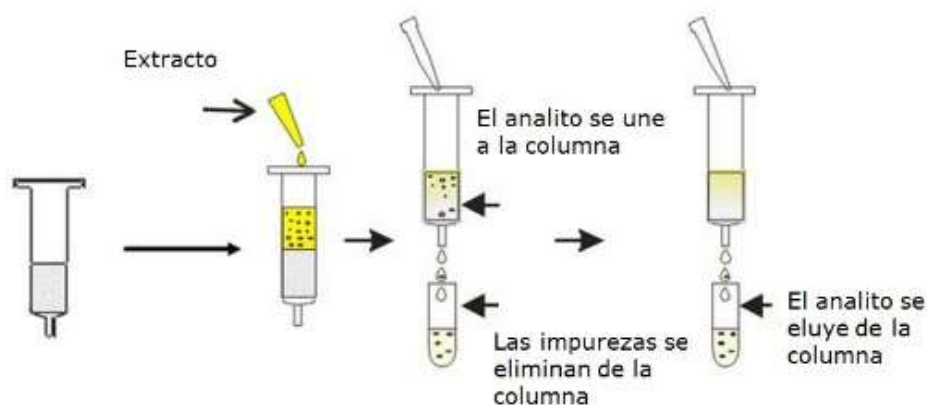


Figura 2. Procedimiento de purificación haciendo uso de columnas de inmuoafinidad (Romerlabs, 2016)

Dichas columnas pueden ser usadas para purificar y concentrar extractos de aflatoxinas antes de analizarlos con varias técnicas como HPLC y LC-MS.

Finalmente para la determinación de aflatoxinas, se suelen usar técnicas inmunoquímicas ya sea de cribado como ELISA, flujo lateral, inmunosensores, o tiras de inmunocromatografía. Estos métodos se basan en la inmunodetección de toxinas empleando anticuerpos como elemento específico para el reconocimiento de la aflatoxina de interés, y han incrementado su uso en la última década gracias a su rapidez y sencillez de uso. (Wang *et al.*, 2016)

Por otro lado uno de los métodos instrumentales más utilizados actualmente es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de fluorescencia (HPLC-FLD), en donde se incluyen columnas de fase reversa, con el fin de detectar las aflatoxinas las cuales tienen propiedad fluorescente. (Trombete *et al.*, 2013)

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Optimizar la metodología validada en el laboratorio para el análisis de aflatoxina M1 en muestras de leche de vaca, basada en la purificación por columnas de inmunoafinidad y la determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el fin de adecuar la técnica para el análisis de la aflatoxina M1 en muestras de leche de oveja.
- Investigar las tasas de contaminación por aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en muestras de ración alimenticia para ganado ovino de leche, por un método basado en la purificación de las aflatoxinas mediante columnas de inmunoafinidad y su determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Conocer la incidencia de aflatoxina M1 en leche de oveja, de interés por su riesgo para la salud pública.
- Estudiar la tasa de transferencia de aflatoxina M1 a la leche de oveja, como consecuencia de la hidroxilación de la aflatoxina B1 procedente de raciones alimenticias del ganado.

3. METODOLOGIA

3.1 Material, equipos y reactivos

3.1.1 Material

- Material de laboratorio de vidrio: Viales de color ambar de 4 mL, embudos, vasos de precipitado, erlenmeyer.
- Material de laboratorio de plástico: Tubos Falcon de 50 mL, puntas de micropipeta, pipetas pasteur, frascos de toma de muestras de 250 mL con tapa y obturador, jeringas desechables de 10 mL.
- Papel de filtro Whatman nº4 de 125 mm de diámetro.
- Papel de microfibras de vidrio.
- Columnas de inmunoafinidad: AflaTEST[®] WB SR, AflaM1[™] (Vicom; Milford, Massachusetts, EEUU).
- Micropipetas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL y 1 mL a 10 mL) Thermo Scientific
- Microjeringa de vidrio de 250 µL SGE para HPLC

3.1.2. Equipos

- Cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent HP 1100 series equipado con:
 - Columna cromatográfica de fase reversa octadecil RP C18 de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, ACE 5 C18
 - Precolumna de fase reversa RP18 pK5
 - Inyector manual
 - Módulo de bomba o sistema de bombeo binario para la fase móvil
 - Detector de fluorescencia (FLD)
 - Detector ultravioleta de red de diodos (DAD)
 - Detector de derivatización fotoquímica (PHRED UVE)
 - Unidad de control del equipo y tratamiento de datos con el software Controllab 3D

- Balanza analítica monoplato Sartorius CP 224 S con 0,0001 g de precisión
- Baño de ultrasonidos Branson 3510
- Baño Termostático de Stuart Scientific
- Centrifuga Rotofix 32 de Hettich.
- Concentrador de muestras con placa calefactora para evaporación por corriente de N₂
- Molino K-6 Platino (Ascaso Factory, Barcelona, España)
- Sistema de filtración a vacío compuesto por: Bomba de vacío XX552205 (de 0 a 100 kPa) (Millipore, Massachusetts, EEUU) matraz Erlenmeyer de 1 L, portafiltros con pinza, matraz kitasato de 1 L
- Rota-Tubos TK3S (Techno Kartell)
- Congelador Templo-20°C (Selecta)
- Analizador electrónico de humedad de Kern
- Estufa de desecación Digiheat, J.P SELECTA, W:1200, V:230 (Barcelona, España)

3.1.3 Reactivos

- Metanol (CH₃OH) grado HPLC de Fisher Scientific
- Acetonitrilo (CH₃CN) grado HPLC de Fisher Scientific.
- Agua desionizada calidad milli-Q. Resistividad 18,2 mΩ/cm.
- Cloruro de sodio (NaCl) de Sigma Aldrich.
- Gas Nitrógeno N₂ C55 de Carbueros metalicos
- Patrón mix de aflatoxinas (Patrón comercial) con concentraciones de 1 µg/mL de aflatoxinas B₁ y G₁, y de 0,3 µg/mL de aflatoxinas B₂ y G₂ en metanol (Pureza 99,5%) de Sigma Aldrich

- Patrón de aflatoxina M1 con concentración 500 ng/mL en metanol de Sigma Aldrich

3.2 Toma de muestras

Se tomaron 31 muestras de leche y 31 muestras de ración alimenticia para ganado ovino lechero en 7 explotaciones ubicadas en Aragón, seis de ellas localizadas en la provincia de Teruel y una en la provincia de Zaragoza.

En seis de las explotaciones se suministraba al ganado dieta completa (unifeed), por lo que las muestras de la ración (entre 600-800 gramos) fueron recogidas del carro mezclador. En la explotación restante, con sistema pienso-forraje, se tomaron por separado alícuotas de pienso y heno de alfalfa. Todas las muestras de alimento para ganado se introdujeron en bolsas con cierre a presión para el transporte al laboratorio.

La composición y el origen de las materias primas de las raciones varían en cada explotación, bien por proceder de diferentes fábricas de piensos, por incluir un determinado subproducto, o por la proporción de los componentes. Se tomaron los datos acerca de la composición de la ración alimenticia de las explotaciones.

Las muestras de leche se recogieron directamente del tanque de refrigeración, en frascos de toma de muestras de 250 mL de capacidad con tapa y obturador, y se conservaron en temperatura de congelación hasta el momento de su análisis.

La toma de muestras se realizó durante los meses de febrero, marzo, abril y mayo de 2016.

3.3 Acondicionamiento de las muestras de ración alimenticia

El Reglamento 574/2011, en su anexo II refleja el contenido máximo de Aflatoxina B1 en mg/kg en productos destinados a la alimentación animal, calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12 %. Por ello, una vez las muestras de ración alimenticia fueron recibidas y codificadas en el laboratorio, se determinó la humedad haciendo uso de un medidor de humedad. Las muestras que presentaron un valor de humedad superior al 12% fueron secadas en estufa a 130°C durante 2 horas. Posteriormente se midió nuevamente la humedad para verificar que cumplieran con el parámetro establecido antes del análisis.

Las muestras que contenían granos de maíz enteros o en fragmentos grandes fueron sometidas a molturación en un molino K-6. Todas las muestras fueron bien mezcladas y homogeneizadas antes de su análisis, para minimizar la variabilidad de los resultados.

3.4 Determinación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2) en raciones de alimentación para ganado ovino lechero

La determinación de aflatoxinas en las muestras de ración alimentaria de ovino lechero se realizó por cromatografía líquida de alta resolución, con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y fotoquímico (PHRED), según el método previamente optimizado y validado en el laboratorio de análisis, basado en la Norma UNE-EN-ISO 1650, así como en las recomendaciones del fabricante de las columnas de inmunoafinidad AflaTEST® WB SR.

Para la extracción de los metabolitos de interés, se pesaron 25 g de muestra y se mezclaron con 2,5 g de NaCl. Seguidamente se agregaron 50 mL de metanol:agua (80:20), y se homogeneizó la mezcla durante 1 minuto en rotatubos, filtrando a continuación con papel Whatman N°4. De este filtrado se tomó una alícuota de 10 mL que se diluyó con 40 mL de agua mili-Q. Tras agitar durante 3 minutos en rotatubos se realizó una segunda filtración con papel de microfibra de vidrio.

A continuación se llevó a cabo el proceso de purificación, para el cual se tomaron 10 mL del extracto obtenido previamente, y se pasaron por la columna de inmunoafinidad Aflatest WBV SR a flujo constante de 1-2 gotas/segundo. Acto seguido se lavó la columna con 10 mL de agua mili-Q, conservando el mismo flujo. Finalmente se carga 1 mL de metanol a la columna con el fin de eluir los analitos de interés, que fueron recogidos en un vial ámbar, donde se agregó 1 mL de agua mili-Q.

El proceso de separación, identificación y cuantificación de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 se realizó previa inyección manual en el sistema cromatográfico de 100 µL del extracto purificado, usando como fase móvil metanol, acetonitrilo y agua en una relación 5/1/4, a un flujo de 0,7 mL/min en condiciones isocráticas. La longitud de onda de emisión para detección de aflatoxina B1 y B2 fue de 435 nm y para G1 y G2 fue de 460 nm, mientras que la de excitación fue de 365 nm. La duración de cada análisis fue de 15 min y se fijó una temperatura de la columna de 25°C.

La identificación de cada una de las aflatoxinas se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de las correspondientes soluciones patrón, inyectadas en idénticas condiciones.

La cuantificación se llevó a cabo mediante interpolación de los valores obtenidos en una curva de calibración elaborada cada día de trabajo cromatográfico, inyectando cantidades conocidas de aflatoxinas preparadas a partir de disoluciones comerciales. Para el caso de aflatoxinas B1 y G1, se elaboró una solución madre de 10 ng/mL y para B2 y G2 de 3 ng/mL, en la misma mezcla seleccionada para la fase móvil: metanol/acetonitrilo/agua (5/1/4). A partir de esta solución se elaboraron patrones a diferentes concentraciones: 5; 2,5; 1 y 0,5 ng/mL para aflatoxina B1 y G1. Para B2 y G2 las concentraciones fueron: 3; 1,5; 0,75; 0,3 y 0,15 ng/mL.

Los patrones comerciales y las soluciones madre preparadas a partir de éstos se mantuvieron en viales ámbar en congelación a -20°C, para garantizar su estabilidad a largo plazo. Las soluciones de calibración, se mantuvieron en un vial ámbar en refrigeración a 4°C.

Todas las soluciones patrón se dejaron atemperar a temperatura ambiente previo a su uso.

3.5 Determinación de aflatoxina M1 en leche de ganado ovino

El estudio de la presencia de aflatoxina M1 en las muestras de leche de oveja se ha realizado por purificación mediante columna de inmunoafinidad y determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución, con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y fotoquímico (PHRED), con ligeras modificaciones sobre el método previamente optimizado y validado en el laboratorio de análisis para leche de vaca, basado en la Norma UNE-EN-ISO 14501, así como en las recomendaciones del fabricante de las columnas de inmunoafinidad AflaM1™.

Teniendo en cuenta la naturaleza de la leche de oveja y su alto contenido de grasa, se modificó el protocolo validado por el laboratorio incrementando el volumen de muestra de partida y añadiendo una filtración con filtro de microfibra de vidrio Whatman[®]4 en la fase de extracción previa a la purificación por columna de inmunoafinidad. No se realizaron modificaciones en las condiciones cromatográficas. Por ello se llevó a cabo un estudio de la exactitud y precisión del método, criterios de funcionamiento que

podrían verse afectados por las modificaciones realizadas, con el objeto de comprobar la adecuación del mismo en las condiciones de trabajo establecidas.

Según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, la exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. La exactitud se calcula determinando la veracidad y la precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

3.5.1 Recuperación (Exactitud)

Existen diferentes procedimientos para evaluar la exactitud de una metodología. En el presente trabajo, por no disponer de material de referencia certificado que indique un valor de referencia aceptado, se optó por realizar un estudio de recuperación enriqueciendo con patrón comercial certificado de aflatoxina M1 alícuotas de una misma muestra de leche de oveja a tres niveles de concentración: 25, 50 y 100 ng/L (ppt). El intervalo de concentración se seleccionó con objeto de comprobar la validez del método para determinar niveles de aflatoxina M1 en valores equivalentes a 0,5, 1 y 1,5 veces el límite máximo de residuos establecido por la legislación (50 ng/L).

Para la obtención del porcentaje de recuperación de la técnica, se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperacion} = \frac{\text{Concentración calculada}}{\text{Concentración teórica}} * 100$$

3.5.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad de un método consiste en el estudio de la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mesurando, con diferentes operadores, diferentes equipos de medida, diferentes laboratorios, etc. Se expresa como desviación estándar relativa (RSDR %), calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad

En este caso, se estudió la reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia, analizando 6 muestras enriquecidas a diferentes concentraciones del rango de trabajo

(25, 50 y 100 ng/L) en dos días diferentes, bajo diferentes condiciones ambientales propias del entorno, con el mismo equipo medidor (HPLC) y el mismo analista.

3.5.3 Repetibilidad

La repetibilidad de un método consiste en el estudio de la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo. Se expresa como desviación estandar relativa (RSDr %), calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad.

El estudio de la repetibilidad se llevó a cabo mediante análisis por triplicado de las muestras enriquecidas a diferentes concentraciones del rango de trabajo (25, 50 y 100 ng/L). Las muestras fueron extraídas el mismo día, por el mismo analista, y analizadas en el mismo HPLC.

3.5.4 Descripción del procedimiento analítico

En primer lugar, para desarrollar el proceso de extracción se calentaron 150 mL de la muestra de leche en un baño a 37°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo la muestra precalentada se distribuyó en 3 tubos falcon (50 mL tubo), que se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min. Acto seguido se separó la capa de grasa de la leche desnatada que fue filtrada con papel Whatman N°4, reuniéndose los tres extractos. Una vez culminada esta primera filtración, finalmente se realizó una segunda filtración con papel microfibra de vidrio N°4.

A continuación se llevó a cabo el proceso de purificación, para el cual se tomaron 50 mL del extracto obtenido previamente, y se pasaron por la columna de inmunoafinidad Afla M1TM a flujo constante de de 1-2 gotas/segundo, con ayuda de una jeringa de 50 mL acoplada en la parte superior. Acto seguido se lavó la columna pasando a su través 10 mL de agua mili-Q, conservando el mismo flujo. Los metabolitos de interés se eluyeron pasando consecutivamente a través de la columna 1,25 mL de acetonitrilo:metanol (3:2) y 1 mL de agua mili-Q, a un flujo de una gota cada 2-3 segundos. Ambos eluatos se recogieron en el mismo vial color ámbar.

El proceso de separación, identificación y cuantificación de aflatoxina M1 en leche de oveja, se realizó previa inyección manual en el sistema cromatográfico 100 µL de extracto purificado, usando como fase móvil acetonitrilo: agua en una relación 25/75, a

un flujo de 1 mL/min en condiciones isocráticas. La longitud de onda de emisión fue de 435 nm y la de excitación de 365 nm. La duración de cada análisis fue de 15 minutos, y se fijó una temperatura de la columna de 30°C.

La cuantificación se llevó a cabo mediante interpolación de los valores obtenidos en una curva de calibración elaborada cada día de trabajo cromatográfico, inyectando cantidades conocidas de aflatoxina M1 preparada a partir de disoluciones comerciales. En primer lugar se elaboró una solución madre de 500 ng/L y a partir de esta se elaboraron patrones a concentraciones de 250, 200, 150, 100, 75 y 50 ng/L en la misma mezcla seleccionada para la fase móvil: acetonitrilo: agua (25/75).

Los patrones comerciales y las soluciones madre preparadas a partir de éstos se mantuvieron en un vial ámbar en congelación a -20°C, lo que garantiza su estabilidad a largo plazo. Las soluciones de calibración, se mantuvieron en un vial ámbar en refrigeración a 4°C. Las soluciones patrón se dejaron atemperar a temperatura ambiente siempre previo a su uso.

La identificación de los analitos presentes en las muestras se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de las correspondientes soluciones patrón, inyectadas en idénticas condiciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Determinación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2) en raciones de alimentación para ganado ovino lechero

Tras analizar las raciones alimenticias para ganado ovino lechero siguiendo la metodología descrita previamente, se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, identificándose los picos de las aflatoxinas presentes en cada una de las muestras por comparación de sus tiempos de retención con los de las soluciones patrón.

En las figuras 3 y 4 se reproducen los cromatogramas de dos muestras en las que se detectó contaminación por aflatoxina B1 y aflatoxina G2 respectivamente. Así mismo la Figura 5 muestra el cromatograma de una mezcla de patrones de concentración 2,5 ng/mL usado para realizar la curva de calibración.

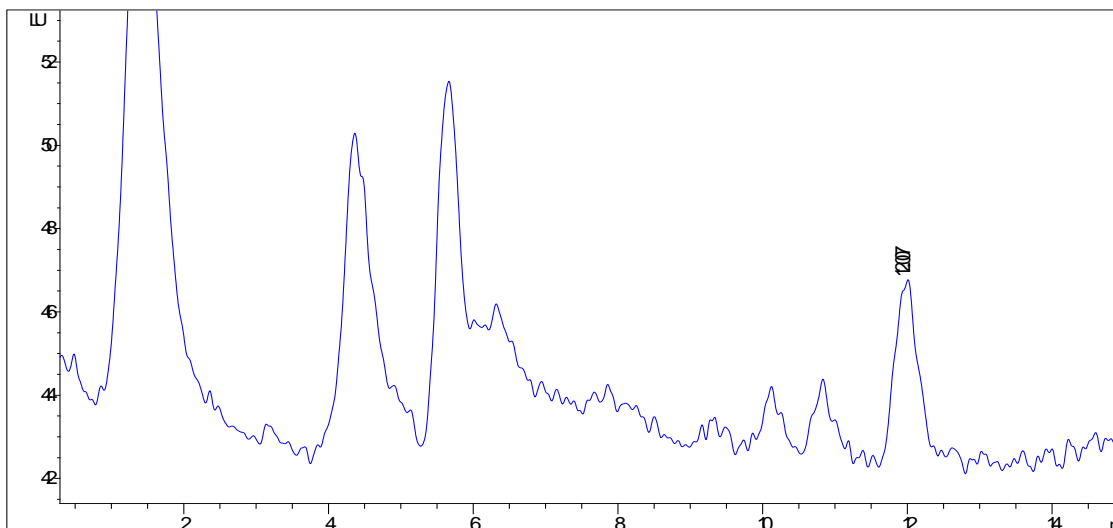


Figura 3. Cromatograma de una muestra de ración alimenticia (MPO 12) contaminada con aflatoxina B1.

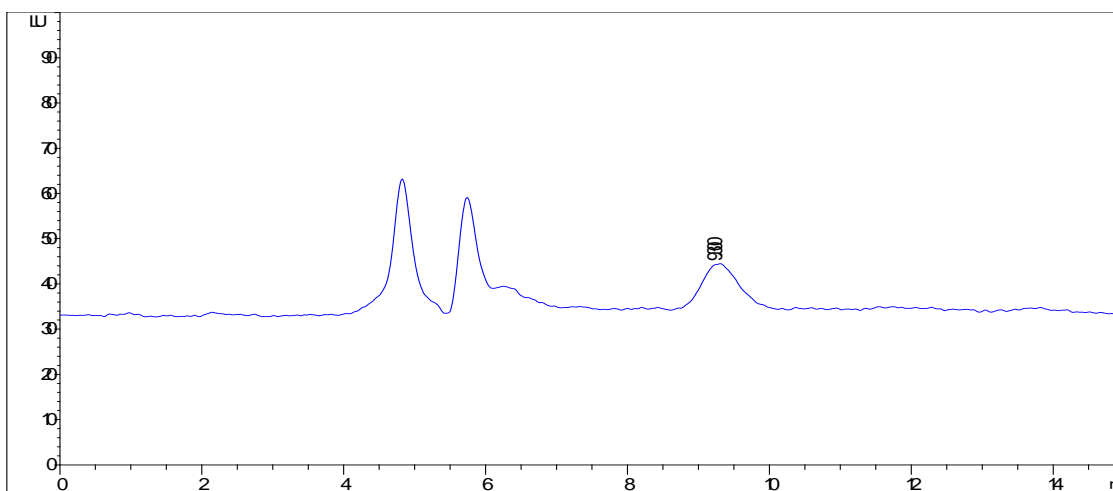


Figura 4. Cromatograma de una muestra de ración alimenticia (MPO5A) contaminada con aflatoxina G2.

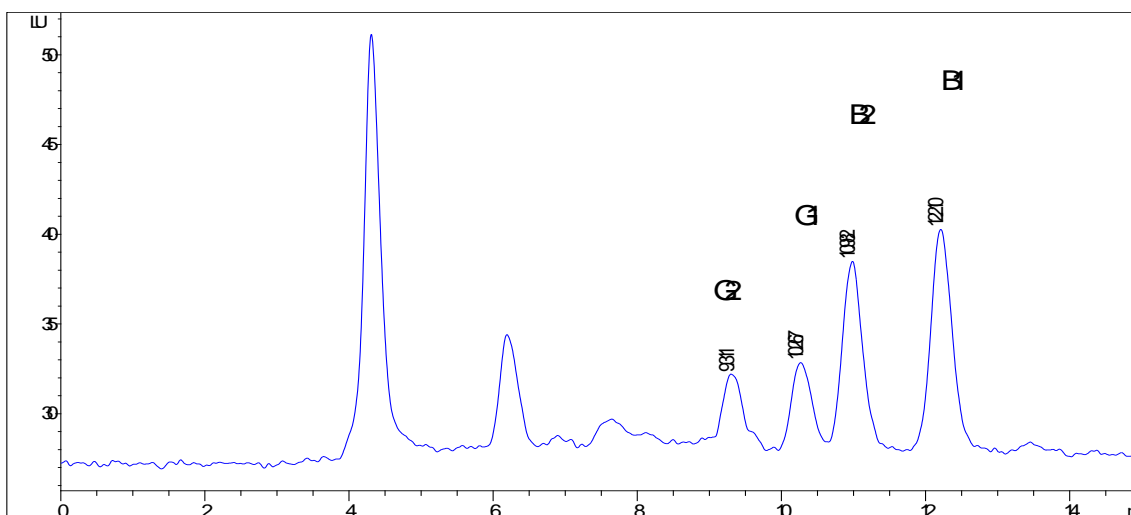


Figura 5. Cromatograma de un patrón mix de aflatoxinas G2, G1, B2 y B1 de 2,5 ng/mL.

Con el fin de cuantificar la cantidad de aflatoxinas totales en las raciones evaluadas, se elaboraron curvas de calibración diariamente con las concentraciones previamente mencionadas, con las cuales se hizo la respectiva interpolación. Con las rectas de regresión se evaluó la linealidad, que se verificó tras obtener $R^2 > 0,999$ en cada una de las rectas, lo que aseguró una adecuada cuantificación del analito. En las Figuras 6 a 9 se muestran las rectas de calibrado obtenidas para las aflatoxinas G2, B2, G1 y B1 respectivamente.

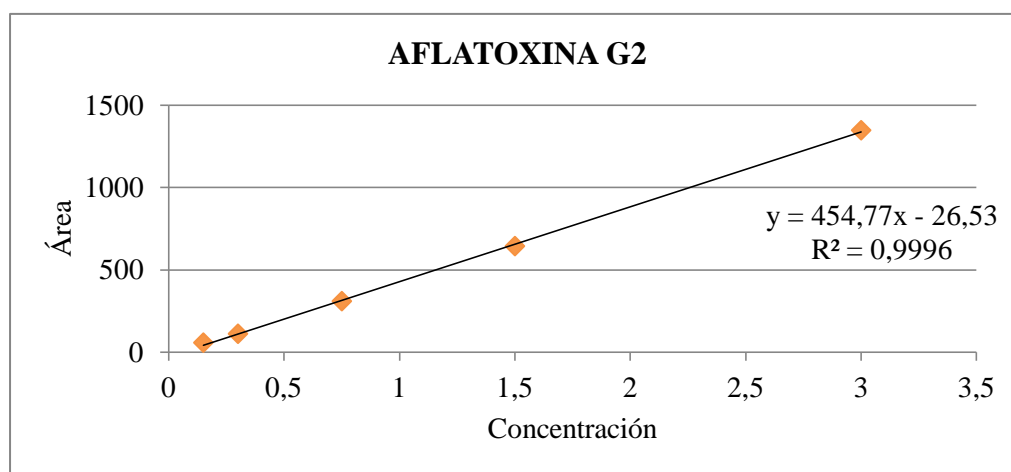


Figura 6. Curva de calibración aflatoxina G2 0,15-3 ng/mL.

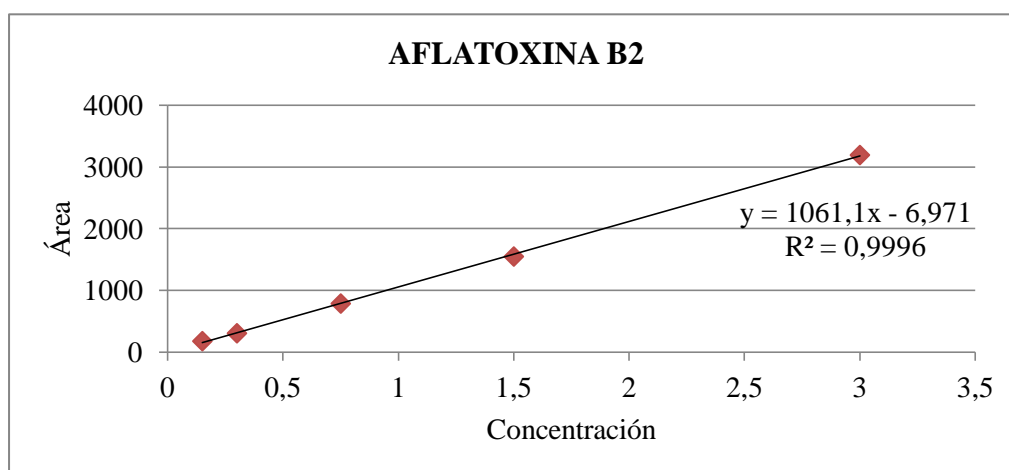


Figura 7. Curva de calibración aflatoxina B2 0,15-3 ng/mL.

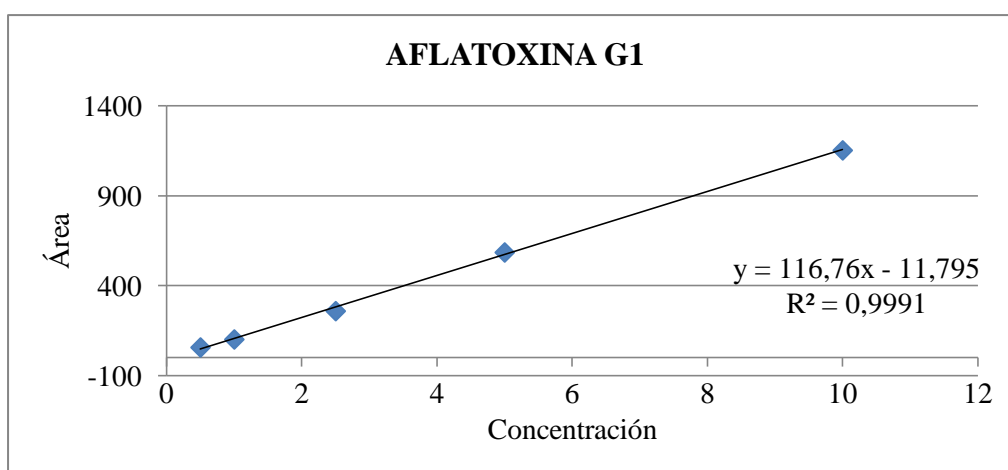


Figura 8. Curva de calibración aflatoxina G1 0,5-10 ng/mL.

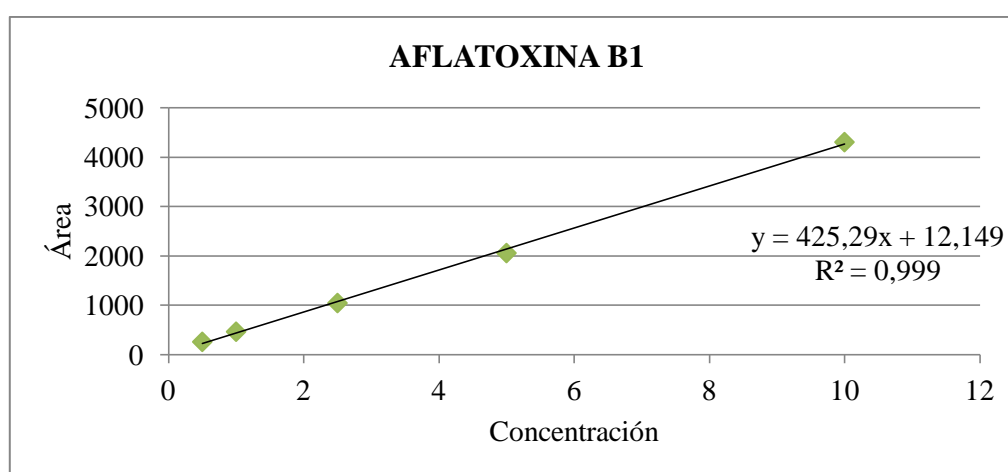


Figura 9. Curva de calibración aflatoxina B1 0,5-10 ng/mL.

Para evaluar las tasas de contaminación de las aflatoxinas tras los análisis cromatográficos se tuvieron en cuenta los límites de detección y cuantificación previamente calculados en el laboratorio, que se muestran en la Tabla 2.

AFLATOXINA	LD (ng/g)	LC (ng/g)
B1	0,05	0,1
B2	0,05	
G1	0,075	
G2	0,05	

Tabla 2. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de la metodología utilizada para aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

A este aspecto, cabe mencionar que el límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito presente en las muestras que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar, mientras que el límite de cuantificación (LC) es la menor cantidad de analito de la muestra que puede ser medida cuantitativamente con una certeza estadística razonable.

Estos valores son semejantes a los descritos por otros autores, como Medina y Magan (2012), quienes determinaron los límites de detección para aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, en: 0,015; 0,0120; 0,042 y 0,023 ng/g respectivamente. Así mismo, concuerdan con los obtenidos por Ariño y colaboradores (2012), quienes establecen el límite de detección en 0,04 ng/g y el límite de cuantificación en 0,1 ng/g.

En la Tabla 3 se recogen los resultados de las tasas de contaminación de las muestras de ración alimenticia de ovino de leche, para cada aflatoxina investigada.

Explotación	Muestras analizadas	Muestras positivas	B1	B2	G1	G2
1	MPO2, MPO3, MPO10, MPO13, MPO16, MPO24 n=6	1	0,18	(0,08)*	<LD	<LD
2	MPO12, MPO18, MPO26, MPO28 n=4	1	0,63	(0,04)*	0,54	<LD
3	MPO1, MPO8, MPO9, MPO17, MPO25 n=5	1	0,21	(0,10)*	<LD	<LD
4	MPO5, MPO6, MPO20 n=3	2	<LD	<LD	<LD	1,10
			<LD	<LD	<LD	1,59
5	MPO4, MPO7, MPO11, MPO21 n=4	1	<LD	<LD	<LD	0,29
6	MPO15, MPO19, MPO22, MPO29, MPO31 n=5	1	<LD	<LD	0,45	<LD
7	MPO14, MPO23, MPO27, MPO30 n=4	0	<LD	<LD	<LD	<LD
	Total muestras 31	Total positivas 7				

Tabla 3. Resultados de las muestras de raciones alimenticias para ganado ovino contaminadas con aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2). (*) < límite de cuantificación.

Para el cálculo de los resultados no se ha tenido en cuenta el porcentaje de recuperación de la técnica, que resultó superior a 90 % en los cuatro analitos evaluados. Los datos que figuran entre paréntesis son estimados, puesto que corresponden a valores que no superan el límite de cuantificación de la técnica.

Tras el análisis de las 31 muestras de raciones alimenticias para ganado ovino, 7 presentaron resultados positivos, lo que corresponde al 23% de muestras analizadas. Dichas muestras presentaron algún tipo de aflatoxina por encima del límite de cuantificación (LC), mientras que en el 77% restante no se detectó presencia de aflatoxinas G2, G1, B2 o B1.

De las muestras positivas, ninguna superó los 5 ng/g de aflatoxina B1, que es el contenido máximo establecido por Reglamento UE n ° 574/ 2011, para piensos compuestos para ovejas lecheras. El resto de las aflatoxinas no se encuentran legisladas para alimentación animal.

Es evidente que la tasa de contaminación por aflatoxinas es baja en las explotaciones, y no todas las muestras de una misma explotación presentan contaminación por aflatoxinas.

La composición de las raciones alimenticias en las explotaciones en las que se tomaron las muestras no varía significativamente respecto a concentraciones de cereales. La mayor diferencia radica en los subproductos utilizados, como es el caso de las explotaciones 6 y 7, en donde se agrega pulpa de naranja a sus raciones. La explotaciones 3 y 6 agregan cebadilla ensilada. Sin embargo los resultados obtenidos no sugieren que exista alguna influencia achacable al uso de subproductos sobre la contaminación por aflatoxinas.

Frente a estos resultados es importante mencionar que la distribución y crecimiento de los mohos productores en un lote es muy heterogéneo, y en consecuencia la formación de aflatoxinas no es homogénea en un mismo sustrato.

En la Figura 10 se puede observar el porcentaje de presencia de cada aflatoxina dentro del grupo de muestras positivas, donde la presencia de aflatoxina G1 tuvo el mismo porcentaje de aparición que las aflatoxinas B2+ B1+G1, mientras que la aflatoxina G2 sola tuvo un porcentaje superior al resto.

La aflatoxina B2 se detectó conjuntamente con la aflatoxina B1, pero en concentraciones que se encontraban por debajo del límite de cuantificación de la técnica.

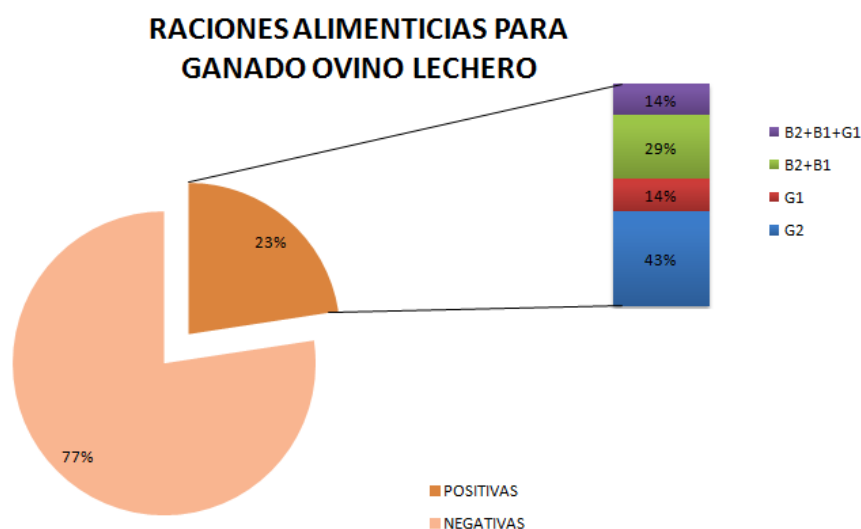


Figura 10. Positividad (%) de la contaminación por aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en raciones alimenticias para ganado ovino de leche (n=31).

Teniendo en cuenta dicho comportamiento se podría inferir que existe una mayor prevalencia de *A.parasiticus* en comparación con *A.flavus*, pues este último se caracteriza por producir únicamente aflatoxinas B1 y B2 (Baranyi *et al.*, 2015).

Las bajas tasas de contaminación por aflatoxinas indican que existe una buena manipulación y adecuado almacenamiento de las raciones alimenticias destinadas para alimentación de ganado ovino en las explotaciones aragonesas, cumpliendo con la legislación vigente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en consonancia con hallados en estudios similares que han sido llevados a cabo en Europa durante los últimos años. La Tabla 4 recopila datos procedentes de diferentes publicaciones, donde tras analizar varias raciones de alimentos y materias primas de las mismas destinados para alimentación de ganado lechero, se observan concentraciones bajas de aflatoxinas, sin superar el límite legal establecido en Europa.

País	Materias primas o ración alimenticia	Aflatoxina analizada	Cantidad <i>n</i>	% positivas	Cantidad cuantificada (ng/g)	Referencia
España	Cebada	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	123	100 para AFB1	0,15-0,34	Ibañez-Vea <i>et al.</i> , 2012
Grecia	Pienso unificado: cebada, trigo, maíz, semilla algodón	AFB1	119	0	NA	Vlachou <i>et al.</i> , 2004
Italia	Pienso con mayor proporción de maíz	AFB1	541	8,31	< 5	Decastelli <i>et al.</i> , 2006

Tabla 4. Tasas de contaminación por aflatoxinas encontradas por otros autores en materias primas o ración alimenticia.

La presencia de aflatoxinas se puede dar por múltiples factores tales como daño mecánico, presencia de dióxido de carbono y oxígeno, aplicación de pesticidas, variedad de la planta, infestación por insectos; pero cabe resaltar humedad y temperatura de la zona de cultivo, ya sea se trate de una contaminación pre cosecha o post cosecha. Los mohos productores de aflatoxinas presentan una temperatura óptima de producción cercana a 24°C, y una producción muy baja o nula por debajo de 13°C o encima de 42°C (Campagnollo *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que las muestras evaluadas fueron tomadas en el final del invierno e inicio de primavera, la razón de las bajas tasas de presencia de aflatoxinas en las raciones alimenticias se pueda deber a las temperaturas registradas durante estos meses, las cuales únicamente en los meses de abril y mayo superaron los 13 grados. A continuación se evidencian las temperaturas registradas mes a mes y la temperatura medial estacional esperada para el año en curso en la comunidad de Aragón, tomando como referencia años anteriores (AEMET, 2016).

Mes	Temperatura normal (°C)	Temperatura registrada (°C)
Febrero	8,3	9,6
Marzo	11,6	10,7
Abril	13,9	14,2
Mayo	16,6	16,4

Tabla 5. Temperaturas registradas en Aragón 2016.

La presencia de aflatoxinas en cereales se ha visto relacionada con países tropicales y subtropicales con climas cálidos, por lo que países Europeos con climas templados, no habían considerado la presencia de aflatoxinas en cultivos agrícolas como un serio problema. Sin embargo, estudios recientes demuestran como el cambio climático ha tenido un efecto en el incremento y contaminación de aflatoxinas en alimentos. Basados en dichos estudios, mohos productores de aflatoxinas y la presencia de estas, serán un problema predominante en aquellos países donde no se había contemplado esta situación previamente (Baranyi *et al.*, 2015). Como se puede observar las temperaturas medias registradas superan las medias esperadas en febrero, marzo y abril, lo que genera una alerta sobre el calentamiento y el cambio climático, que podría favorecer la producción de aflatoxinas en otras estaciones del año y a futuro próximo. Y es que puntualmente en España, en el invierno 2015/2016 las temperaturas medias estacionales han superado los valores normales esperados. Las anomalías térmicas positivas han sido más acusadas en la región mediterránea, llegando a alcanzar +3° C en algunos puntos del interior de la Comunidad Valenciana, Cataluña y Aragón (AEMET, 2016), por tal razón se hace imprescindible prever e implementar métodos eficaces en el control de aflatoxinas.

4.2 Determinación de aflatoxina M1 en leche de ganado ovino

Para realizar la determinación de aflatoxina M1 en muestras de leche de oveja fué necesario realizar ligeras modificaciones sobre el método previamente optimizado y validado en el laboratorio de análisis para leche de vaca, por lo que se llevó a cabo un

proceso de validación parcial del método. Posteriormente se obtuvieron los cromatogramas para las muestras evaluadas, identificándose así los picos de las aflatoxinas presentes en cada muestra a diferente concentración, así como los tiempos de retención para su posterior comparación con los de las soluciones patrón para así realizar una confirmación de la aflatoxina de interés.

A continuación se puede observar un cromatograma obtenido tras el proceso de verificación del protocolo, de una muestra de leche enriquecida a una concentración de 50 ng /L.

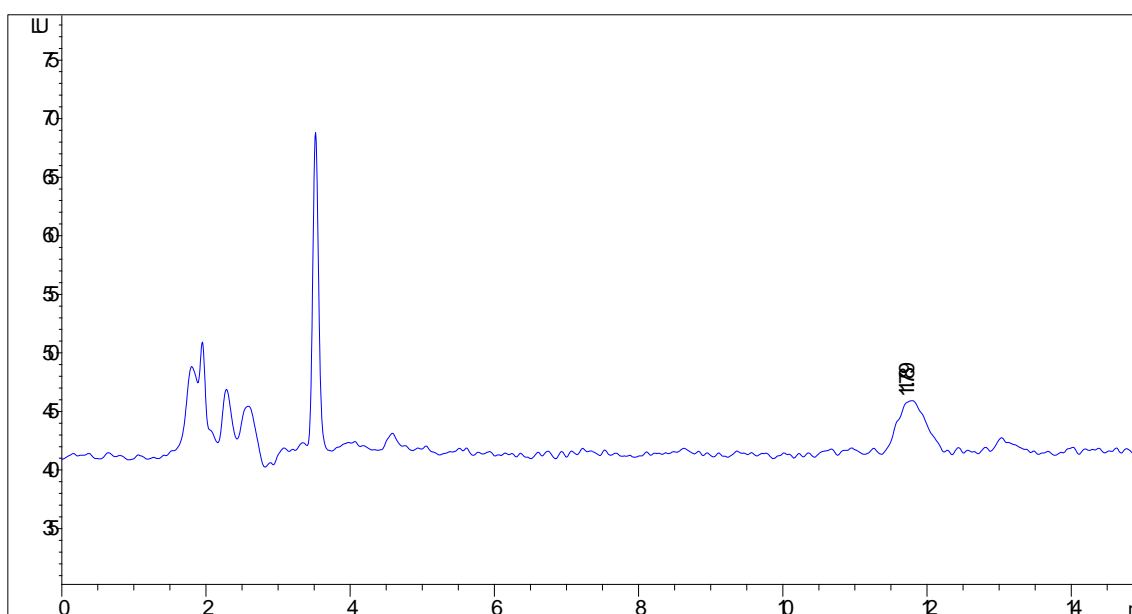


Figura 11. Cromatograma de una muestra de leche enriquecida a 50 ng/L con aflatoxina M1.

En la Figura 12 se observa la muestra blanco o control usado en el procedimiento con objeto de comprobar que no aparecen picos interferentes que coincidan con los tiempos de retención de los analitos investigados, y en la Figura 13 uno de los puntos de solución patrón usado para realizar la curva de calibración.

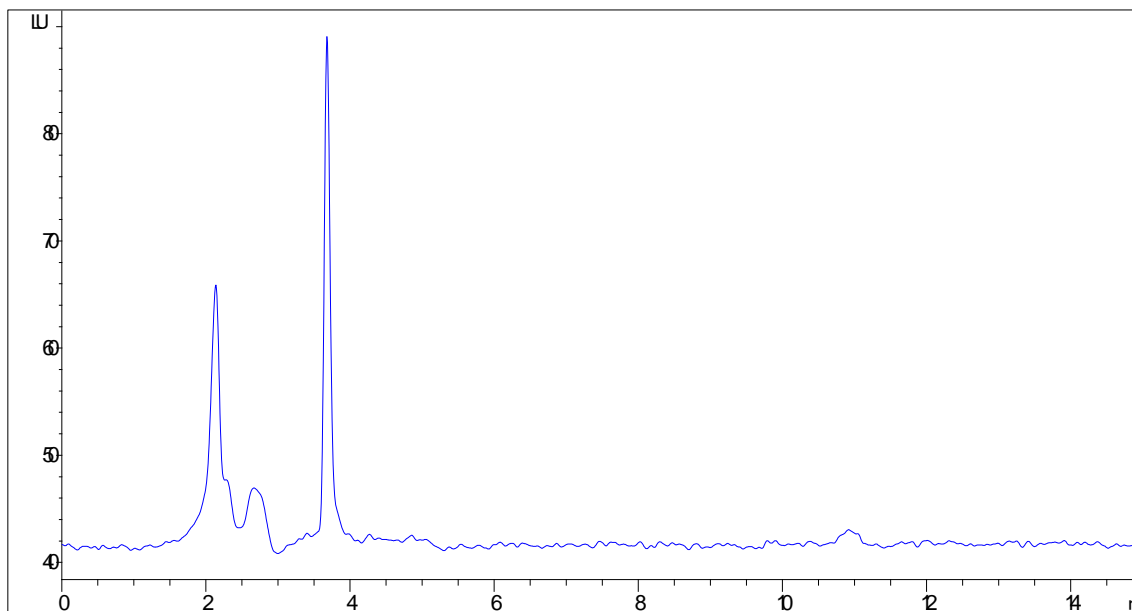


Figura 12. Cromatograma muestra blanco de leche sin enriquecer.

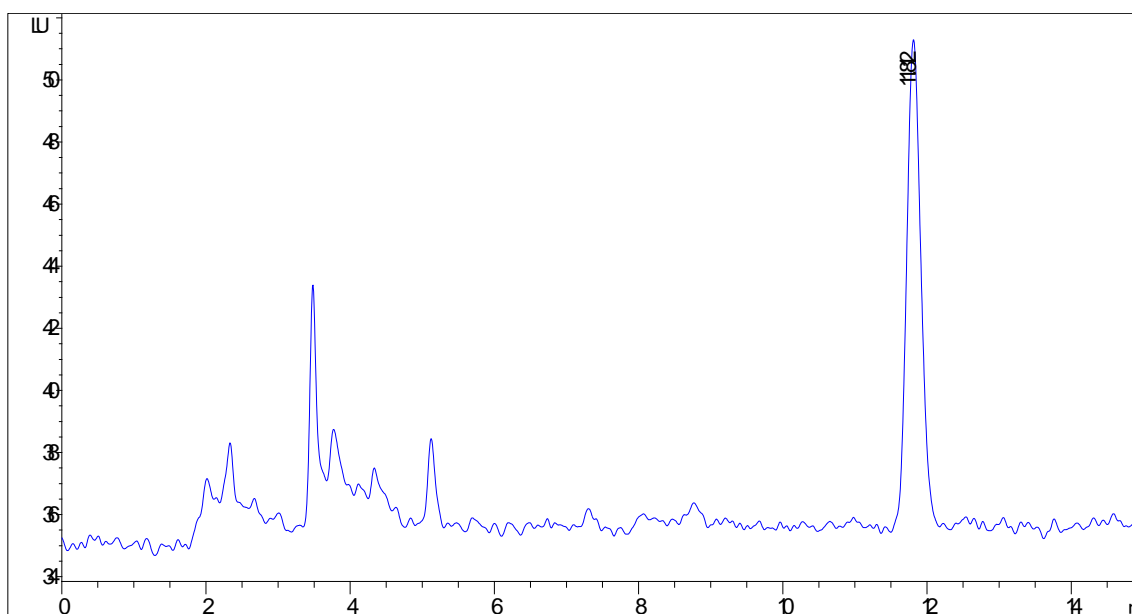


Figura 13. Cromatograma patrón M1 a 500 ng/L.

Con el fin de cuantificar la cantidad de aflatoxina M1 en las muestras de leche evaluadas, se elaboraron curvas de calibración diariamente con las concentraciones previamente mencionadas, con las cuales se hizo la respectiva interpolación.

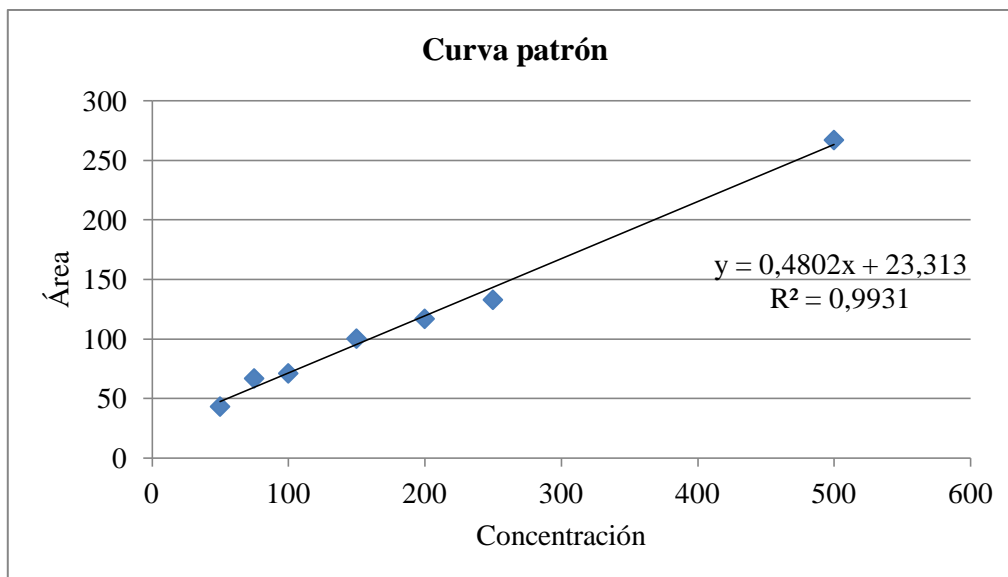


Figura 14. Curva patrón aflatoxina M1 500-50 ng/L.

4.3.1 Recuperación

El estudio de recuperación del método se llevó a cabo haciendo uso de muestras enriquecidas a diferentes concentraciones. Para esto se obtuvieron los resultados evidenciados a continuación

Concentración (ng/L)	Replicas	Cantidad (ng/L)	Promedio	Recuperación (%)
100	R1	92,32	90,59	90,59
	R2	77,80		
	R3	94,15		
	R4	88,42		
	R5	95,27		
	R6	95,58		
50	R1	43,90	45,12	90,25
	R2	48,01		
	R3	45,31		
	R4	38,78		
	R5	50,20		
	R6	44,56		
25	R1	24,04	22,96	91,82
	R2	23,61		
	R3	28,03		
	R4	23,37		
	R5	21,11		
	R6	17,58		

Tabla 6. Determinación porcentaje de recuperación en muestras enriquecidas.

Una vez obtenidos los datos de las 6 réplicas a las 3 concentraciones evaluadas, y su respectiva interpolación en la curva de calibración, se evidencia que para los 3 rangos de concentración se obtuvieron porcentajes de recuperación mayores al 90%, por lo que se establece que el método cumple con los criterios requeridos en la norma UNE-EN SO 14501, en donde se especifica que la recuperación de la Aflatoxina M1 en leche no debe ser inferior al 80%

4.3.2 Reproducibilidad

Con el fin de conocer el porcentaje de reproducibilidad en la técnica utilizada tras haber evaluado las muestras en diferentes días se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 7. En sombreado se evidencian los datos obtenidos para el día 2 de medición.

Concentración (ng/L)	Replicas	Cantidad (ng/L)	Promedio	CVR%
100	R1	92,32	90,59	7,50
	R2	77,80		
	R3	94,15		
	R1	88,42		
	R2	95,27		
	R3	95,58		
50	R1	43,90	45,12	9,34
	R2	48,01		
	R3	45,31		
	R1	38,78		
	R2	50,20		
	R3	44,56		
25	R1	24,04	22,96	14,38
	R2	23,61		
	R3	28,03		
	R1	23,37		
	R2	21,11		
	R3	17,58		

Tabla 7. Coeficientes de variación en términos de reproducibilidad.

La evaluación de los resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad intralaboratorio se ha realizado teniendo en cuenta lo establecido en el Reglamento (CE) N° 401/2006, en donde se detalla que la reproducibilidad del método puede evaluarse a partir de la ecuación de Horwitz. La Tabla 7 muestra los coeficientes de variación obtenidos en términos de reproducibilidad, los cuales deben ser inferiores a 64,0%,

71,04% y 78,85% para las concentraciones de 100 ng/L, 50 ng/L y 25 ng/L respectivamente. Como se puede observar los valores obtenidos para este método cumplen con los criterios de funcionamiento del método analítico establecidos en la legislación vigente.

4.3.3 Repetibilidad

Para determinar el porcentaje de repetibilidad se analizaron 3 muestras bajo las mismas condiciones en intervalos cortos de tiempo. Los resultados obtenidos se muestran a continuación

Concentración (ng/L)	Replicas	Cantidad (ng/L)	Promedio	CVr%
100	r1	92,32	88,09	10,17
	r2	77,80		
	r3	94,15		
50	r1	43,90	45,74	4,56
	r2	48,01		
	r3	45,31		
25	r1	24,04	25,23	9,66
	r2	23,61		
	r3	28,03		

Tabla 8. Coeficientes de variación en términos de repetibilidad.

Los datos mostrados permiten evaluar el coeficiente de variación obtenido en términos de repetibilidad (CVr%). Según lo descrito en el Reglamento (CE) N° 401/2006 la repetibilidad puede calcularse como 0,66 veces el valor de reproducibilidad obtenido a partir de la ecuación de Horwitz. Teniendo en cuenta este criterio, los coeficientes de variación en términos de repetibilidad deben ser inferiores a 42,24%, 46,88% y 52,04% para las concentraciones 100 ng/L, 50 ng/L y 25 ng/L respectivamente. Como se puede observar los coeficientes cumplen con los criterios establecidos, asegurando que el método es repetitivo.

4.4 Resultados obtenidos en las muestras de leche

Una vez analizadas las 31 muestras de leche de oveja procedentes de las diferentes explotaciones, no se detectó en ninguna de ellas la presencia de aflatoxina M1 por encima del límite de detección de la técnica (7 ng/L). El límite de cuantificación

establecido previamente por el laboratorio fue de 25 ng/L. Estos parámetros de validación están en el rango de los obtenidos por otros autores, como es el caso de Tomašević y colaboradores (2015) quienes en un estudio sobre leche procedente de Serbia determinaron 5 ng/L límite de detección y 20ng/L para límite de cuantificación. Los resultados obtenidos para las muestras analizadas coinciden con los reportados en Grecia, donde de 39 muestras de leche de oveja analizadas ninguna superó el límite legal permitido (Malissova *et al.*, 2013). En muestras de leche de oveja procedentes de Pakistan, Hussain y colaboradores (2010) encontraron que el 16% de las muestras analizadas presentaban contaminación por aflatoxina M1, si bien ninguna excedía el límite de normativa. Sin embargo, otros estudios realizados en Medio Oriente pusieron de manifiesto la contaminación por aflatoxina M1 en leche de oveja excediendo el límite legal: 3,9% en Irán (Rahimi *et al.*, 2010) 24% en Siria (Ghanem y Orfi, 2009) y 11,5% en Irán (Fallah *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos no ha sido posible estimar una tasa de transferencia de la ración alimenticia a la leche. Battacone y colaboradores (2003), determinaron que la tasa de transferencia de aflatoxina B1 en aflatoxina M1 en ganado ovino era muy baja, variando desde 0,08 % hasta 0,33%. Asumiendo el valor más alto de tasa de transferencia propuesto por estos autores y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo, en la Tabla 9 se evidencian los valores teóricos de aflatoxina M1 para cada muestra en la que se detectó Aflatoxina B1.

Como se puede observar para los tres casos, este valor, que sería el más desfavorable, se encuentra muy por debajo del límite de detección la técnica.

Explotación	AFB1 en materia seca de pienso ovino (ng/g)	AFM1 teórica después de transferencia del 0,33% (ng/L)
1	0,18	0,30
2	0,63	1,04
3	0,21	0,35

Tabla 9. Aflatoxina M1 teórica después de transferencia del 0,33% a partir de Aflatoxina B1.

En todo caso, estos valores teóricos se encontrarían muy por debajo del límite máximo de residuo establecido por la legislación vigente, que es de 50 ng/L. Hay que tener en cuenta además que existen numerosos factores que influyen en la transferencia de aflatoxina B1 a M1, tales como: regímenes de alimentación, digestión del alimento, estado de la salud del animal, biotransformación hepática, factores nutricionales, fisiológicos, y producción de leche (Battacone *et al.*, 2009; Campagnollo *et al.*, 2016).

Cabe destacar que la aflatoxina M1 se encuentra asociada con la proteína de la leche, por esta razón el estudio de contaminación de leche con aflatoxina M1 es particularmente importante puesto que la mayoría de la leche de oveja es utilizada para producción de quesos. Además mencionar que la leche de oveja tiene una mayor concentración de proteína que la de vaca (Battacone *et al.*, 2003) por lo que se hace vital futuros estudios en torno al tema.

Teniendo en cuenta el potencial carcinogénico de las aflatoxinas, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) no especifica valor numérico tolerable de ingesta diaria, por lo que se recomienda que el nivel sea tan bajo como sea posible, conocido como ALARA, por sus siglas en inglés (as low as reasonably achievable) (JECFA, 2001). Cabe aclarar que no existe riesgo cero, y considerando que las aflatoxinas son contaminantes naturales en los alimentos, que no se pueden eliminar una vez se encuentren en ellos debido a su alta estabilidad, la medida de gestión más práctica desde el punto de vista coste-eficacia, es la aplicación de códigos de buenas prácticas de higiene y agrícolas.(AECOSAN, 2016)

5 CONCLUSIONES

Primera

Las metodologías analíticas utilizadas para el desarrollo de este estudio fueron efectivas, asegurando adecuadas etapas e extracción, purificación y determinación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en ración alimenticia para ganado ovino y aflatoxina M1 en leche de oveja.

Segunda

El 23% de las muestras de ración alimenticia para ganado ovino lechero presentaron contaminación por aflatoxinas por encima del límite de cuantificación de la técnica, sin embargo ninguna de las muestras analizadas superó el límite legal establecido de 5 ng/g para aflatoxina B1. Las tasas de contaminación por aflatoxina B2, G1 y G2 fueron bajas y similares a las descritas en otros trabajos. Las muestras contaminadas aparecieron de manera aleatoria en seis de las siete explotaciones, sin presentar un patrón asociado a la composición o el origen de la ración, por lo que podría atribuirse a la heterogeneidad de la distribución de estos contaminantes dentro de un mismo lote en productos con tamaño grande de partícula.

Tercera

No se detectó la presencia de aflatoxina M1 en ninguna de las muestras de leche de oveja analizadas, en concordancia con la baja tasa de contaminación por aflatoxina B1 detectada en las raciones de alimentación del ganado. Por este motivo no pudo calcularse empíricamente la tasa de transferencia de aflatoxina B1 a aflatoxina M1, si bien se realizó una estimación teórica.

A la vista de estos resultados, el consumo de leche de oveja y sus derivados no se evidencia como un riesgo importante para la salud humana.

Cuarta

Debido a la elevada heterogeneidad de los factores que afectan tanto la producción como la prevalencia de aflatoxinas en cultivos y su posible transferencia a alimentos, se hace vital implementar planes de control eficaces orientados a reducir el riesgo alimentario por presencia de aflatoxinas.

6 BIBLIOGRAFIA

- AECOSAN. (2016) Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Micotoxinas.
- AEMET. (2015) Agencia Estatal de Meteorología. Avance climatológico de Aragón. Statew Agric L Use Baseline. 1.
- Alonso, V. A., Pereyra, C. M., Keller, L. A. M., Dalcerro, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: An overview. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 637–643.
- Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'Arco, G., Passini, C., & Giraudi, G. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. *Food Control*, 25, 125-130.
- Ariño, A., Herrera, M., Estopañan, G., Rota, M., Carramiñana, J., Juan, T., & Herrera, A. (2009). Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. *Food Control*, 20(9), 811–814.
- Baranyi, N., Kocsube, S., & Varga, J. (2015). Aflatoxins: Climate change and biodegradation. *Current Opinion in Food Science*, 5, 60–66.
- Battacone, G., Nudda, a, Cannas, a, Cappio Borlino, a, Bomboi, G., & Pulina, G. (2003). Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2667–2675.
- Battacone, G., Nudda, a, Palomba, M., Mazzette, a, & Pulina, G. (2009). The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4997–5004.
- Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., & Pulina, G. (2005). Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3063–3069.
- Becker-Algeri, T., Castagnaro, D., De Bortoli, K., D Souza, C., Drunkler, D., & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science*, 81(3), 544–552.
- Benedetti, S., Iametti, S., Bonomi, F., & Mannino, S. (2005). Head space sensor array for the detection of aflatoxin M1 in raw ewe's milk. *Journal of Food Protection*, 68 (5), 1089–1092.

- Blout WP. (1961). Turkey “X” disease. *Turkeys*, 9:52-77.
- Bognanno, M., Fauci, L., Ritieni, A., Tafuri, A., De Lorenzo, A., Micari, P., Renzo, L., Ciappellano, S., Sarullo, V., & Galvano, F. (2006). Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (3), 300–305.
- Campagnollo, F., Ganey, K., Khaneghah, A., Portela, J., Cruz, A., Granato, D., & Sant’Ana, A. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, 68, 310–329.
- Cheli, F., Campagnoli, A., & Dell, V. (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages : From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1-2), 1–16.
- Cotty, P.J., & Jaime Garcia, R. (2007). Influences on climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 109-115.
- Damodaran S, Parkin K, Fennema O. (2010). *Química de los alimentos*. España: Ed Acribia. 3ª edición.
- Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtmann, C., Oldano, F., Bandirola, C. (2007). Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004-2005. *Food Control*, 18(10), 1263–1266.
- Decisión de la Comisión Europea del 12 de agosto del 2002 (2002/657/CE), por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y a la interpretación de resultados. DOUE L: 221 (8-36).
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. *The EFSA Journal*, 282, 1–31.
- Fallah ,AA., Fazlollahi, R., & Emami, A.(2016) Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk of four dairy species in Yazd, Iran. *Food Control. Elsevier Ltd*, 68, 77–82.
- FAO - ONU. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones. *Estudio FAO. Alimentación Y Nutrición*, 45.

- FAO. (2016) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food safety and quality, mycotoxins.
- Fink-gremmels, J., & Fink-gremmels, J. (2008). Food Additives & Contaminants : Part A Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk : A review. *Food Additives and contaminants.Part A*, 0025(2), 172–180.
- Galvano, F., Galofaro, V., & Galvano, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: A worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59 (10), 1079–1090.
- Ghanem, I., & Orfi, M. (2009). Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control* ,20,603–605.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., & Magan, N. (2008). Effect of Aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 109-113.
- Hussain, I., Anwar, J., Asi, M. R., Munawar, M. A., & Kashif, M. (2010). Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control*, 21, 122-124.
- IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (Vol. 82).
- Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E., Lizarraga, E., & López De Cerain, A. (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. *Food Chemistry*, 132(1), 35–42.
- JECFA. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. In Prepared by the 56th meeting of the food additives Series No. 47.
- Kensler, T., Roebuck, B., Wogan, G., & Groopman, J. (2011). Aflatoxin: A 50-year Odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120, 28–48.
- MAGRAMA (Ministerio de Medio Ambiente y Medio rural y Marino). (2015). Magrama 2014. *Caracterización del sector ovino y caprino en España año 2014*, 1, 1–25.
- Malissova, E., Tsakalof, A., Arvanitoyannis, I., Katsafliaka, A., Katsioulis, A., & Tserkezou, P. (2013). Monitoring aflatoxin M1 levels in ewe's and goat's milk

- in Thessaly, Greece; potential risk factors under organic and conventional production schemes. *Food Control*, 34, 241-248.
- Marin, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
 - Martins, H. M., Guerra, M. M. M., & Bernardo, F. M. D. (2007). Presencia de aflatoxina B1 en piensos para ganado lechero en Portugal durante el periodo 1995-2004. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(1), 69–71.
 - Medina, A., & Magan, N. (2012). Comparison of three different C 18 HPLC columns with different particle sizes for the optimization of aflatoxins analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 889-890, 138–143.
 - Oplatowska-Stachowiak, M., Sajic, N., Xu, Y., Haughey, S., Mooney, M., Gong, Y. & Elliott, C. (2016). Fast and sensitive aflatoxin B1 and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients. *Food Control*, 63(1881), 239–245.
 - Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984–991.
 - Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M., & Kazemeini, H. R. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (1), 129–31.
 - RASFF. (2016) Rapid Alert System for Food and Feed.
 - Reglamento (CE) nº 1831/2003 de la Comisión, de 22 de septiembre de 2003 por el que se fijan los contenidos máximos de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DOUE L 261: 1-24.
 - Reglamento (UE) nº 574/2011 de la Comisión, de 16 de junio de 2011 por el que se modifica el Anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melanina y *Ambrosia* spp., y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonóstatos, y por la que se consolidan sus anexos I y II. DOUE L 159: 7-24.

- Ribeiro, J., Cavaglieri, L., Fraga, M., Direito, G., Dalcerro, A., & Rosa, C. (2006) Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 179-184.
- Rodriguez, M., Calonge, M., Ordoñez, D., (2003).ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives Contamination*, 20(3), 276-80.
- Rubio, R. (2011) *Incidencia de aflatoxinas en leche de oveja y derivados en Castilla-la Mancha*. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla la Mancha.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., & Carnaghan, R. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 19(2),1096-1097.
- Scudamore, K., & Livesey, C. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 1–17.
- Soriano Del Castillo, J.M., (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Storm, I., Rasmussen, R., & Rasmussen, P. (2014). Occurrence of Pre- and Post-Harvest Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Danish Maize Silage. *Toxins*, 6, 2256-2269.
- Tomašević, I., Petrović, J., Jovetić, M., Raičević, S., Milojević, M., & Miočinović, J. (2015). Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. *Food Control*, 56, 64–70.
- Trombete, F., Saldanha, T., Direito, G., & Fraga, M. (2013). Trichothecenes and aflatoxins contamination in wheat and wheat products: occurrence and methods of determination. *Revista Chilena de Nutrición*, 40, 181-188.
- UNE-EN ISO 14501:2008 para la “Determinación del contenido de aflatoxina M1 en leche y leche en polvo. Purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad y determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución.
- UNE-EN ISO 16050:2011 para la “Determinación de aflatoxina B1, y contenido total de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución”.

- Wang, X., Niessner, R., Tang, D., & Knopp, D. (2016). Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins. *Analytica Chimica Acta*, 912, 10–23.
- Yiannikouris, A., & Jouany, J-P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res*, 51, 81–99.