



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Micotoxinas	3
1.2. Deoxinivalenol	5
1.2.1. Origen de la contaminación alimentaria	6
1.2.2. Toxicidad	8
1.2.3. Incidencia en maíz	9
1.2.4. Prevención y control	11
1.2.5. Técnicas de análisis	16
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	17
3. METODOLOGÍA	18
3.1. Recogida y preparación de muestras	18
3.2. Técnica semicuantitativa de cribado	19
3.3. Técnica HPLC-DAD	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. Influencia de la fecha de cosecha en el contenido de DON	28
5. CONCLUSIONES	30
6. CONCLUSIONS	31
7. VALORACIÓN PERSONAL	31
8. BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

En el presente Trabajo Fin de Grado se han analizado muestras de grano de maíz secado y molido procedentes de diversas localizaciones de la comunidad autónoma de Aragón y cosechadas durante los meses de octubre y noviembre de 2018, para evaluar su contenido en deoxinivalenol, una de las micotoxinas con mayor importancia en España, la cual contamina una amplia variedad de alimentos y piensos, entre los que destacan los cereales y sus derivados.

El análisis de esta micotoxina en las muestras de maíz se llevó a cabo mediante dos técnicas: una técnica semicuantitativa de cribado basada en inmunocromatografía de flujo lateral (*Lateral Flow Devices*, LFD), y otra técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector de diodos (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC-DAD). Esta última se utilizó para la confirmación de los resultados obtenidos mediante la técnica de cribado que mostraron tasas de contaminación con valores cercanos o superiores al contenido máximo de 1,75 mg/kg establecido en la legislación europea para alimentación humana.

Las tasas de contaminación por deoxinivalenol en las muestras analizadas por la técnica de cribado, presentaron un promedio de 1,48 mg/kg con un rango entre 0,21 mg/kg y 7,22 mg/kg en 37 muestras positivas (62,71 %). De las muestras en las que se detectó deoxinivalenol, 12 presentaron un contenido superior a 1,50 mg/kg, por lo que también fueron analizadas por HPLC-DAD. Los resultados así obtenidos permitieron establecer un valor medio de contaminación por esta micotoxina de 1,34 mg/kg, superando 8 de las muestras (13,60 %) analizadas el contenido máximo de DON en maíz destinado a alimentación humana.

ABSTRACT

In the present Degree Final Project it has been evaluated the deoxynivalenol content of ground and dried maize grain samples from diverse locations of the autonomous community of Aragon, harvested between October and November of 2018. This is one of the most important mycotoxins in Spain, which contaminate a broad range of food and feed, mainly cereals and its products.

The analysis of this mycotoxin was carried out by two techniques: a semiquantitative screen technique based on lateral flow immunochromatography (Lateral Flow Devices, LFD), and other technique of High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD). The latter was used in order to confirm those results obtained by the screening technique which showed contamination rates near or above the maximum content of 1.75 mg/kg established in the European legislation for human consumption.

Deoxynivalenol contamination rates in analyzed samples by semiquantitative screen technique, presented an average content of 1.48 mg/kg and a range between 0.21 mg/kg and 7.22 mg/kg in 37 positive samples (62.71 %). Levels higher than 1.50 mg/kg were detected in 12 of the positive samples, and so they were also analyzed by HPLC-DAD. The results thus obtained allowed to establish an average content for this mycotoxin of 1.34 mg/kg, surpassing the maximum content for DON on maize intended for human consumption eight of the analyzed samples (13.60 %).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MICOTOXINAS

Las **micotoxinas** son **metabolitos secundarios** de origen fúngico de interés mundial, debido a sus efectos adversos sobre la salud pública así como por las pérdidas económicas que provocan y su impacto en el comercio nacional e internacional (Ariño *et al.*, 2015).

El término **micotoxina** proviene del griego “mycos”, que significa hongo, y del latín “toxicum”, que significa tóxico o veneno (AFHSE, Asociación de Fabricantes de Harinas y Sémolas de España, 2015). Actualmente se conocen más de trescientas micotoxinas (Arroyo *et al.*, 2014), siendo los géneros fúngicos más relevantes en cuanto a su producción en cereales: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Gómez, 2007). La síntesis de micotoxinas tiene lugar en la etapa final de crecimiento del moho o al principio de la fase estacionaria (Soriano *et al.*, 2007), siendo cada uno de estos géneros, productor de varios tipos de micotoxinas (Tabla 1).

Tabla 1. Géneros de mohos y micotoxinas producidas de importancia mundial. Adaptación de D’Mello y Macdonald, (1997).

Género	Micotoxinas producidas
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, ocratoxina A
<i>Fusarium</i>	Deoxinivalenol, zearalenona, toxinas T-2 y HT-2, fumonisinas B1, B2 y B3
<i>Penicillium</i>	Ocratoxina A, patulina

Para la proliferación del moho y la síntesis de micotoxinas se requieren determinadas condiciones de temperatura, humedad y sustrato, pudiéndose observar diferencias entre géneros. Una forma de clasificación de las micotoxinas diferencia aquellas que se producen principalmente en el cultivo (“micotoxinas de campo”), frente a aquellas que se sintetizan mayoritariamente durante las etapas posteriores de almacenamiento y procesado (“micotoxinas de almacenamiento”), bajo condiciones apropiadas para el desarrollo fúngico.

Así, el género *Aspergillus* se asocia con zonas climáticas tropicales y subtropicales, debido a que prolifera en condiciones de humedad relativa entre 88 y 95 %, y en un amplio rango de temperatura entre los 10 y 43 °C, si bien su temperatura óptima para la síntesis de micotoxinas se encuentra entre los 20 °C y los 30 °C. Las

especies micotoxigénicas de este género presentan una especial afinidad por frutos secos y semillas de oleaginosas, pudiendo contaminar cultivos de algodón, cacahuetes, maíz, así como otros cereales y especias (Soriano *et al.*, 2007).

Fusarium se encuentra principalmente en las zonas de clima templado donde se dan las condiciones para su proliferación: temperaturas entre 20 °C y 25 °C y humedades relativas superiores al 80 %. Las especies micotoxigénicas de este género presentan afinidad por los cereales, pudiendo contaminar cultivos de trigo, maíz y cebada entre otros (Soriano *et al.*, 2007).

Por otro lado, *Penicillium* es más común en zonas de clima frío y templado debido al rango de temperaturas de proliferación, entre los 4 y los 31 °C, y una actividad de agua de 0,80. Puede contaminar alimentos producidos en zonas de clima frío y templado, destacando los cereales y derivados, bebidas alcohólicas, así como productos procedentes de la molienda como el cacao o el café (Ravelo *et al.*, 2011).

A nivel mundial se estima que el 25 % de los cultivos, incluidos alimentos básicos como los cereales, se ven afectados por mohos productores de micotoxinas. En cuanto a su importancia económica, la cifra estimada de pérdidas de productos alimenticios a nivel mundial es del orden de 1.300 millones de toneladas anuales (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2019).

Esta cifra contrasta con la producción total de maíz, situada en torno a 1.130 millones de toneladas en el periodo de 2016 y 2017 (CIC, Consejo Internacional Cereales, 2019). En el caso concreto de EEUU las pérdidas anuales debidas a los efectos de las micotoxinas en la cosecha de cereal rondan los 1.000 millones de dólares anuales (Castañeda, Chirivella y Carbonell, 2012).

Los efectos adversos que sobre la salud pública puede producir el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas se denominan micotoxicosis y se caracterizan por cuadros de toxicidad aguda o crónica que pueden afectar a los sistemas: inmunológico, hematológico, hepático, respiratorio, neurológico y renal, así como provocar efectos mutagénicos, carcinogénicos y estrogénicos. Las micotoxicosis pueden diferenciarse en primarias o secundarias. Las primeras se producen como consecuencia de la ingesta de un alimento o pienso contaminado; y las segundas son debidas al consumo de productos procedentes de animales que hayan bioacumulado micotoxinas en sus tejidos, y/o excretado como en el caso de la leche o los huevos (Ramos, 2016).

En este sentido, el deoxinivalenol o vomitoxina es una micotoxina que contamina frecuentemente los alimentos y piensos y produce micotoxicosis primarias en el hombre y animales.

1.2. DEOXINIVALENOL

El **deoxinivalenol (DON)**, clasificada dentro de las toxinas no estrogénicas, es la más importante y frecuente de las micotoxinas del grupo de los **tricotecenos de tipo B**. Todas ellas presentan una estructura química similar, basada en dos anillos fenólicos, una función carbonilo en la posición C8, tres grupos hidroxilos (OH-) a los que se asocia su toxicidad y un grupo ceto insaturado en posición α , β (Figura 1) (Soriano *et al.*, 2007; AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2015; Ariño *et al.*, 2015).

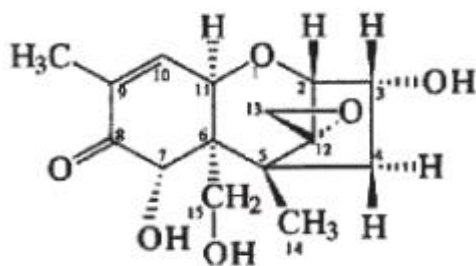


Figura 1. Estructura química del DON (Sosa, Escobar y Faure, 2017).

Se trata de un compuesto polar con cierta solubilidad en agua y muy soluble en otros solventes polares como el metanol, lo cual se ha asociado con una menor presencia de la micotoxina en algunos productos derivados del maíz tras su procesado.

Además, el deoxinivalenol está considerado como un compuesto estable a diferentes valores de pH y relativamente estable térmicamente. A modo de ejemplo, Numanoglu *et al.*, (2012) llevaron a cabo un ensayo de degradación térmica en panes elaborados a base de maíz contaminados de forma natural con deoxinivalenol y sometidos a diferentes temperaturas de cocción. En el citado estudio no se observó degradación alguna de la micotoxina a 100 °C, siendo necesarias 3 horas de tratamiento a 150 °C para reducir su contenido un 37 %. Conforme se incrementó la temperatura (200 y 250 °C) se redujo el tiempo necesario en 30 y 15 minutos para alcanzar reducciones que alcanzaron valores de 35,7 % y 32 %, respectivamente.

1.2.1. ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN ALIMENTARIA

El DON es considerada como una típica “**micotoxina de campo**”, ya que su producción se da principalmente en el cultivo. Durante el momento de la floración, la planta puede ser infectada por especies de *Fusarium* micotoxigénicas, aunque también la contaminación por mohos y formación de micotoxinas puede ocurrir durante la recolección, transporte, almacenamiento o procesado (ELIKA, Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013).

Esta toxina se sintetiza principalmente por mohos del G° *Fusarium* (EFSA CONTAM Panel, 2017), siendo las dos principales especies productoras: *Fusarium graminearum*, que prevalece en zonas templadas y húmedas, y *F. culmorum*, más presente en zonas algo más frías y húmedas (ELIKA, 2013). En el caso de *F. graminearum*, sus condiciones óptimas de crecimiento se dan a a_w de 0,88 y 25 °C de temperatura, mientras que *F. culmorum* crece óptimamente a a_w de 0,87 y 21 °C de temperatura (JECFA, *Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives*, 2001).

Esta ligera diferencia de condiciones óptimas de crecimiento ha sido asociada con un avance de *F. graminearum* en detrimento de *F. culmorum* debido al calentamiento global y al consecuente aumento de temperaturas. Así, se ha descrito su avance en algunos países como Alemania, Holanda e Inglaterra (Chakraborty y Newton, 2011). En el caso de España, destaca *F. graminearum* como principal productor de deoxinivalenol en los cultivos de cereales en relación a su clima templado (Miraglia *et al.*, 2009).

Ambas especies de mohos son importantes patógenos para las plantas, y en cereales son responsables de las **fusariosis** de la espiga de trigo y del maíz. Esta enfermedad se presenta como podredumbre de los granos de maíz debido a la presencia de micelio de color rosado como consecuencia del crecimiento fúngico y posterior marchitez total o parcial de la planta. La fusariosis se extiende, por lo general, desde la punta de la mazorca, descendiendo por canales realizados por insectos hasta la base de la misma (Velluti, 2002; AFHSE, 2015).

A continuación se describe el ciclo infectivo del G° *Fusarium* (Figura 2), el cual parte de un inóculo primario de formas resistentes de estas especies, bien procedente de residuos de cosechas anteriores, o bien por el uso de semillas infectadas, que son colonizadas por los mohos micotoxigénicos después de la germinación. La infección, por lo general, se produce en el momento de la floración, durante la cual aumenta la susceptibilidad, aunque puede producirse en otros periodos debido a la existencia de heridas en el tejido vegetal (Ariño *et al.*, 2015; Cruz, 2016).



Figura 2. Ciclo infectivo de *Fusarium* en maíz (elaboración propia).

La presencia del moho en rastrojos de cultivos anteriores (hospedadores de *Fusarium*) o en la maleza, se relaciona con un mayor contenido de DON en la cosecha de maíz (Ariño *et al.*, 2015). Asimismo, el llevar a cabo labores de arado puede llegar a reducir las tasas de DON en maíz en un 94 % (Maiorano *et al.*, 2008).

Por otro lado, que se den ciertas condiciones ambientales como la pluviometría en la etapa que abarca desde la floración a la cosecha y la alta humedad relativa ambiental comprendida entre el 92 % y el 94 %, son factores que influyen directamente en la contaminación de los cultivos. Asimismo, la dispersión de las esporas fúngicas se

ve favorecida además, por el viento así como por el riego por aspersión y la lluvia (Cruz, 2016; Kos *et al.*, 2016).

La producción de deoxinivalenol se da sobre todo en **granos de cereales y en productos derivados de los mismos**, siendo más prevalentes en trigo y maíz, aunque pueda encontrarse también en centeno, avena, cebada, arroz y sorgo (ELIKA, 2013). El consumo de estos productos, junto con otros alimentos como los frutos secos y el café constituyen la principal fuente de exposición a esta micotoxina de forma directa. La intoxicación en animales se asocia sobre todo con piensos derivados de cereales y maíz forrajero (EFSA CONTAM Panel, 2017).

Sin embargo, el deoxinivalenol, a diferencia de otras micotoxinas, presenta una **escasa transferencia** desde los piensos a la carne, huevos o leche, y por tanto la ingesta de productos de origen animal apenas contribuye a la exposición a esta toxina (AFHSE, 2015).

1.2.2. TOXICIDAD

Esta micotoxina a altas concentraciones en alimentos y piensos puede producir **cuadros de toxicidad aguda** en seres humanos y animales, cuyos síntomas más importantes son los vómitos, náuseas, diarreas y malestar general. De hecho, el deoxinivalenol es conocido vulgarmente como vomitoxina, ya que los vómitos son uno de sus efectos adversos más comunes (Hernández, 2014; AECOSAN, 2015). La intoxicación por DON es más propia de los animales de abasto, y, aunque la intoxicación en seres humanos es **poco común**, se conocen algunos episodios en relación a la ingesta de cereales contaminados.

Entre ellos, destacan varios brotes de micotoxicosis agudas acontecidos en China entre los años 1984 y 1985, que afectaron a más de 7.800 personas tras el consumo de maíz y trigo contaminados por DON, alcanzándose niveles de hasta 92,8 mg/kg en granos de maíz en los que se distinguía la presencia de mohos. Las personas afectadas padecieron náuseas, vómitos y cefaleas en un periodo de tiempo entre los cinco y treinta minutos posteriores a la ingesta, lo cual dio lugar a la denominación vulgar del deoxinivalenol como vomitoxina (Luo, 1991; Hernández, 2014).

El deoxinivalenol presenta menor toxicidad a diferencia de otros tricotecenos, como por ejemplo la toxina T-2, siendo únicamente letal en concentraciones tan

elevadas que resulta casi imposible encontrarlas en alimentos o piensos. Algunos grupos de investigación obtuvieron valores de LD₅₀ (*Median Lethal Dose*) en pollos broiler de 140 mg/kg p.c (Huff *et al.*, 1981), mientras que en ratones se sitúan entre 49 mg/kg p.c y 79 mg/kg p.c por inyección peritoneal (Forsell *et al.*, 1987) y entre 46 mg/kg p.c y 78 mg/kg p.c por administración oral (Yoshizawa *et al.*, 1983).

Aunque menos frecuentes, también se pueden presentar **cuadros de toxicidad crónica** derivados de una exposición prolongada y altas concentraciones de deoxinivalenol (AECOSAN, 2015). En este sentido, algunos organismos científicos como el Comité Mixto FAO/OMS (JECFA) han publicado informes relativos a evaluaciones del riesgo por DON. En ellos se han definido parámetros toxicológicos como el de IDTMP (Ingesta Diaria Tolerable Media Provisional) de 1 µg/kg de peso corporal basado en el valor NOEL (*No Observed Effect Level*) de 100 µg/kg peso corporal y día que producía alteraciones en el ritmo de ganancia de peso en ratones de dos años, así como una ARfD (*Acute Reference Dose*) de 8 µg/kg de peso corporal basándose en el valor BMDL₁₀ (*Benchmark Dose*) de 0,21 mg/kg peso corporal y día que producía vómitos en cerdos (JECFA, 2011).

Asimismo, el DON, no parece ser cancerígeno en animales de experimentación, y ha sido clasificado por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) dentro del **Grupo 3** (No clasificable como carcinogénica) al no existir evidencia científica de que cause cáncer, descartándose además su genotoxicidad (IARC, 1993).

1.2.3. INCIDENCIA EN MAÍZ

La evaluación de la incidencia actual de deoxinivalenol como contaminante de alimentos y piensos requiere acudir a la bibliografía científica disponible.

En cuanto a la incidencia actual de deoxinivalenol en maíz, la empresa de nutrición animal Biomin elabora anualmente una encuesta a partir del análisis de 15.000 muestras de cereales procedentes de más de 80 países del mundo. De este modo, según el último informe disponible del año 2018, en el 66 % de las 571 muestras de maíz en grano molido analizadas en Europa se detectó DON, con un contenido promedio de 0,82 mg de DON/kg de muestras positivas (Biomin, 2018).

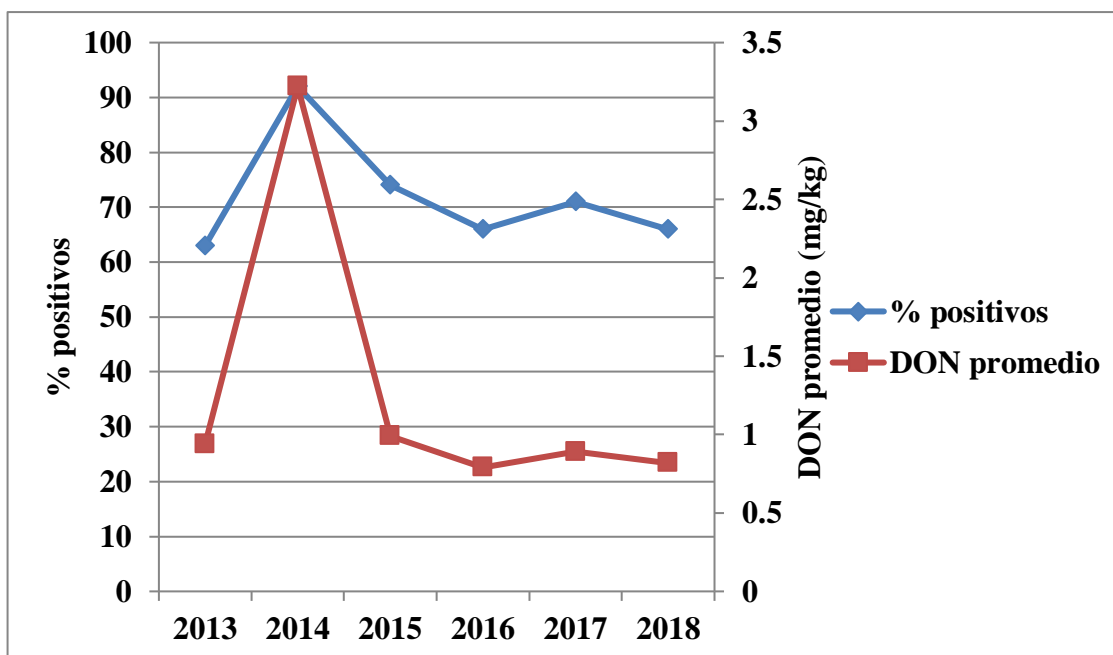


Figura 3. Análisis de DON en muestras de maíz europeas. Datos obtenidos de BIOMIN World Mycotoxin Survey Report 2013 (n=1.854), 2014 (n=223), 2015 (n=229), 2016 (n=1.162), 2017 (n=776) y 2018 (n =571). —■— [DON]Promedio expresado en mg/kg —◆— % POSITIVOS DON como % de muestras positivas.

Con la información correspondiente a los análisis de los seis últimos años, se puede observar que tanto la incidencia como el valor medio de contaminación presentaron cifras interanuales similares, a excepción del resultado obtenido en 2014, relacionándose éste con un aumento de la pluviometría en la época de verano.

Si bien el contenido promedio de deoxinivalenol hallado en las muestras positivas fue inferior (excepto en los resultados correspondientes al año 2014), al contenido máximo de 1,75 mg/kg establecido en la legislación para maíz destinado a la alimentación humana, en los informes se refleja la existencia de muestras cuyo contenido de deoxinivalenol alcanza valores máximos de hasta 9,82 mg/kg (Biomín, 2016).

Sin embargo, también hay trabajos que evidencian niveles de contaminación por DON en maíz, cuyo contenido promedio supera este valor máximo. En esta línea, Plattner y Maragos (2003) en un análisis realizado por triplicado en 15 muestras de maíz en EE.UU, obtuvieron un valor promedio de 2,77 mg/kg de deoxinivalenol. Si bien, la limitada cantidad de muestras analizadas hace que no pueda compararse con los análisis detallados anteriormente.

Ruiz *et al.*, (2015) llevaron a cabo un ensayo en diversas localizaciones españolas y variedades de maíz cultivadas mediante agricultura tradicional y ecológica para observar posibles diferencias en el contenido de micotoxinas durante dos años consecutivos. En este trabajo no se encontraron diferencias destacables entre las muestras cultivadas de forma tradicional (media de 0,60 mg/kg en la primera localización y 0,38 mg/kg de deoxinivalenol en la segunda localización) y las cultivadas ecológicamente (media de 0,45 mg/kg en la tercera localización y 0,38 mg/kg de deoxinivalenol en la cuarta). Sin embargo, se detectó la presencia de esta micotoxina en casi la totalidad de las muestras analizadas (97 %), a unos niveles inferiores a los contenidos máximos establecidos en la normativa europea.

El deoxinivalenol ha sido además descrito como **potencial indicador** de la presencia de otras micotoxinas en alimentos y piensos (Sobrova *et al.*, 2010), pudiendo darse interacciones entre el deoxinivalenol y otras micotoxinas. En este sentido, se han realizado estudios en cerdos y aves, concluyéndose que existe una interacción aditiva entre la zearalenona y el deoxinivalenol al hacer más acusada la ralentización del ritmo de crecimiento, así como la pérdida de apetito y de peso en animales expuestos a estas micotoxinas presentes en el pienso (Caballero, 2016). En otro estudio realizado en pollos broiler, se demostró la interacción entre las aflatoxinas y el deoxinivalenol presentes en el pienso de engorde. No se observó un efecto tóxico sinérgico entre ambas micotoxinas, pero sí se observó que los efectos adversos de estas micotoxinas eran más severos de forma combinada que de forma individual (Huff *et al.*, 1986). Kubena *et al.*, (1989). Estos investigadores observaron mayores pérdidas en la ganancia de peso en pollitos de 1 día de vida tras la administración de pienso contaminado (16 mg/kg de DON y 4 mg/kg de toxina T-2) durante tres semanas, no siendo destacables los efectos cuando se les dio el pienso con las micotoxinas por separado en la misma concentración.

1.2.4 PREVENCIÓN Y CONTROL

En relación al origen de la contaminación alimentaria por deoxinivalenol y teniendo en cuenta su elevada termorresistencia, una vez se contamina el alimento, es muy difícil eliminarlo de éste. Para ello se precisa evitar su aparición mediante el uso de buenas prácticas agrícolas (BPA) y de fabricación (BPF), siendo éstas las mejores estrategias para evitar los problemas derivados de su presencia en alimentos y piensos.

Asimismo, a lo largo de toda la cadena alimentaria se pueden aplicar herramientas para la prevención de la contaminación de los productos alimenticios. Así, se pueden destacar las Recomendaciones del *Códex Alimentarius* para la prevención y la reducción de la contaminación de cereales por micotoxinas, la Recomendación de la Comisión (2006/583/CE) sobre la prevención y la reducción de las toxinas de *Fusarium* en cereales y productos a base de cereales, así como el Manual FAO sobre la aplicación del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) en la prevención y control de las micotoxinas (ACSA, Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012), además de otras guías elaboradas por otros organismos científicos y grupos de investigación.

Entre las medidas de prevención a aplicar, destacan la rotación de cultivos, evitando especies sensibles a *Fusarium*, así como evitar el abuso del riego por aspersión. Otra práctica agrícola de alto impacto durante el periodo de floración es la eliminación de restos de cultivo anteriores mediante laboreo superior a 10 cm, debido a que el 90 % de la población de *Fusarium* se localiza en esos 10 cm, consiguiéndose reducciones de la contaminación de los granos por deoxinivalenol en un 80 % (Champeil, Doré y Furbet, 2004; Ariño *et al.*, 2015).

Blandino *et al.*, (2010) confirmaron la existencia de una relación positiva entre la densidad de residuos de maíz en el suelo y las tasas de contaminación de deoxinivalenol en grano de trigo de segunda cosecha en el norte de Italia (Imola). Para ello, tomaron una muestra representativa de dos kilogramos subdividida en muestras analíticas de 25 gramos en cada escenario. De este modo, se determinó que conforme aumentaba la densidad de residuos en cada escenario (eje de abscisas) se incrementaba el promedio de DON en la cosecha de maíz (Figura 4).

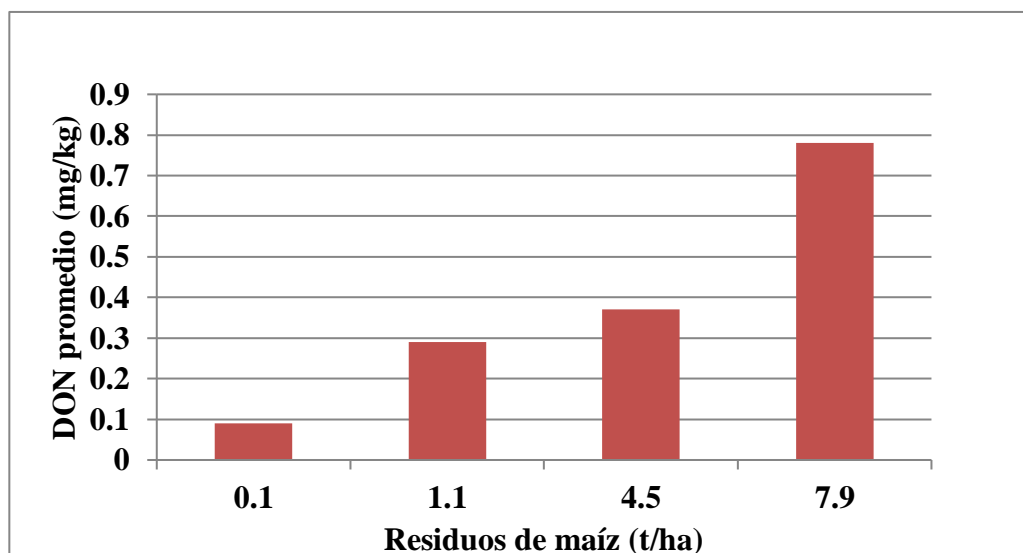


Figura 4. Análisis de muestras de maíz en grano cultivadas en parcelas con presencia de residuos en diferentes densidades.

Asimismo, se ha comprobado que la aplicación de tratamientos fungicidas y medidas higiénicas de equipos y utensilios de labranza reducen la contaminación de los cultivos con deoxinivalenol (Ariño *et al.*, 2015). La fecha de recolección también puede influir en el contenido de deoxinivalenol en maíz. Cuanto más se retrasa la misma, mayor es la exposición al patógeno. De este modo, si se dan las condiciones ambientales para la síntesis de micotoxina en el maíz, ésta se acumulará conforme avanza la fecha.

En este sentido, en un estudio realizado en maíz francés (n=938) recolectado en diferentes fechas, se estableció una relación directa en el aumento del contenido de deoxinivalenol cuanto más se prolongaba la fecha de recolección en el tiempo (contenido promedio de 0,49 mg/kg para las muestras recolectadas después del 16 de noviembre frente a 0,18 mg/kg en las recolectadas entre el 1 y el 15 de octubre) (Arvalis, 2006).

Desde el punto de vista de la producción y transformación de alimentos y piensos, cabe destacar que, si bien el deoxinivalenol se produce mayoritariamente en el campo, también puede producirse durante los periodos de almacenamiento si se dan las condiciones para ello. Para evitarlo es necesario disminuir la humedad en los granos de maíz por debajo del 15 % en menos de 48 horas y mantener los granos en un ambiente con temperaturas inferiores a 25 °C (Velluti, 2002; Ariño *et al.*, 2015).

Además, se han establecido **contenidos máximos de micotoxinas en la legislación**, así como recomendaciones sobre la presencia de deoxinivalenol en productos destinados a alimentación animal:

Por un lado, en el Reglamento (CE) nº 1881/2006, se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios destinados a alimentación humana, entre los cuales se incluye el deoxinivalenol (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido máximo de deoxinivalenol en maíz y productos derivados. Datos a partir del Reglamento (CE) nº 1881/2006.

DEOXINIVALENOL	Contenido máximo (mg/kg)
Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda	1,75
Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales, salvado y germen como producto final comercializado para el consumo humano directo, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.4.7, 2.4.8 y 2.4.9.	0,75
Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno	0,50
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,20
Fracciones de la molienda de maíz con un tamaño de partícula > 500 micras clasificadas con los códigos NC 1103 13 u 1103 20 40, y otros productos de la molienda del maíz con un tamaño de partícula >500 micras, no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 1904 10 10	0,75

Por otro lado, en la Recomendación 2006/576/CE de la Comisión de 17 de agosto de 2006, sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2, y fumonisinas en productos destinados a alimentación animal, se recogen valores orientativos de deoxinivalenol en este tipo de productos (Tabla 3).

Tabla 3. Valores orientativos de deoxinivalenol en productos destinados a alimentación animal. (Recomendación 2006/576/CE).

DEOXINIVALENOL	Valor orientativo en mg/kg (ppm) para piensos con un contenido de humedad del 12%
Materias primas para piensos:	
-Cereales y productos a base de cereales, con excepción de los subproductos de maíz.	8
-Subproductos de maíz	12
Piensos compuestos, con excepción de:	
-piensos compuestos para cerdos	5
-piensos compuestos para terneros (menores de cuatro meses), corderos, cabritos y perros	0,90
	2

En el año 2013 fue publicado por el Panel sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria de la EFSA un dictamen sobre los riesgos para la salud pública relacionados con un aumento del contenido máximo de deoxinivalenol en algunos productos alimenticios. El informe concluyó que un aumento del contenido máximo permitido de esta micotoxina en los alimentos, llevaría asociada una mayor exposición al peligro, multiplicándose por dos el porcentaje de consumidores que excedería la IDTMP de 1µg/kg p.c. definida por la JECFA. (EFSA CONTAM Panel, 2013).

A todo lo anterior se le suman los sistemas de gestión de alertas y crisis alimentarias por parte del sistema de alerta rápida RASFF (*Rapid Alert Sistem for Food and Feed*), que recoge y transmite todas las notificaciones derivadas de la presencia en altas cantidades, en este caso de deoxinivalenol, en alimentos y piensos. Dentro de este sistema encontramos un flujo constante de información entre sus miembros: Estados miembros a través de sus puntos de contacto nacional, EFSA, Comisión Europea y los países del Espacio Económico Europeo. En este sentido, en los últimos años el RASFF ha gestionado múltiples notificaciones en relación a elevadas cantidades de deoxinivalenol en piensos y alimentos, destacando los productos derivados del maíz (harinas, tortas etc.) como los más implicados.

No obstante, para cereales como el maíz se gestionaron 2 notificaciones (2015 y 2017) en los últimos cinco años. En el caso de la primera, se debió a la detección de 3,066 mg/kg de deoxinivalenol en granos de maíz procedentes de Austria. La segunda fue debida a maíz procedente de EEUU contaminado con 2,688 mg/kg (RASFF, 2019).

1.2.5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Por lo general, la determinación del contenido de deoxinivalenol en alimentos susceptibles se lleva a cabo bien por técnicas de cribado, como la técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*). Las primeras se caracterizan por un menor coste económico, así como por una mayor rapidez y sencillez a la hora de obtener resultados, mientras que el HPLC es una técnica más robusta que ofrece mayor exactitud pero que necesita de personal entrenado, de mayores tiempos de ensayo, y cuyo coste económico es superior. No obstante, las técnicas ELISA pueden presentar reactividad cruzada con otras micotoxinas, así como falsos positivos (Ran *et al.*, 2013; Lamenca, 2015).

Una de las técnicas semicuantitativa de cribado más utilizadas se basa en la **inmunocromatografía de flujo lateral** con lector colorimétrico. Las tiras reactivas incorporan anticuerpos monoclonales, los cuales poseen sensibilidad y selectividad a la hora de detectar y medir el contenido de deoxinivalenol tras la preparación de la muestra. La técnica **HPLC** requiere de una previa purificación del analito, la cual se lleva a cabo mediante columnas de inmunoafinidad. Éstas poseen una fase estacionaria (gel) con anticuerpos monoclonales específicos, cuyo fundamento se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, eliminándose el resto de analitos que puedan causar interferencia en el análisis posterior.

De forma reciente el uso de la cromatografía líquida adaptada a un detector de masas (**LC-MS**) se ha convertido en una de las técnicas más empleadas ya que ofrece una gran selectividad y sensibilidad en el análisis de deoxinivalenol (Serrano *et al.*, 2013). Por otro lado, la **cromatografía de gases** se configura como un método apropiado para la determinación y cuantificación de deoxinivalenol al presentar excelente sensibilidad, aunque su coste económico sea elevado y necesite de una etapa de limpieza (Ran *et al.*, 2013). En cambio, la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de diodos (HPLC-DAD) con columna de fase reversa C18 es la más utilizada actualmente (Yebra, 2015).

Otra de las técnicas analíticas utilizadas es la **TLC** (*Thin Layer Chromatography*) por ser simple y rápida. Sin embargo, se trata de un método cualitativo con menor sensibilidad que el HPLC (Ran *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cultivo de maíz en España representa el **15,8% sobre el total productivo** con 3,6 millones de toneladas y 326.492 ha cultivadas. Aragón es una de las comunidades autónomas con mayor producción de maíz en España, junto a Castilla y León y Extremadura (MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2017). Así, en el año 2017 se produjeron en Aragón 1,08 millones de toneladas y se destinaron 85.264 ha al cultivo de este cereal (Gobierno de Aragón, 2017).

Sin embargo un **porcentaje elevado de las cosechas de maíz** europeas, incluyendo las españolas, están contaminadas con DON: 71 % de muestras positivas en Biomin (2017). Tanto por sus efectos sobre la salud humana y animal, como por las importantes pérdidas económicas que provoca sobre la productividad agropecuaria a nivel nacional e internacional, es necesario poner especial atención en la vigilancia del contenido de DON en los alimentos susceptibles de estar contaminados por esta micotoxina. Es por ello que se plantea como objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado llevar a cabo una evaluación de las tasas de contaminación por deoxinivalenol en muestras de maíz mediante técnicas de cribado (inmunocromatografía de flujo lateral), y posterior confirmación por técnicas instrumentales (HPLC-DAD).

Para la consecución del objetivo general de este trabajo, se plantean una serie de objetivos parciales, detallados a continuación:

- Evaluación, mediante revisión bibliográfica, de la incidencia actual de deoxinivalenol en muestras de maíz.

- Investigación de las tasas de contaminación por deoxinivalenol en muestras de grano molido de maíz procedente de varias regiones geográficas mediante técnicas semicuantitativas de cribado (inmunocromatografía de flujo lateral), y por técnicas instrumentales (HPLC), así como comparación entre los resultados obtenidos con una y otra.

- Evaluación de los resultados obtenidos por ambas técnicas analíticas y comparación, mediante revisión bibliográfica, con otros resultados de analíticos y estudios sobre el contenido de deoxinivalenol en maíz.

3. METODOLOGÍA

La determinación del contenido de deoxinivalenol en las muestras se realizó mediante un test de cribado basado en la inmunocromatografía de flujo lateral. Para ello, una fracción de muestra previamente homogeneizada se sometió a un proceso de extracción, seguido de una etapa de filtración y dilución del extracto. Finalmente, la determinación de las tasas de deoxinivalenol se llevó a cabo en un lector de reflectancia mediante determinación colorimétrica.

Además, aquellas muestras con un contenido superior a 1,5 mg/kg de deoxinivalenol, fueron confirmadas mediante cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, se llevó a cabo una extracción mediante agitación con disolventes acuosos y posterior filtración del extracto que se purificó mediante el uso de columnas de inmunoafinidad. A continuación, se procedió a la detección y cuantificación de la micotoxina por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de diodos (HPLC-DAD).

3.1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se analizaron un total de 59 muestras de grano de maíz cosechadas en el año 2018 y procedentes de varias localizaciones de la geografía aragonesa: Zaragoza (n= 47), Sariñena (n= 3), Grañén (n= 3), Candasnos (n= 3) y Binéfar (n= 3).

Las muestras de maíz procedentes de Zaragoza fueron cosechadas el 26 de octubre, mientras que en el resto de localizaciones se recolectaron en tres fechas de cosecha diferentes: 26 de octubre, 5 y 19 de noviembre.

En cada localización, y con el objetivo de realizar un muestreo representativo, se dividieron los campos en microparcels, recogándose un total de 28 mazorcas de maíz de forma aleatoria en cada microparcela que es lo que conforma una muestra global.

Una vez recogidas las muestras en bolsas de polietileno, éstas fueron sometidas a un proceso de limpieza y desgranado en las instalaciones del Parque Científico Tecnológico Aula Dei, con posterior secado en estufa Memmert (Schwabach, Alemania) a 60 °C de temperatura durante 10-15 horas hasta disminuir la humedad del grano desde un 20 % a un 12 %. Este parámetro se midió mediante un equipo NIR (*Near Infrared Analyzer*, FOSS, Barcelona, España). Tras el proceso de secado, los

granos de maíz secos fueron molidos en un molino de cereales (IKA Labortechnik M20, Staufen, Alemania) y posteriormente almacenados en congelación para evitar la proliferación de mohos micotoxigénicos.

3.2. TÉCNICA SEMICUANTITATIVA DE CRIBADO

La técnica de cribado de inmunocromatografía de flujo lateral se llevó a cabo mediante el kit Vertu (Waters Corporation, Milford, EE.UU), que incluye todos los materiales necesarios para llevar a cabo el análisis. Además, dispone de un lector para llevar a cabo la cuantificación de DON (Waters Corporation, Milford, EE.UU). Las tiras reactivas del kit Vertu (DON-V strip) incorporan anticuerpos monoclonales, los cuales poseen sensibilidad y selectividad a la hora de detectar y medir el contenido de deoxinivalenol. Una vez preparada la muestra, la técnica permite determinar contenidos de deoxinivalenol en un rango entre 0,2 mg/kg y 10 mg/kg.

El procedimiento de análisis se inicia con la puesta en marcha del lector escaneando el código de barras procedente del kit de análisis. Tras comprobar la aparición del número de lote en el lector se procedió a la preparación y extracción de las muestras. Para ello se pesaron cinco gramos de maíz previamente molido y homogenizado, en un tubo de extracción mediante el uso de una balanza analítica (Sartorius, Gaithersburg, Alemania). Una vez pesada la muestra, se añadieron 20 mL de agua milli-Q (Millipore, Madrid, España) y se agitó en un rotatubos uniTexer (LLG Labware, Meckenheim, Alemania) durante dos minutos a máxima velocidad. Posteriormente se procedió a su filtración en un tubo Falcon con papel de filtro (incluido en el kit).

Seguidamente, se tomó un volumen de 100 μ L del extracto filtrado y se transfirió a un tubo eppendorf en el que se había adicionado previamente a 1 mL de agua milli-Q. Seguidamente se transfirió un volumen de 100 μ L de la muestra diluida y homogenizada a otro tubo eppendorf añadiendo a continuación 100 μ L de solución buffer DON-V diluent (Waters Corporation, Milford, EE.UU). Una vez homogenizada la muestra se adicionaron 100 μ l de muestra con buffer a la tira reactiva, que se dejó incubar durante tres minutos a temperatura ambiente.

Por último, la tira reactiva fue insertada en el lector para su lectura. En el caso de que el lector presentase lecturas fuera de rango (más de 10 mg/kg), se procedió a realizar una dilución de la muestra para una nueva lectura. En estas situaciones, se

transfirieron 100 μ L de la muestra diluida sin buffer a un tubo eppendorf y se añadieron 100 μ L de agua mili-Q y 200 μ L de buffer. Seguidamente se tomaron 100 μ L y se transfirieron a una nueva tira reactiva que posteriormente se dejó incubar durante tres minutos y se procedió a la lectura en el equipo. Para obtener el contenido de deoxinivalenol debido a la dilución realizada a la muestra, el resultado final obtenido se multiplica por dos.

Previamente al análisis de las muestras de maíz se realizó la determinación del contenido de deoxinivalenol de una muestra de material de referencia de maíz contaminado $1,077 \pm 0,073$ mg/kg de DON (Biopure Romer Labs, Getzersdorf, Austria) siguiendo los pasos anteriormente descritos. Este material se conservó, al igual que las muestras de maíz, bajo condiciones de congelación (-20 °C).

Todas aquellas muestras que superaron el límite de cuantificación de la técnica (0,20 mg/kg) se consideraron positivas.

3.3. TÉCNICA HPLC-DAD

El procedimiento para la determinación de deoxinivalenol en muestras de maíz consistió en el pesaje de 5 gramos de muestra molida homogeneizada en un tubo Falcon. Posteriormente, se añadieron 20 mL de agua mili-Q (Millipore, Madrid, España) y se mezclaron en un agitador durante 3 minutos. Seguidamente, el contenido se filtró con papel Whatman n°4 (GE Healthcare, Chicago, EE.UU). Una vez obtenido el filtrado, la columna de inmunoafinidad (Waters Corporation, Milford, EE.UU) se acondicionó haciendo pasar el buffer DON-V diluent (Waters Corporation, Milford, EE.UU) a través de la misma. Posteriormente, se pasó 1 mL de agua milli-Q a través de la misma, seguido de 1 mL del extracto filtrado con un flujo de 1 gota/segundo. A continuación, se lavó la columna con 5 mL de agua milli-Q a un flujo de 1 gota/segundo haciendo pasar aire posteriormente para secar la columna.

Tras comprobar la ausencia de restos de agua, se colocó un vial ámbar en la parte inferior de la columna y se eluyó el deoxinivalenol con 2 mL de metanol 99,9 % (Fisher Chemical, Loughborough, Reino Unido) a una velocidad de 1 gota/segundo.

Por último, el eluato se evaporó (Stuart SBH130D/3, Staffordshire, Reino Unido) hasta sequedad por corriente de N₂ a 50 °C y se reconstituyó el extracto seco en 500 μ L de fase móvil para la inyección de 100 μ L en el equipo HPLC-DAD.

La elaboración de la fase móvil se llevó a cabo a partir de metanol, acetonitrilo (Fisher Chemical, Loughborough, Reino Unido), y agua milli-Q en proporción 5:5:90 respectivamente. Esta disolución tiene que estar debidamente filtrada y desgasificada. Para ello se utilizó un sistema de filtración a vacío compuesto por una bomba de vacío XX5522050 (Millipore, Madrid, España) de 0 a 100 kPa, un matraz Erlenmeyer de 1 L, porta-filtros con pinza y matraz Kitasato de 1 L (Áfora, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y para desgasificar, se usó el ultrasonidos Bransonic Ultrasonic cleaner (Branson 3510EMT, Darmstadt, Alemania).

Previamente a la inyección de las muestras se elaboraron cuatro patrones de deoxinivalenol a distintas concentraciones: 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL y 5 µg/mL diluidos en acetonitrilo, con el propósito de obtener una recta de calibrado para calcular por interpolación la concentración de DON en las muestras problema. Para ello, se partió de un patrón certificado de referencia de 100 µg/mL diluido en acetonitrilo (Biopure Romer Labs, Getzersdorf, Austria), a partir del cual se realizó una disolución intermedia de 50 µg/mL tomando 500 µL del patrón certificado con 500 µL de acetonitrilo como diluyente. Una vez elaboradas las disoluciones patrón, éstas se evaporaron e inyectaron del mismo modo que los eluatos reconstituidos correspondientes a las muestras problema.

La determinación de los niveles de DON se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un modelo Agilent HP 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU) equipado con un módulo de bomba o sistema de bombeo binario para la fase móvil que discurre por una columna cromatográfica de fase reversa ACE 5 octadecil RP C18 de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula (Advanced Chromatography Technologies LTD, Aberdeen, Reino Unido).

Tanto las muestras como las disoluciones patrón se inyectaron en un inyector manual provisto de un loop de un volumen de inyección de 100 µL, y detector de red de diodos (DAD) fijado a una longitud de onda de 220 nm. Para la determinación y cuantificación de las micotoxinas se contó con una unidad de control del equipo y tratamiento de datos con el software Chemstation 3D.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cálculo del contenido de deoxinivalenol en las muestras confirmadas por HPLC-DAD, se llevó a cabo mediante el método del patrón externo descrito en el anterior apartado, dando como resultado la siguiente recta de calibrado (Figura 5).

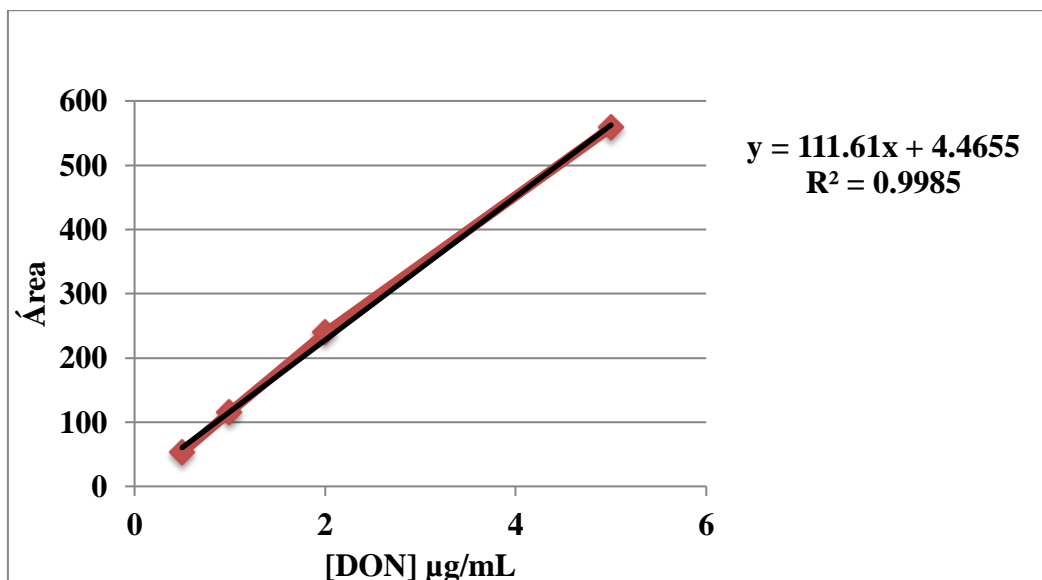


Figura 5. Recta de calibrado elaborada a partir de cuatro patrones de DON a las concentraciones de: 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL y 5 µg/mL.

La linealidad se verificó al obtener un valor R^2 de 0,9985 en la recta de calibrado elaborada. Los resultados de las muestras confirmadas se expresan en mg/kg tras aplicar un factor de multiplicación de 2 para esta técnica.

En paralelo, se identificó el deoxinivalenol a un tiempo de retención entre los 9,5 y 9,6 minutos, tal y como se muestra en la Figura 6.

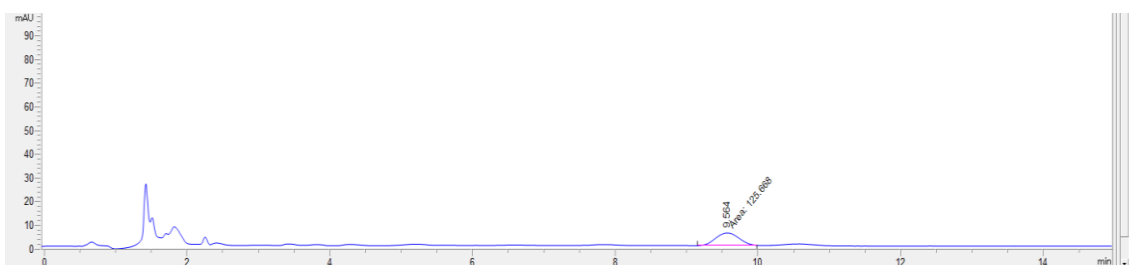


Figura 6. Cromatograma procedente del análisis del contenido de DON en una muestra de maíz por HPLC.

Por otro lado, con el propósito de dar validez a los resultados por la técnica de cribado, se confirmó que el resultado correspondiente al CRM (*Certificaded Reference Material*), cumplía el porcentaje de recuperación contemplado por la legislación al mismo nivel de contaminación.

El Reglamento (CE) n° 401/2006 de la Comisión establece criterios de funcionamiento para los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Conforme a este reglamento, los métodos de análisis de DON en muestras de alimentos deben de cumplir los criterios de precisión (reproducibilidad y repetibilidad) y exactitud (Tabla 4).

Tabla 4. Criterios de funcionamiento para DON (Reglamento (CE) n° 401/2006 de la Comisión.

Contenido (µg/kg)	Deoxinivalenol		
	RSDr %	RSDR %	Recuperación %
>500	≤20	≤40	De 70 a 120

La determinación del contenido de deoxinivalenol del material de referencia se llevó a cabo con cada lote de muestras analizadas. Los resultados obtenidos en las 7 réplicas analizadas mostraron un rango de porcentajes de recuperación entre un 87,28 % y un 130,92 %. Tan sólo un porcentaje de recuperación se encontró fuera del rango legislado para contenidos superiores a 500 µg/kg, por lo que la medida se dio por inválida y se procedió a su repetición de forma previa al análisis de las muestras.

Del conjunto de resultados se desprende un resultado medio de 1,10 mg/kg. Al realizarse la lectura del material de referencia certificado en diferentes fechas de análisis. Asimismo, se calculó el coeficiente de variación en condiciones de reproducibilidad expresado en porcentaje, el cual arrojó un valor de 14,54 %, cumpliendo con lo establecido en los criterios de funcionamiento para el deoxinivalenol establecidos en la legislación.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos tras la determinación del contenido de deoxinivalenol en muestras de grano de maíz molido por la técnica semicuantitativa de cribado.

Tabla 5. Resultados determinación [DON] por técnica semicuantitativa de cribado basada en inmunocromatografía de flujo lateral de muestras de maíz secado y molido.

Procedencia	Codif.	DON (mg/kg)	Procedencia	Codif.	DON (mg/kg)
Candasnos	M1	2,90	Zaragoza	M31	< LC
Candasnos	M2	1,74	Zaragoza	M32	0,58
Candasnos	M3	7,22	Zaragoza	M33	0,62
Sariñena	M4	1,05	Zaragoza	M34	1,40
Sariñena	M5	1,92	Zaragoza	M35	< LC
Sariñena	M6	3,38	Zaragoza	M36	< LC
Grañén	M7	0,46	Zaragoza	M37	< LC
Grañén	M8	0,67	Zaragoza	M38	< LC
Grañén	M9	1,46	Zaragoza	M39	0,31
Binéfar	M10	0,25	Zaragoza	M40	< LC
Binéfar	M11	0,52	Zaragoza	M41	0,56
Binéfar	M12	1,31	Zaragoza	M42	< LC
Zaragoza	M13	< LC	Zaragoza	M43	< LC
Zaragoza	M14	0,25	Zaragoza	M44	0,84
Zaragoza	M15	< LC	Zaragoza	M45	0,28
Zaragoza	M16	< LC	Zaragoza	M46	0,6
Zaragoza	M17	0,21	Zaragoza	M47	4,91
Zaragoza	M18	< LC	Zaragoza	M48	0,83
Zaragoza	M19	< LC	Zaragoza	M49	1,22
Zaragoza	M20	0,39	Zaragoza	M50	1,83
Zaragoza	M21	0,26	Zaragoza	M51	0,73
Zaragoza	M22	0,66	Zaragoza	M52	1,40
Zaragoza	M23	< LC	Zaragoza	M53	4,48
Zaragoza	M24	0,35	Zaragoza	M54	2,92
Zaragoza	M25	< LC	Zaragoza	M55	2,58
Zaragoza	M26	< LC	Zaragoza	M56	< LC
Zaragoza	M27	< LC	Zaragoza	M57	1,66
Zaragoza	M28	< LC	Zaragoza	M58	2,20
Zaragoza	M29	< LC	Zaragoza	M59	< LC
Zaragoza	M30	< LC			

Mx: Número de muestra. < LC: Lectura por debajo del límite de cuantificación de la técnica de cribado (0,2 mg/kg).

El resultado global, con los principales datos estadísticos de esta determinación por la técnica semicuantitativa de cribado, se recoge en la siguiente tabla (Tabla 6):

Tabla 6. Resultados globales procedentes de la determinación de DON por técnica semicuantitativa de cribado.

n	n positivas	% positivas	Rango de concentración(mg/kg) en muestras positivas	Promedio (mg/kg) ± σ
59	37	62,71	0,21-7,22	1,48 ±1,52

El amplio rango de concentración hallado en los análisis, así como la elevada desviación estándar del contenido promedio de DON calculado en las muestras positivas, se asocian con la presencia de un bajo número de muestras con elevada contaminación pertenecientes a las fechas de cosecha más tardías, destacando Candasnos como la localización con mayores tasas de contaminación, frente a un elevado número de muestras con niveles que por lo general fueron bajos, y cercanos al límite de cuantificación de la técnica .

Todas las muestras procedentes de Candasnos, Sariñena, Grañén o Binéfar presentaron lecturas positivas, siendo Zaragoza la localización que concentró de forma exclusiva las lecturas por debajo del límite de cuantificación. Esto puede asociarse a que las muestras procedentes de Zaragoza fueron de primera cosecha y con una única fecha de cosecha, es decir, no se demoró la recogida de las mismas en el campo. A diferencia de las muestras procedentes de Candasnos y Sariñena, en las que dentro de la misma campaña se cultivó cebada de forma previa (dejándose residuos en el campo procedentes de estos cultivos) y se recogieron en tres fechas diferentes. No obstante, en Zaragoza también se detectaron muestras con contenidos destacables de DON, destacando las muestras: M47, M53, M54, M55 y M58, con contenidos superiores a 2 mg/kg.

El resultado medio obtenido por esta técnica de cribado, así como el porcentaje de muestras positivas, son similares a los obtenidos en otros análisis como el de López (2017) en el que se analizaron 88 muestras de maíz aragonés, catalán y navarro por la misma técnica de cribado, obteniéndose un contenido promedio de 1,21 mg/kg de deoxinivalenol y un porcentaje de muestras positivas del 55,7 %.

En cambio, otros autores han obtenido valores promedio y porcentajes de muestras positivas todavía más elevados, destacando los 2,15 mg/kg y el 85 % de muestras positivas hallados en Croacia en un análisis de zearalenona y deoxinivalenol en 40 muestras de maíz por la técnica TLC (Pleadin *et al.*, 2012).

10 de las 59 muestras analizadas (17 % del total) superaron el contenido máximo de 1,75 mg/kg de deoxinivalenol en maíz no elaborado destinado a alimentación humana si bien el contenido promedio de DON de las muestras positivas está por debajo de dicho valor, ninguna de las muestras analizadas por esta técnica superó el valor recomendado para materias primas destinadas a elaboración de piensos de 12 mg/kg para los subproductos del maíz.

Todas aquellas muestras que superaron el contenido máximo establecido, o cuya lectura fue superior a 1,5 mg/kg, fueron confirmadas por la técnica HPLC-DAD, siendo analizadas un total de 12 muestras (20,34 %).

Tabla 7. Resultados de la confirmación [DON] por técnica HPLC-DAD

CODIFICACIÓN	[DON] HPLC (mg/kg)	CODIFICACIÓN	[DON] HPLC (mg/kg)
M1	1,46	M50	1,26
M2	2,22	M53	4,66
M3	6,04	M54	2,36
M5	2,17	M55	2,37
M6	3,16	M57	1,60
M47	3,46	M58	1,44

Una vez fueron confirmadas por HPLC, el porcentaje de muestras que superó el contenido máximo se redujo a 8 muestras (13,6%), no superando ninguna de ellas el valor de 12 mg/kg recomendado por la legislación para maíz destinado a alimentación animal.

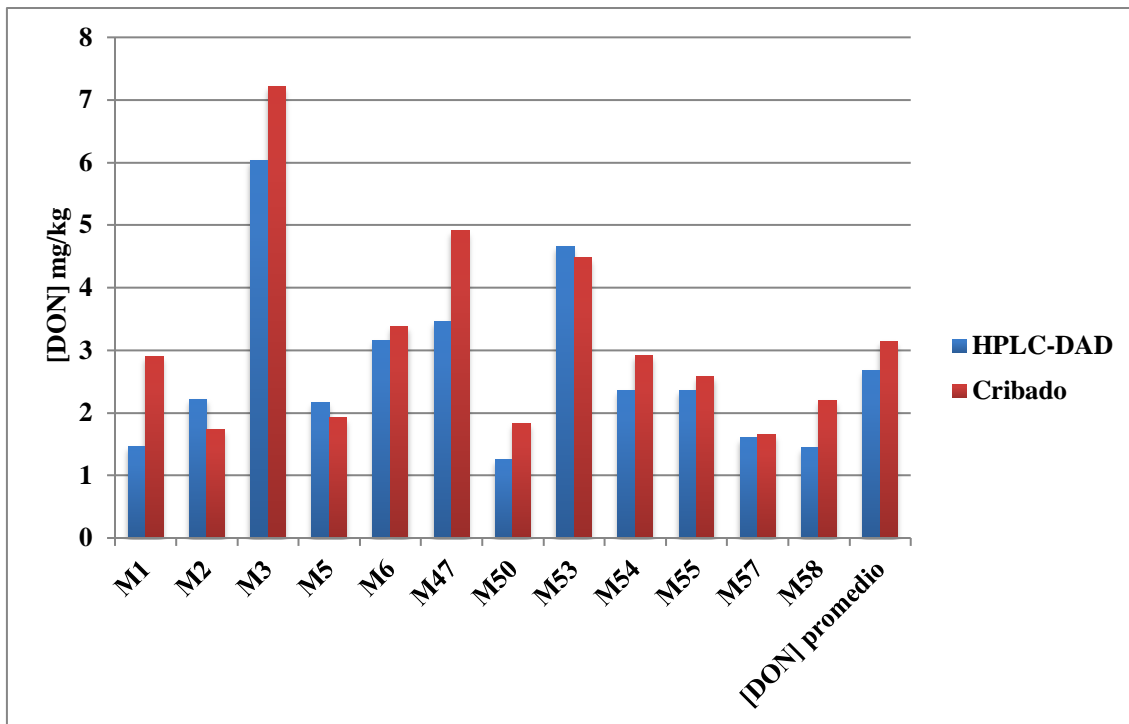


Figura 7. Comparativa del contenido de DON detectado en muestras de maíz analizadas por inmunocromatografía de flujo lateral (cribado) y confirmadas por HPLC-DAD.

Como se puede observar, por lo general y salvo excepciones (ej. M1, M47), los resultados mediante una técnica y otra no presentan grandes variaciones entre sí. Viendo el contenido de deoxinivalenol promedio obtenido por ambas técnicas se puede hablar de cierta sobreestimación en la técnica de cribado frente al HPLC-DAD, con un contenido promedio de 3,145 mg/kg de deoxinivalenol en las muestras de cribado seleccionadas para posterior confirmación, frente a los 2,683 mg/kg obtenidos en el HPLC-DAD.

Una vez confirmadas por HPLC-DAD, el contenido promedio global de las muestras (M1-M59) disminuye hasta 1,34 mg/kg, así como el porcentaje de muestras superiores al contenido máximo (13,6 %).

Tabla 8. Contenido medio de DON en muestras de maíz recopilados de la bibliografía científica.

Matriz analizada	n	% positivos	DON promedio (mg/kg)	País de origen	Referencia
Maíz en grano	55	98,2	0,60	China	Wu <i>et al.</i> , 2016
Maíz en grano	91	100	1,02	China	Wu <i>et al.</i> , 2016
Maíz en grano	136	48,5	0,24	UE-27	EFSA, 2013
Maíz para pienso	137	29,3	1,11	UE-27	EFSA, 2013
Maíz en grano	76	42,1	0,36	Vovjodina, Serbia	Jajić <i>et al.</i> , (2007)
Maíz en grano	60	76,7	0,12	Golestán, Moqan, Irán	Karami, Mirabolfathy y Aliakbari, 2010
Maíz en grano	57	58	0,18	Paraná, Brasil	Oliveira <i>et al.</i> , 2016
Maíz en grano	40	22,5	0,14	Santa Catarina, Brasil	Oliveira <i>et al.</i> , 2016
Maíz en grano	51	56,8	0,13	Río Grande del Sur, Brasil	Oliveira <i>et al.</i> , 2016
Maíz en grano	71	75	1,4	Pennsylvania, EE.UU.	Mansfield, De Wolf y Kuldau, 2005

En relación a la recopilación de estudios de la tabla superior, únicamente se encuentran similitudes con el contenido promedio hallado por Mansfield, De Wolf y Kuldau (2005) en maíz estadounidense de 1,4 mg/kg.

La falta de similitud de los resultados obtenidos en este análisis con los referenciados en la tabla superior puede relacionarse con la diferencia de zonas geográficas, así como por la cosecha anual de la que procede el maíz analizado debido a las diferencias interanuales, ya recogidas en el análisis de Biomin.

4.1. INFLUENCIA DE LA FECHA DE COSECHA EN EL CONTENIDO DE DON

Como se comenta anteriormente, en Candasnos, Sariñena, Binéfar y Grañén se tomaron las muestras en diferentes fechas, analizándose una muestra de cada localización en cada una de las tres fechas de cosecha para observar si éstas tienen

influencia en el contenido de deoxinivalenol en el maíz, obteniéndose los siguientes resultados (Figura 8).

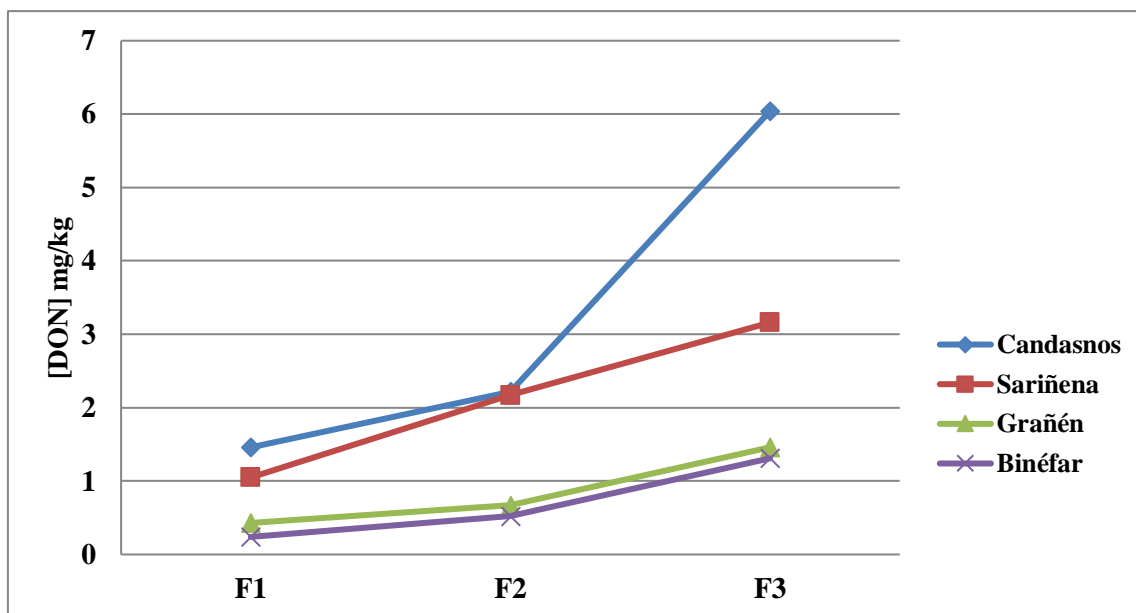


Figura 8. Evolución del contenido de DON en muestras recogidas en diferentes fechas de cosecha (F1: 26 de octubre, F2 5 de noviembre y F3: 19 de noviembre) y procedentes de Candasnos, Sariñena, Grañén y Binéfar.

Como resultado del análisis de estas muestras, se presenta una clara tendencia al alza conforme avanza la fecha de toma de la muestra en la totalidad de las localizaciones, destacando las muestras procedentes de Candasnos, cuyo resultado en la F3 fue confirmado por HPLC obteniéndose una lectura de 6,04 mg/kg frente a 7,22 mg/kg de la lectura obtenida en la técnica semicuantitativa de cribado. Esta tendencia al alza confirma lo que ya han demostrado en otros análisis de maíz como Arvalis (2006).

Además, es en el periodo de tiempo comprendido entre F2 y F3 cuando el contenido de deoxinivalenol aumenta de forma más manifiesta, volviendo a destacar Candasnos con un contenido de 2,22 mg/kg de deoxinivalenol en la muestra recogida en la F2 y un contenido de 6,04 mg/kg en la muestra recogida en la F3.

Las diferencias en el contenido de deoxinivalenol entre localizaciones quedan patentes entre dos grupos, por un lado las muestras de Grañén y Binéfar, y por otro las de Candasnos y Sariñena. Estas últimas procedían de campos en los que había sido cultivado previamente cebada, otro de los cereales hospedadores de las especies micotoxigénicas del G° *Fusarium*, siendo por tanto el maíz de segunda cosecha. La presencia de residuos del cultivo anterior en el suelo puede asociarse con un mayor contenido de deoxinivalenol al quedar inóculo de *Fusarium* en ellos.

Sin embargo, la limitada cantidad de muestras analizadas (n=12) en total, y (n=3) para cada localización, no permite realizar conclusiones objetivas y certeras en cuanto a la influencia de la fecha de recolección, unida a la presencia de residuos de cebada en los cultivos de Candasnos y Sariñena. Es por ello que únicamente cabe sospechar que el tiempo de recolección posee influencia sobre el contenido de deoxinivalenol en los granos de maíz y que el cultivo de maíz en segunda cosecha también está relacionado con un mayor contenido de deoxinivalenol.

5. CONCLUSIONES

1. El test de cribado basado en inmunocromatografía de flujo lateral en formato de tiras, ha permitido obtener resultados analíticos de DON en las muestras de maíz de manera rápida, fiable y económica, confirmándose únicamente por HPLC-DAD un 20,34 % de muestras (n=12) .

2. El 62,71% de las muestras de maíz analizadas fueron positivas a deoxinivalenol, con un contenido promedio de 1,48 mg/kg, similar al obtenido por otros estudios en maíz español. Además, el 13,60 % (n=8) de las muestras de maíz presentaron una tasa de contaminación superior al contenido máximo establecido en la legislación para alimentación humana (1,75 mg/kg), mientras que ninguna superó los valores recomendados para alimentación animal (12 mg/kg).

3. Las tasas de contaminación más altas correspondieron con las muestras recolectadas en la fecha más avanzada de recolección y en las procedentes de las localidades de Candasnos y Sariñena, zonas en las que culturalmente se realizan segundas cosechas después de cereales como el trigo y/o la cebada, y corresponden a un clima cálido-árido, pudiendo haber sufrido estrés hídrico en épocas críticas como la floración.

4. Si bien la bibliografía científica consultada acerca de las tasas de contaminación de deoxinivalenol en maíz a nivel español y europeo muestra que, por lo general, no se superan los contenidos máximos establecidos en la legislación, los resultados obtenidos en este trabajo, a pesar del limitado número de muestras analizadas, y las notificaciones surgidas en el marco de los sistemas de gestión de alertas alimentarias evidencian la necesidad de control en productos y piensos susceptibles de contener esta micotoxina.

6. CONCLUSIONS

- 1.** Screening test based on lateral flow immunochromatography on strip format has allowed to obtain analytical results for DON in maize samples quickly, reliably and economically, being confirmed only by HPLC-DAD a 20.34 % of samples (n=12).
- 2.** 62.71 % of the aragonese maize samples analyzed were positive for deoxynivalenol, with an average content of 1.48 mg/kg, similar to the one obtained in another analysis of Spanish maize. In addition, 13.60 % (n=8) of the samples presented a contamination rate above the maximum content established in legislation for human consumption (1.75 mg/kg), whilst no sample overcame the recommended values for animal feeding (12 mg/kg).
- 3.** Highest contamination rates were found in samples collected at the furthest harvest date coming from Candasnos and Sariñena, being locations where culturally second harvest takes place after cereals like wheat or barley, and correspond to a warm-arid climate, may having suffered water stress in critical periods such as flowering.
- 4.** Even though reviewed scientific bibliography about deoxynivalenol contamination rates in maize and derivatives in Spain and Europe indicates that maximum content from legislation is not generally overcome, notifications released by food alert management systems in relation to deoxynivalenol in maize and maize products, make necessary continuous control of food and feed susceptible for this mycotoxin.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización del Trabajo Fin de Grado es toda una experiencia enriquecedora para concluir nuestra formación como alumnos del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, dado que combina conocimientos teóricos como la búsqueda bibliográfica y selección de la información, con conocimientos prácticos de manejo en laboratorio.

La realización de análisis en laboratorio complementa nuestra formación previa en esta materia, y a la vez recupera los conocimientos previos sobre técnicas analíticas, material analítico y buenas prácticas de laboratorio.

Por otro lado, la gestión de la información, con su correspondiente búsqueda a través de diversas fuentes y la recogida de datos es uno de los puntos que más se trabajan en la realización del Trabajo Fin de Grado. Asimismo, el manejo de las TICs complementa esta competencia, haciéndola todavía más enriquecedora.

El Trabajo Fin de Grado supone todo un reto previo a la finalización del Grado y obtención del título, y si bien parece un reto difícil de alcanzar, el esfuerzo y el trabajo constante nos llevan a alcanzar la meta deseada.

Además, a nivel personal, el campo trabajado en este Trabajo Fin de Grado me resulta interesante debido a la continuidad de este campo en mi formación futura como Ingeniero Agroalimentario y del Medio Rural.

8. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA). (2012). *Mapa de peligros alimentarios. Deoxinivalenol*. Disponible en: https://mapaperills.uab.cat/pdf/perills/263_Quimmico-Deoxinivalenol.pdf [Consultado 20-2-2019].

Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2015). *Deoxinivalenol*. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/DON_ficha_JUL15.pdf. [Consultado 21-02-2019].

Ariño, A., Herrera, M., Giménez, I., Lorán, S., Herrera, A., Carramiñana, J. J., Anadón, R., de Diego, A., Adiego, E. y Bailly, J. D. (2015). “Manual para el desarrollo de buenas prácticas que prevengan la contaminación de maíz y trigo con las micotoxinas aflatoxinas y deoxinivalenol”. Disponible en: <http://www.mycoprev.info/wp-content/uploads/2015/12/Manual-buenas-practicas.pdf>. [Consultado 03-01-2019].

Arroyo, N., Huertas, J. F., Gámiz, L. y García, A. M. (2014). “Control de micotoxinas en alimentos”. *Boletín Graseqa*, 7, pp. 16-31. Disponible en: https://www.ugr.es/~fqm302/media/pdf/BOLETIN%20GRASEQA_7_2014.pdf. [Consultado 06-06-2019].

Arvalis, *Institut du Végétal*. (2006). *Impacts des fusarioses des épis du maïs sur la qualité sanitaire: Quels sont les facteurs qui influent le développement des fusariotoxines?* Disponible en: https://www.arvalis-infos.fr/_plugins/WMS_BO_Gallery/page/getElementStream.jspz?id=22332&prop=file. [Consultado 04-06-2019].

Asociación de Fabricantes de Harinas y Sémolas de España (AFHSE). (2015). *Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/textomicotoxinas18122015_completorev_nipo_tcm30-57870.pdf. [Consultado 14-06-2019].

Biomin. (2018). *BIOMIN World Mycotoxin Survey 2018, Annual Report N° 15*. Disponible en: <https://www.biomin.net/en/blog-posts/2018-biomin-mycotoxin-survey-results/> [Consultado 25-05-2019].

Biomin. (2017). *BIOMIN World Mycotoxin Survey 2017, Annual Report N° 14*. Disponible en: <https://www.biomin.net/en/blog-posts/2017-biomin-mycotoxin-survey-results/> [Consultado 25-05-2019].

Biomin. (2016). *BIOMIN World Mycotoxin Survey 2016, Annual Report N° 13*. Disponible en: <https://www.biomin.net/en/blog-posts/2016-biomin-mycotoxin-survey-results/> [Consultado 25-05-2019].

Biomin. (2015). Fewer *Fusarium* toxins in Europe this year? Not necessarily. Disponible en: <https://www.biomin.net/en/blog-posts/fewer-fusarium-toxins-in-europe-this-year-not-necessarily/>. [Consultado 08-09-2019].

Biomin. (2014). *Fusarium* toxins challenge corn (maize) harvest 2014. Disponible en: <https://www.biomin.net/fr/blog-posts/fusarium-toxins-challenge-corn-maize-harvest-2014/> [Consultado 08-09-2019].

Biomin. (2013). *BIOMIN World Mycotoxin Survey 2013, Annual Report N° 10*. Disponible en: https://www.biomin.net/uploads/tx_news/MAG_SciSol_Special_MTX_EN_0414.pdf [Consultado 08-09-2019].

Blandino, M., Pilati, A., Reyneri, A. y Scudellari, D. (2010). "Effect of maize crop residue density on *Fusarium* head blight on deoxynivalenol contamination of common wheat grains. *Cereal Research Communication*, 38(4), pp. 550-559. DOI: 10.1556/CRC.38.2010.4.12.

Caballero, M. (2016). "Las micotoxinas y sus interacciones. Obstáculos en el camino hacia la evaluación del riesgo". *nutriNews*. pp. 82-88. Disponible en: <https://docplayer.es/50203950-En-terminos-generales-la-interacciones-las-micotoxinas-y-sus-obstaculos-en-el-camino-hacia-la-evaluacion-del-riesgo.html>. [Consultado 28-5-2019].

Castañeda Sánchez, R., Chirivella Martorell, J. y Carbonell Baldoví, E. (2012). "Neutralización de micotoxinas por sustancias adsorbentes". *NEREIS. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 4, pp. 77-88. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3929563> [Consultado 23-02-2019].

Chakraborty, S. y Newton, A. C. (2011). "Climate change, plant diseases and food security: an overview". *Plant Pathology*, 60, pp. 2-14. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x.

Champeil, A., Doré, T. y Fourbet., J. F. (2004). "Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains". *Plant Science*, 166(6), pp.1389-1415. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.02.004.

Codex Alimentarius. (2003). *Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas*. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXC%2B51-2003%252FCXC_051s.pdf. [Consultado 13-6-2019].

Consejo Internacional de Cereales (2019). Consejo Internacional de Cereales. Disponible en: <https://www.igc.int/es/markets/marketinfo-sd.aspx>. [Consultado: 06-06-2019].

Cruz Varona, A. (2016). *Control de especies de Fusarium productoras de fumonisinas: factores ecofisiológicos y cambio climático*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

D'Mello, J. P. F. y Macdonald, A. M. C. (1997). "Mycotoxins". *Animal Feed Science Technology*, 69, pp. 155-166. DOI: 10.1016/S0377-8401(97)81630-6.

European Food Safety Authority (EFSA). (2013). "Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure". *The EFSA Journal*, 11 (10), pp. 3379-3435. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3379.

EFSA CONTAM Panel (*EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain*). (2017). "Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed". *The EFSA Journal*, 15(9), pp. 4718-5063. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4718.

EFSA CONTAM Panel (*EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain*). (2013). "Statement on the risks for public health related to a possible increase of the maximum level of deoxynivalenol for certain semi-processed cereal products". *The EFSA Journal*, 11(12), pp. 3490-3546. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3490.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/es/>. [Consultado 21-04-2019].

Forsell, J. H., Jensen, R., Tai, J. H., Witt, M., Lin, W. S. y Pestka, J. J. (1987). "Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxina) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F mouse". *Food and Chemical Toxicology*, 25(2), pp. 155-162. DOI: 10.1016/0278-6915(87)90149-9.

Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (ELIKA). (2013). *Ficha deoxynivalenol*. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/21.Deoxynivalenol.pdf>. [Consultado 12-01-2019].

Gobierno de Aragón. (2017). *Superficies, producciones y destinos de la producción agraria. Datos 2017*. Disponible en: https://www.aragon.es/documents/20127/674325/1T_2017.zip/f81607a2-d207-47be-b571-b844af7d5b59. [Consultado 10-03-2019].

Gómez Ayala, A. E. (2017). “Alimentos y micotoxinas. Implicaciones en la seguridad alimentaria”. *Farmacia Profesional*, 21(8), pp. 49-53. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13109791>. [Consultado 03-12-2018].

Hernández Agoiz, S. (2014). *Nuevos inmunosensores magnéticos de transducción espectrofotométrica y electroquímica para la determinación de deoxinivalenol en cereales*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Huff, W. E., Kubena, L. F., Harvey, R. B., Hagler, W. M., Swanson, S. P., Phillips, T. D. y Creger, C. R. (1986). “Individual and Combined Effects of Aflatoxin and Deoxynivalenol (DON, Vomitoxin) in Broiler Chickens. *Poultry Science*, 65(7), pp. 1291-1298. DOI:10.3382/ps.0651291.

Huff, W. E., Doerr, J. A., Hamilton, P. B. y Vesander, R. F. (1981). “Acute toxicity of vomitoxina (deoxynivalenol) in broiler chickens. *Poultry Science*, 60, pp. 1412-1414. DOI: 10.3382/ps.0601412.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). *Agents Classified by the IARC Monographs*. Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/ClassificationsAlphaOrder.pdf> [Consultado 12-01-2019].

Jajić, M., Abramović, F., Jurić, B. y Krstović, Z. (2007). “Presence of deoxynivalenol in maize of Vovjodina”. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 113, pp. 135-142. DOI: 10.2298/ZMSPN0713135J.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).(2011).“Safety evaluation of certain contaminants in food, deoxynivalenol / prepared by the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)” .Roma. Disponible en: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=2947>. [Consultado 23-03-2019].

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).(2001).“Evaluation of certain mycotoxins in food/ fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)”. Génova. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42448/WHO_TRS_906.pdf?sequence=1. [Consultado 23-03-2019].

Karami Osboo, R., Mirabolghaty, M. y Aliakbari, F. (2010). "Natural Deoxynivalenol Contamination of Corn Produced in Golestan and Moqan Areas in Iran". *Journal of Agriculture Science and Technology*, 12, pp. 233-239. Disponible en: <http://jast.modares.ac.ir/article-23-1426-en.pdf> [Consultado 03-09-2019].

Kos, J., Hajnal, E. J., Šarić, B., Jovanov, P., Nedeljković, N., Milovanović, I. y Krulj, J. (2017). "The influence of climate conditions on the occurrence of deoxinivalenol in maize harvested in Serbia during 2013-2015". *Food Control*, 73, pp. 734-740. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.09.022.

Kubena, L. F., Huff, W. E., Harvey, R. B., Phillips, T. D. y Rottinghaus, G. E. (1989). "Individual and combined effects of deoxynivalenol and T-2 toxin in Broiler chicks. *Poultry Science*, 68(5), pp. 622-626. DOI: 10.3382/ps.0680622.

Lamenca Palacio, V. (2015). *Análisis de micotoxinas en cereales mediante técnicas instrumentales*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.

López Soroa, A. P. (2017). *Influencia de factores agronómicos sobre la contaminación por micotoxinas en maíz*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.

Luo, X. Y. (1991). "Fusarium toxins contamination of cereals in China". *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, 33, pp.11-15. DOI: 10.2520/myco1975.1991.11.

Maiorano, A., Blandino, M., Reyneri, A. y Vanara, F. (2008). "Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxinivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Protection*, 27, pp. 182-188. DOI: 10.1016/j.cropro.2007.05.004.

Mansfield, M. A., De Wolf, E. D. y Kuldau, G. A. (2005). "Relationships Between Weather Conditions, Agronomic Practices, and Fermentation Characteristics with Deoxynivalenol Content in Fresh and Ensiled Maize". *Plant Disease*, 89, pp. 1151-1157. DOI: 10.1094/PD-89-1151.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2017). *Superficies y producciones de cultivo. 7.1.8.3. Cereales Grano-Maíz: Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción 2017*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2018-Avance/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07_1.8.3.pdf [Consultado 13-03-2019].

Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R. W. A., Noordam, M. Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G. J. y Vespermann, A. (2009). "Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe". *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp. 1009-1021. DOI: 10.1016/j.fct.2009.02.005.

Numanoglu, E., Gökmen, V., Uygun, U. y Hoksel, H. (2012). "Thermal degradation of deoxinivalenol during maize bread baking". *Food Additives & Contaminants. Part A*, 29(3), pp. 423-430. DOI: 10.1080/19440049.2011.644812.

Oliveira, M. S., Rocha, A., Sulyok, M., Krska, R. y Mallmann, C. A. (2016). "Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control*, 73, pp. 127-132. DOI: /10.1016/j.foodcont.2016.07.033.

Plattner, R. D. y Maragos, C. M. (2003). "Determination of Deoxynivalenol and Nivelanol in Corn and Wheat by Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry. *Food Chemical Contaminants*, 86(1), pp. 61-65. Disponible en: <https://pubag.nal.usda.gov/download/25940/PDF>. [Consultado 14-04-2019].

Pleadin, J., Sokolović, M., Perši, N., Zadavec, M., Jaki, V. y Vulić, A. (2012). "Contamination of maize with deoxinivalenol and zearalenone in Croatia". *Food Control*, 28, pp. 94-98. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.04.047.

Ramos, J. A. (2016). "Micotoxinas: situación actual y retos futuros". *Charla UIMP*. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, 29 de septiembre de 2016. Disponible en: <http://iuca.unizar.es/sites/default/files/intranet/2016/Presentaciones%20UIMP/Charla%20AJ%20Ramos.pdf> [Consultado 25-05-2019].

Ran, R., Wang, C., Han, Z., Wu, A., Zhang, D. y Shi, J. (2013). "Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods". *Food Control*, 34(1), pp. 138-148. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.04.026.

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). (2019). RASFF Portal Search Page. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> [Consultado 14-03-2019].

Recomendación (2006/576/CE) de 17 de agosto de 2006 sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea. L: 229 de 23 de agosto de 2006.

Reglamento (CE) nº 1881/2006 de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L: 364 de 20 de diciembre de 2006.

Reglamento (CE) nº 401/2006 de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L: 70 de 9 de marzo de 2006.

Ruiz de Galarreta, J. I., Butrón, A., Ortiz, A., Malvar, R. A., Ordás, A., Landa, A. y Revilla, P. (2015). "Mycotoxins in maize grains grown in organic and conventional agriculture". *Food Control*, 52, pp. 98-102. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.016.

Serrano, A. B., Font, G., Mañes, J. y Ferrer, E. (2013). "Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging *Fusarium* mycotoxins in pasta by LC-MS/MS". *Food Control*, 32(1), pp. 105-114. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.037.

Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L. y Kizek, R. (2010). "Deoxynivalenol and its toxicity". *Interdisciplinary Toxicology*, 3(3), pp. 94-99. DOI: 10.2478/v10102-010-0019-x.

Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Madrid: Díaz de Santos.

Sosa, D., Escobar, A. y Faure, R. (2017). "Deoxinivalenol: métodos de análisis de residualidad en cereales. Toxicidad en animales de granja". *Salud Animal*, 39(2). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n2/rsa08217.pdf>. [Consultado 15-07-2019].

Velluti Perrou, A. (2002). *Ecofisiología de especies de Fusarium productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos*. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida.

Wu, L., Li, J., Li, Y., Li, T., He, Q., Tang, Y. y Liao, P. (2016). “Aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from different Province of China”. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 63(7), pp. 1-10. DOI: 10.1186/s40104-016-0122-8.

Yebra Cañardo, C. (2015). *Evaluación de la incidencia de micotoxinas en muestras de maíz y trigo mediante cromatografía líquida de alta resolución*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.

Yoshizawa, T., Takeda, H. y Ohi, T. (1983). “Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals”. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, pp. 2133–2135. DOI: 10.1271/bbb1961.47.2133.