



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# TRABAJO FIN DE GRADO

## ESTUDIO Y PREVENCIÓN DE MICOTOXINAS EN JAMÓN

## STUDY AND PREVENTION OF MICOTOXINS IN HAM

### **Autor**

Nombre: Aitor Ponciano

Apellidos: López Soroa

DNI: 73003710-P

Dirección: C/Mayoral N°9 3°A

Teléfono: 663329625

Correo electrónico: aitorl92@hotmail.com; 631123@unizar.es

### **Director**

José Antonio Beltrán Gracia

Facultad de Veterinaria

2016

# ÍNDICE

1. Resumen	
1.1. Resumen	3
1.2. Abstract	3
2. Introducción	4
2.1. Jamón y jamón curado	4
2.1.1. Calidad del jamón curado	5
2.1.2. Jamón de Teruel	6
2.1.3. ETG Jamón Serrano	7
2.2. Micotoxinas	8
2.2.1. Mohos y jamón	9
2.2.2. Penetración de mohos en el interior del jamón	11
3. Justificación y objetivos	12
4. Metodología	13
4.1. Ocratoxina A	13
4.2. Ácido ciclopiazónico	15
4.3. Procedencia de las muestras	17
4.3.1. Muestras para el análisis de micotoxinas	17
4.4. Detección y control de OTA y CPA en jamón curado	18
4.4.1. Extracción, detección y cuantificación de CPA y OTA en medio de cultivo	20
4.4.2. Extracción, detección y cuantificación de CPA y OTA en muestras de jamón	24
5. Resultados y discusión	27
5.1. Detección y cuantificación de CPA y OTA <i>in vitro</i>	27
5.1.1. Detección y cuantificación de CPA <i>in vitro</i>	27
5.1.2. Detección y cuantificación de OTA <i>in vitro</i>	28
5.2. Detección y cuantificación de CPA y OTA en jamón	29
5.2.1. Detección y cuantificación de CPA en jamón	29
5.2.2. Detección y cuantificación de OTA en jamón	29
6. Conclusiones	31
6.1. Conclusiones	31
6.2. Conclusions	31
7. Aportaciones en materia de aprendizaje	32
8. Bibliografía	33

## 1. RESUMEN

### **1.1 RESUMEN**

El principal objetivo de esta revisión bibliográfica es analizar en profundidad el conocimiento existente sobre las cepas de mohos y levaduras no toxigénicas que se utilizan o se podrían utilizar para prevenir la síntesis de micotoxinas por cepas toxigénicas en el jamón curado.

Se ha realizado una búsqueda completa en las bases existentes y en las publicaciones especializadas en el tema de estudio, y se proponen medidas concretas y realistas para el control de estas sustancias tóxicas ya que cada vez es más necesario el establecimiento de medidas adecuadas de control que garanticen un consumo seguro del alimento.

La identificación y caracterización precisa de los mohos constituyen un problema complejo debido al alto grado de relación entre especies. La implantación en los jamones de cepas de mohos y levaduras no toxigénicas y adaptadas a las condiciones ecológicas del jamón podría paliar parcialmente el problema por exclusión competitiva de las cepas toxigénicas.

### **1.2 ABSTRACT**

The main objective of this review is to analyze in depth the existing knowledge about the strains of toxigenic molds and yeasts used or could be used to prevent the synthesis of mycotoxins by toxigenic strains in cured ham.

It has conducted a full search of existing databases and specialized publications on the subject of study. It proposes some concrete and realistic measures to control these toxic substances as it has become more necessary the establishment of adequate control measures that ensure safe food consumption.

The accurate identification and characterization of molds is a complex problem because of the close relationship between the different species. The implantation in the different hams of adapted mold strains and non-toxicogenic yeasts to the ecological conditions of ham could partially palliate the problem of competitive exclusion of the toxigenic strains.

## 2. INTRODUCCIÓN

### **2.1 JAMÓN Y JAMÓN CURADO**

Jamón o jamón curado: Son los productos elaborados con la extremidad anterior del cerdo, que se han sometido, con carácter general, a un proceso de salazón, acompañado eventualmente de adición de especias, condimentos y aditivos, lavado, reposo o postsalado y maduración y secado durante el tiempo suficiente para conferirle las características organolépticas propias (Real Decreto 474/2014).

Marcado e identificación para el control del periodo de elaboración:

Todos los jamones curados, incluidos los regulados en su correspondiente legislación específica, deberán ir marcados o identificados, individualmente, mediante un sistema que incluya, al menos, la semana y el año de entrada en salazón.

Este marcado o identificación deberá fijarse en el producto, antes de su entrada en salazón, de forma inviolable y perfectamente legible, acompañándolo en todas las etapas de elaboración y comercialización posterior al mismo.

Además, se incluirá en el registro de trazabilidad la información contenida en el marcado o identificación así como las posibles incidencias, como la sustitución del elemento de marcado o identificación por otro nuevo debido al deterioro, que hayan podido producirse en dicho marcado o identificación a lo largo de la cadena de producción y comercialización.

Etiquetado:

Sin perjuicio del cumplimiento de la normativa en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios y lo establecido en otras disposiciones de la Unión Europea aplicables en la materia, el etiquetado de jamones y paletas curados deberá tener en cuenta las siguientes particularidades:

Menciones facultativas: Atendiendo al periodo mínimo de elaboración (definido como el tiempo transcurrido entre la entrada del producto en salazón y su comercialización por la industria elaboradora, descontando aquellos periodos en los que el producto haya estado sometido a condiciones que interrumpan las reacciones bioquímicas que tienen lugar durante su elaboración) en el etiquetado

de los jamones, independientemente de la forma de presentación del producto y una vez concluida la elaboración del mismo, se podrán incluir las siguientes menciones, siempre que cumplan con el periodo mínimo de elaboración establecido para cada mención:

	Mención facultativa	Periodo mínimo de elaboración - Meses
Jamones.	Bodega o cava.	9
	Reserva o añejo.	12
	Gran Reserva.	15

Los jamones podrán emplear otras menciones facultativas distintas a las reguladas en este apartado, siempre que cumplan lo establecido en la norma general de etiquetado.

Información adicional en el etiquetado: Los jamones curados podrán incluir opcionalmente en el etiquetado el periodo mínimo de elaboración. No obstante, esta información será obligatoria cuando se emplee alguna de las menciones facultativas no reguladas en este real decreto.

Excepción sobre el uso de las menciones facultativas: Debido a las especiales características de elaboración, en particular, respecto a los tiempos de curado-madurado, de los jamones y paletas que son regulados por la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos, las menciones reguladas en el apartado b del presente artículo 21, no se utilizarán en dichos productos ibéricos.

Cualquier sistema de marcado o identificación, para los jamones y paletas regulados en la presente norma de calidad, no inducirá a error o confusión con respecto a los precintos regulados en la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.

### **2.1.1 Calidad del jamón curado**

Para obtener productos de la mejor calidad, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos, deberán ajustarse a los pesos y tiempos mínimos de elaboración. Al objeto de poder verificar el cumplimiento de los tiempos mínimos de elaboración de jamones y paletas a lo largo de la vida del producto, se colocará en sitio visible una identificación

inviolable y perfectamente legible mediante un sistema que incluya al menos los dos dígitos de la semana de entrada en salazón y los dos dígitos finales del año. Estos pesos y tiempos mínimos contados a partir del día de entrada en salazón serán los siguientes (Real Decreto 4/2014):

Los tiempos mínimos de elaboración para el jamón en función de los pesos serán:

Peso piezas elaboradas (Kg)	Tiempo mínimo de elaboración
< 7	600 días
≥ 7	730 días

Los pesos mínimos del jamón elaborado una vez etiquetado, en el momento de la salida de la instalación de la industria final, serán:

– Jamón 100% ibérico:  $\geq 5,75$  kg.

– Jamón ibérico:  $\geq 7$  kg.

Trazabilidad:

En todas las etapas de la producción, transformación, almacenamiento y distribución deberá asegurarse la trazabilidad de los productos objeto de la norma, de manera que se puedan relacionar las piezas o porciones de los productos con el animal o el lote o lotes de explotación de que procedan, sin perjuicio de lo establecido en el artículo 18 del Reglamento (CE) n.º 178/2002, de 28 de enero, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

### **2.1.2 Jamón de Teruel**

Actualmente existen seis Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) de jamón curado en España, entre las que destaca la D.O.P. Jamón de Teruel ya que fue la primera que se creó en nuestro país para amparar, controlar y garantizar la producción de jamones. El proceso de elaboración del jamón D.O.P. de Teruel tiene una duración mínima de 60 semanas durante las cuales se desarrollan las siguientes fases: salazón

(incorporación de sales a la masa muscular, que favorecen la deshidratación del pernil y su perfecta conservación), lavado (para eliminar la sal adherida), asentamiento o postsalado (difusión de la sal hacia el interior de las piezas cárnicas, eliminándose lenta y paulatinamente el agua), curado (en secaderos cuyas condiciones ambientales son las propias de la zona) y envejecimiento (en esta fase se producen las reacciones bioquímicas responsables del aroma y sabor característico).

### **2.1.3 ETG Jamón serrano**

Se trata de la Especialidad Tradicional Garantizada que denomina si los diferentes perniles cumplen las condiciones necesarias para ser considerados “jamón serrano”. El Reglamento 509/2006 establece el procedimiento de solicitud y registro de una ETG. La solicitud debe partir siempre de una agrupación de productores (fabricantes en este caso) que ha de elaborar un pliego de condiciones conteniendo, al menos, lo siguiente:

- El nombre del producto.
- La descripción del método de elaboración.
- Los elementos que le confieren las características tradicionales.
- Las tipificaciones del producto (características físicas, químicas y/o microbiológicas).
- Los procedimientos de control.

Una vez elaborado el pliego de condiciones la agrupación de productores debe presentarlo a la autoridad competente del Estado miembro donde radique.

Esta transmitirá la petición a la Comisión Europea, quien a su vez la enviará al resto de Estados Miembros. Además procederá a la publicación de los elementos principales de la solicitud en el Diario Oficial.

Se realiza un control de las características de la materia prima, un control de las características del método de elaboración y un control de las características del producto terminado

## **2.2 MICOTOXINAS**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos por ciertos hongos (mohos normalmente) y cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reducen la actividad, hacen enfermar o incluso causan la muerte de animales y personas. Son las sustancias tóxicas o contaminantes que mayor número de notificaciones presentan, seguidos por los de origen biológico y los plaguicidas (Libro Blanco).

La mayoría de las especies que proliferan son capaces de sintetizar micotoxinas (siendo las más importantes aflatoxinas y ocratoxinas). El potencial toxigénico de los mohos aislados en productos cárnicos se ha establecido basándose en distintas observaciones (Tabla 1). En este sentido, se comprobó que el 80% de 1481 aislamientos de cepas del género *Penicillium* eran potencialmente toxigénicos (Eckardt y col., 1979). Asimismo, en el estudio realizado por Núñez y col. (1996) se concluyó que más del 75% de los mohos aislados en jamón ibérico mostraban toxicidad o mutagenicidad en ensayos biológicos. Algunas de estas cepas mostraron capacidad de producción de micotoxinas en medios de cultivo constituidos únicamente por extracto de carne y cloruro sódico (Díaz, 1999; Núñez y col., 2000; Rodríguez de Ledesma y col., 1996; Sosa y col., 2002).

Tabla 1 Producción de micotoxinas por especies de *Penicillium* y *Aspergillus* asociadas a productos cárnicos.

Especie	Micotoxinas producidas <sup>1</sup>
<i>A. flavus</i>	Aflatoxina B1, Ácido ciclopiazónico, Ácido 3-nitropropiónico
<i>A. niger</i>	Ocratoxina A, Fumonisina B2
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A, Ácido penicílico, Xantomegnina, Vioxantina
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina
<i>P. aurantiogriseum</i>	Verrucosidina, Ácido penicílico, Ácido terréstrico, Glicopéptidos nefrotóxicos
<i>P. brevicompactum</i>	Ácido micofenólico, Botriodiploidina
<i>P. chrysogenum</i>	Ácido secalónico, Toxina PR, Roquefortina C, Ácido ciclopiazónico
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. commune</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>P. crustosum</i>	Ácido terréstrico, Penitrem, Roquefortina C
<i>P. cyclopium</i>	Ácido penicílico, Xantomegnina, Ocratoxina A
<i>P. expansum</i>	Patulina, Citrinina, Chaetoglobosinas, Communesinas, Roquefortina C
<i>P. glabrum</i>	Citromicetina
<i>P. griseofulvum</i>	Patulina, Griseofulvina, Roquefortina C, Ácido ciclopiazónico
<i>P. nalgiovense</i>	Ocratoxina A
<i>P. nordicum</i>	Ocratoxina A, Ácido virídico
<i>P. oxalicum</i>	Ácidos secalónicos, Roquefortina C
<i>P. palitans</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>P. roqueforti</i>	Ácido micofenólico <sup>2</sup> , Toxina PR, Roquefortina C
<i>P. rugulosum</i>	Rugulosina
<i>P. solitum</i>	-
<i>P. variabile</i>	Rugulosina
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A, citrinina
<i>P. viridicatum</i>	Ácido penicílico, Ácido virídico, Ácido ciclopiazónico, Ocratoxina A

<sup>1</sup>Basado en Escher y col. (1973), Frisvad y col. (2004), Frisvad y Thrane (2002), Galtier y Le Bars (1973), Pitt (1979).

<sup>2</sup>El ácido micofenólico no está catalogado como micotoxina pero es un componente inmunodepresor.

### 2.2.1 Mohos y jamón

En el caso del jamón, el desarrollo de mohos en la superficie tiene un efecto beneficioso en las características sensoriales de los mismos durante su maduración. La calidad sensorial del jamón está condicionada por numerosos factores, entre los que se encuentran: pH, contenido en humedad,  $a_w$ , potencial redox, contenido de NaCl, lipólisis y proteólisis (Buscailhon y Monin, 1994a y 1994b). Varios estudios han puesto de manifiesto la capacidad proteolítica y lipolítica de algunas cepas fúngicas aisladas de la superficie del jamón durante su maduración, influyendo también en el sabor, flavor y aroma del mismo (Bruna y col., 2003; Díaz y col., 1997; Ludemann y col., 2004; Martín y col., 2001a y 2001b; Scolari y col., 2003; Sunesen y Stahnke, 2003; Visessanguan y col., 2004; Zapelena y col., 1999). Generalmente la proteólisis en los productos cárnicos se ha asociado a la actividad de los enzimas presentes en el tejido muscular (Sárraga y col., 1993; Toldrá y col., 1996). Sin embargo, diversos trabajos han puesto de

manifiesto que algunas cepas de hongos aisladas en jamón curado presentan una actividad proteolítica intensa tras su inoculación en carne de cerdo estéril y productos cárnicos madurados, produciendo un gran incremento de aminoácidos libres transcurrido el período de incubación (Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2003, 2004a, 2004b). Algunos hongos en los que se ha comprobado la presencia de actividad proteolítica son *Penicillium chrysogenum* y *Debaryomyces hansenii*, (Martín y col., 2004a). También, Córdoba y col. (1994) y Rodríguez y col. (1994) demostraron dicha actividad por parte de *P. chrysogenum* al detectar un mayor incremento tanto de aminoácidos libres como de ciertas aminos procedentes de la mencionada hidrólisis proteica, en las zonas superficiales de la pieza de jamón curado. Del mismo modo, Toledano y col. (2011) demostraron in vitro que ciertas cepas de *P. chrysogenum* desarrollan una elevada actividad proteolítica frente a la miosina porcina. Núñez (1995) puso de manifiesto la existencia de diversas cepas de *P. chrysogenum* que presentaban actividad aminopeptidasa, especialmente frente a sustratos con metionina, por lo que quedó demostrado que la población fúngica del jamón podría favorecer los cambios característicos en los compuestos nitrogenados.

Los cambios lipídicos que experimenta el producto durante el procesado, como la lipólisis y oxidación de ácidos grasos libres, tienen también un gran impacto en la calidad sensorial del producto final ya que, como resultado, se liberan numerosos productos que desempeñan un papel importante en la formación del sabor y aroma característico del jamón, tales como aldehídos, alcoholes, cetonas y otros compuestos (Buscailhon y col., 1994a; Flores y col., 1997; Marusic y col., 2001; Ordoñez y col., 1999). En este sentido, Selgas y col. (1999) y Toledo y col. (1996) probaron que las lipasas producidas por la microbiota desarrollada en superficie de embutidos curados y otros productos cárnicos incrementaron los niveles de ácidos grasos libres en el producto. Del mismo modo, numerosos trabajos han descrito la actividad lipolítica de diversas especies de *Penicillium* aisladas en productos cárnicos (Alonso, 2004; Núñez y col., 1995; Seitz, 1990; Trigueros y col., 1995). Las lipasas fúngicas son activas a una temperatura entre 15 y 25°C y una  $a_w$  de 0,95 a 0,85 (Magan y col., 1993), por lo que podrían actuar en las condiciones que encuentran en el jamón a partir de la etapa de post-salado. En este sentido, Toledo y col. (1996) observaron que los hongos pueden provocar un incremento en la concentración de ácidos grasos libres en productos cárnicos madurados. También Núñez (1995) y Alonso (2004) observaron actividad

lipolítica en cepas del género *Penicillium* aisladas en embutidos y en jamón, respectivamente. Del mismo modo, los hongos también participan en los procesos oxidativos de los ácidos grasos contribuyendo de forma positiva a las características organolépticas, más concretamente al flavor, siempre que se produzcan en proporciones moderadas, pero que pueden tener una incidencia negativa cuando alcanzan los niveles de enranciamiento. (Tabla 2).

Tabla 2 Influencia de los hongos y las levaduras en determinadas características del jamón.

Características	Efecto	Levaduras	Mohos
Color	Disminución del Eh en el interior	++	-
	Destrucción de peróxidos	+	+
Aroma	Proteólisis	+	++
	Lipólisis	++	++
	Retarda el enranciamiento	+	++
Conservación	Competencia con microbiota natural	-	+++
Superficie	Apariencia	+	+++
	Protección frente a la luz y el oxígeno	-	+++
	Regulación de la maduración	+	+++
Calidad sanitaria	Prevención de la presencia de micotoxinas	-	+++

Fuente: Lücke y Hechelmann (1987)

Simbología: (-) Ausencia de efecto; (+) Intensidad leve; (++) Intensidad moderada; (+++) Intensidad elevada.

### 2.2.2 Penetración de mohos en el interior del jamón

En ocasiones los mohos penetran hacia el interior del jamón, especialmente en las zonas de las articulaciones coxofemoral o en los espacios intermusculares o incluso en las zonas donde se realiza el calado (Arnau, 1998). El crecimiento de mohos en estas zonas provoca modificaciones sensoriales aparte de que la apariencia del jamón se ve sensiblemente desfavorecida.

Las posibles causas son un secado excesivamente rápido en la zona de la articulación coxofemoral que provoca una retracción de la masa cárnica, apareciendo cavidades por las que pueden penetrar los mohos desde el exterior. En ocasiones el manejo del pernil en el matadero es el que provoca la rotura o separación de músculos por donde penetran esporas de mohos que luego dan lugar al correspondiente desarrollo del micelio.

También se ha citado el uso de calas demasiado gruesas que provocan roturas importantes por donde penetran mohos hacia el interior.

Resulta obvio que un adecuado manejo del pernil en el matadero y en la industria, además de un proceso de secado lento y paulatino que no provoque retracciones musculares, y de un excesivo mimo en la operación de calado, son medidas que minimizan la presentación de este tipo de alteración.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La realización de este proyecto ha consistido en la búsqueda bibliográfica sobre micotoxinas en jamón debido a la creciente preocupación que se ha dado en este campo de la industria cárnica.

Las alarmas alimentarias en Europa han generado un gran interés y preocupación en los consumidores respecto a los productos y su suministro, siendo cada vez más necesario el establecimiento de medidas adecuadas de control que garanticen un consumo seguro del alimento. Por esto es muy importante tener en cuenta el estudio y las formas de prevención de las diferentes micotoxinas que puedan aparecer en el jamón curado, siendo las más destacables de todas ellas la Ocratoxina A (OTA) y el ácido ciclopiazónico (CPA).

Ambas pueden ser producidas por algunas especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, por lo que este proyecto intenta, a través de la revisión bibliográfica de diferentes artículos y libros, establecer unas medidas adecuadas de prevención y análisis que se puedan realizar a nivel de laboratorio y durante el proceso de maduración, así como describir las diferentes causas que las pueden provocar y los problemas que pueden llegar a ocasionar.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 OCRATOXINA A

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por algunas especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que crecen de manera natural en un gran número de productos alimenticios. La estructura química de la OTA consiste en una dihidroisocumarina unida por el grupo carboxilo a una molécula de l-β-fenilalanina mediante un enlace amida (Figura 1). Tiene efectos nefrotóxicos, teratogénicos, inmunodepresores y carcinogénicos (Creppy, 1999; Kuiper-Goodman y Scott, 1989; O'Brien y Dietrich, 2005; Petzinger y Ziegler, 2000; Pfohl-Leskowicz y col., 2002). De todos ellos destacan los daños nefrotóxicos, ampliamente demostrados en aves y mamíferos, siendo esta micotoxina la principal responsable de la nefropatía porcina (Krogh, 1987; Pfohl-Leskowicz y col., 2002). Asimismo, la OTA podría ser responsable de la enfermedad conocida como nefropatía endémica de los Balcanes (BEN, del inglés *Balkan Endemic Nephropaty*) (Mally y col., 2007; Pfohl-Leskowicz y col., 2002). Sin embargo, esto no está suficientemente demostrado y también se han citado otros posibles agentes etiológicos como son la contaminación con metales como el cadmio y el plomo (Wedeen, 1991), la deficiencia de selenio (Maksimovic, 1991) y la infección por bacterias o virus (Apostolov y Spasic, 1975). En relación con los posibles efectos carcinogénicos, en animales de experimentación se ha asociado la OTA con la aparición de tumores en el tracto urinario (Pfohl-Leskowicz y col., 2002) y se ha hipotetizado sobre su papel en el cáncer testicular (Schwartz, 2002). En humanos no se ha demostrado ningún efecto carcinogénico pero, atendiendo a datos anteriores, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) ha clasificado la OTA como carcinógeno del grupo 2B, donde se encuentran las sustancias carcinógenas potenciales.

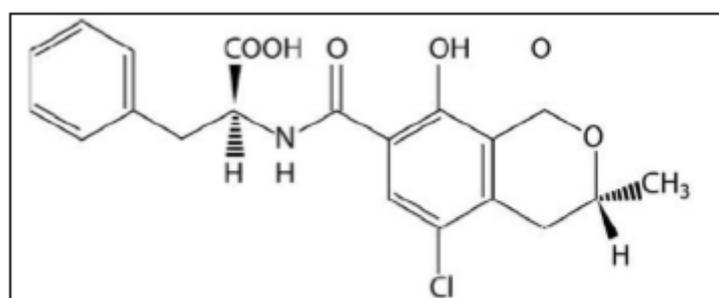


Figura 1 Estructura química de la ocratoxina A.  
Fuente: [www.food-info.net](http://www.food-info.net)

La presencia de OTA se ha descrito en múltiples sustratos entre los que destacan los productos derivados de cerdo y aves, y también se ha detectado en productos cárnicos madurados.

Las especies de hongos productores de OTA pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Dentro del género *Aspergillus*, *A. ochraceus* es la especie en la que se describió por primera vez la producción de OTA en 1965, por lo que es la más conocida como productora. Crece en un rango de temperaturas alto (12-37°C) y se asocia con climas cálidos y tropicales. Sin embargo, existen otras especies productoras como *A. sulphureus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. auricomus*, *A. melleus*, *A. petrakii* y *A. esclerotiorum* (en el grupo de *A. ochraceus*); *A. alliaceus* y *A. albertensis* (en la sección *Flavi*) y las especies de la sección *Nigri* (unos de los de mayor importancia dentro del género *Aspergillus* que crecen en gran variedad de sustratos incluido el nuestro).

En el género *Penicillium*, *Penicillium viridicatum* fue la primera especie ocratoxigénica descrita (Van Walbeek y col., 1969). Sin embargo, aunque durante los últimos años diversos autores han continuado citando a *P. viridicatum* como la principal especie ocratoxigénica (Aziz y col., 1998; Czerwiecki y col., 2002; Höhler, 1998; Mantle y McHugh, 1993) en la actualidad destaca principalmente *Penicillium verrucosum* (Castella y col., 2002; Cairns-Fuller y col., 2005; Larsen y col., 2001; Lund y Frisvad., 2003). En este sentido, Spotti y col. (1999 y 2001<sup>a</sup>) evaluaron la capacidad ocratoxigénica de *P. verrucosum* en salchichas fermentadas bajo condiciones similares a las del proceso de elaboración del producto, detectando la OTA en la tripa y periferia del producto. Actualmente se considera la posible división de *P. verrucosum* en dos especies ocratoxigénicas, *P. verrucosum* y *Penicillium nordicum*, ambas pertenecientes a la serie *Verrucosa* de la sección *Viridicata*. En menor grado, otras especies de *Penicillium* se han descrito como productoras de OTA (Tabla 3).

Tabla 3 Especies de *Penicillium* productoras de OTA (diferentes de *P. verrucosum* y *P. viridicatum*)

Subgénero	Especie	Referencias bibliográficas
<i>Aspergilloides</i>	<i>P. glabrum</i>	Vazquez-Belda, 1995
	<i>P. frequentans</i>	Giridhar y Reddy, 1998 y 1997
	<i>P. purpurescens</i>	El-Banna y col., 1987; Krivobok y col., 1987; Leistner y Pitt, 1977; Lillehoj y Goransson, 1980
	<i>P. sclerotiorum</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. implicatum</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. montanense</i>	Ueno y col., 1991
<i>Biverticillium</i>	<i>P. rugulosum</i>	Giridhar y Reddy, 1997
	<i>P. funiculosum</i>	Giridhar y Reddy, 1997
	<i>P. variabile</i>	Aziz y col., 1998; Frisvad, 1985; Giridhar y Reddy, 1997; Jiménez y col., 1986; Leistner y Pitt, 1977; Sanchis y col., 1982; Battilani y Pietri, 2002
	<i>P. pinophilum</i>	Giridhar y Reddy, 1997 y 2001; Ueno y col., 1991
	<i>P. purpurogenum</i>	Giridhar y Reddy, 1997 y 2001; Ueno y col., 1991
	<i>P. verruculosum</i>	Lillehoj y Goransson, 1980; Ueno y col., 1991
<i>Furcatum</i>	<i>P. oxalicum</i>	Giridhar y Reddy, 1997 y 2001
	<i>P. citrinum</i>	Giridhar y Reddy, 1997 y 1998
	<i>P. canescens</i>	Giridhar y Reddy, 1997; Ueno y col., 1991
	<i>P. janczewskii</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. mellinii</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. raistrickii</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. miczynskii</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. corylophilum</i>	Ueno y col., 1991
<i>Penicillium</i>	<i>P. atramentosum</i>	Bridge y col., 1989
	<i>P. aurantiogriseum</i>	Krivobok y col., 1995; Mills y col., 1989; Skrinjar y col., 1995
	<i>P. brevicumcompactum</i>	Kozakiewicz y col., 1993
	<i>P. chrysogenum</i>	Czerwiecki y col., 2002; Krivobok y col., 1987; Leistner y Pitt, 1977; Mills y Abramson, 1982; Mills y col., 1989; Skrinjar y col., 1992; Vazquez-Belda y col., 1995
	<i>P. commune</i>	Creppy y col., 1995; Skrinjar y col., 1992
	<i>P. cyclopium</i>	Czerwiecki y col., 2002; Leistner y Pitt, 1977; Mills y Abramson, 1982; Northolt y col., 1979; Vazquez-Belda y col., 1995
	<i>P. expansum</i>	Bridge y col., 1989; Kozakiewicz y col., 1993; Krivobok y col., 1987; Mills y col., 1989
	<i>P. glandicola</i>	Abramson y col., 1992
	<i>P. griseofulvum</i>	Giridhar y Reddy, 1997; Mantle y McHugh, 1993
	<i>P. nordicum</i>	Land y Hult, 1987; Larsen y col., 2001
	<i>P. politans</i>	Sanchis y col., 1982; Scott y col., 1972
	<i>P. solitum</i>	Bridge y col., 1989; Mantle y McHugh, 1993
	<i>P. verrucosum</i> var. <i>Cyclopium</i>	Skrinjar y col., 1992
	<i>P. verrucosum</i>	Larsen y col., 2001
<i>P. viridicatum</i>	Frisvad, 1981; Frisvad y Filtenborg, 1983 y 1989; Pitt, 1987	

## 4.2 ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

El ácido ciclopiazónico (CPA), químicamente clasificado como un indol del ácido tetramico ( $C_{20}H_{20}N_2O_3$ ) (figura 2), es una micotoxina cuyo nombre proviene de la primera especie donde se aisló *Penicillium cyclopium* Westing. El CPA es un inhibidor específico del enzima ATP-asa calcio-dependiente, el cual es tóxico para hombre y animales (Riley y Coeger, 1992). Ha estado implicado en dos micotoxicosis agudas en humanos: “koudua poisoning” (Rao y Husain, 1985), en la que se producen náuseas y mareos “Turkey disease X”, en la cual el CPA causa neurotoxicidad caracterizada por opostótonos, catalepsia, hipotermia y sedación (Blount, 1961).

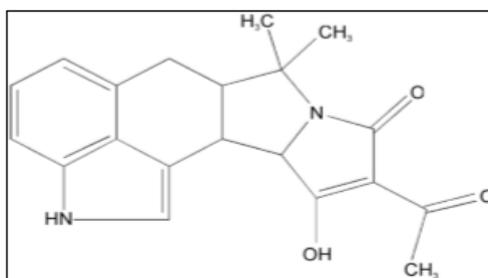


Figura 2 Estructura química del ácido cliclopiazónico

Fuente: [www.food-info.net](http://www.food-info.net)

Numerosas especies de *Penicillium* y *Aspergillus* han presentado capacidad para biosintetizar CPA (Cole, 1984; Dorner y col., 1984; Frisvad, 1989; Tucksess y col., 1987). Dentro del género *Penicillium*, el principal productor de esta micotoxina es *Penicillium commune*, el cual ha sido aislado de jamón curado y otros productos cárnicos (Baily y col., 2005; López-Díaz y col., 2001; Moldes-Anaya y col., 2009; Núñez y col., 2007; Soriano del Castillo, 2007). Del mismo modo, se han aislado cepas de *P. commune* productoras de CPA en el ambiente de cámaras de procesado de carnes. Algunas de estas cepas producían la micotoxina en concentraciones de 188 ppm (Kozlovsky y col., 2014). Diversos trabajos han estudiado las condiciones requeridas para la producción de CPA por *P. commune*. Así, Gqaleni y col. (1996) reportaron que la relación óptima de  $a_w$  y temperatura era de 0,98  $a_w/20^\circ\text{C}$ , llegando a detectar esta toxina a concentraciones de hasta 7678,0 ng/g. Del mismo modo, Sosa y col. (2002) demostraron que las condiciones óptimas para producir CPA por cepas de *P. commune* aisladas de jamón curado eran de  $30^\circ\text{C}$  y  $a_w$  de 0,96, condiciones que se reproducen durante la etapa de estufaje, mientras que su producción disminuía con valores de  $a_w$  inferiores a 0,90. Además de *P. commune* y *P. cyclopium*, otras especies son productoras de CPA como *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium dipodomyicola*, *Penicillium griseofulvum* y *Penicillium palitans* (Tabla 4).

Tabla 4. Especies de *Penicillium* productoras de CPA

Subgénero	Especie	Referencias bibliográficas
<i>Furcatum</i>	<i>P. miczynskii</i>	Houbraken y col., 2011
	<i>P. aurantiogriseum</i>	Finoli y col., 1999; Ostrý y Polster, 1989
	<i>P. brevicompactum</i>	Frisvad y col., 2000; Sørensen y col., 2008
	<i>P. camemberti</i>	Bockelmann y col., 1999; Bullerman, 1997; Frisvad, 1986; Frisvad y col., 2000; Frisvad y Thrane, 1996; Geisen y col., 1990; Hill y col., 1986; Holzapfel, 1968; Le Bars, 1979; Lund, 1995; Mantle, 1991; Moss, 1991; Nishi y col., 1985; Pitt, 1997; Polonelli y col., 1987; Sánchez y col., 2008; Taniwaki y col., 2001
	<i>P. chrysogenum</i>	Bullerman 1997; Mantle, 1991; Moss, 1991
	<i>P. commune</i>	Bullerman 1997; Finoli y col., 1999; Frisvad, 1986; Frisvad y Thrane, 1996; Gqaleni y col., 1996; López-Díaz y col., 2001; Lund, 1995; Mantle, 1991; Moldes-Anaya y col., 2009; Moss, 1991; Núñez y col., 2007; Ostrý y Polster, 1989; Pitt, 1997; Polonelli y col., 1987; Sánchez y col., 2008; Soriano del Castillo, 2007; Sosa y col., 2002
	<i>P. crustosum</i>	Frisvad y Filtenborg, 1989
	<i>P. cyclopium</i>	Holzapfel, 1968; Neethling y McGrath, 1977
	<i>P. dipodomyicola</i>	Frisvad y col., 2000; Frisvad y , 2004
	<i>P. expansum</i>	Finoli y col., 1999;
	<i>P. griseofulvum</i>	Bullerman 1997; Frisvad y Filtenborg, 1983; Frisvad y col., 2000; Frisvad y Samson, 2004; Frisvad y Thrane, 1996; Galvalisi y col., 2012; Mantle, 1991; Moss, 1991; Pitt, 1997; Sánchez y col., 2008
	<i>P. palitans</i>	Frisvad, 1986; Frisvad y col., 2000; Polonelli y col., 1987; Sánchez y col., 2008; Sørensen y col., 2008
	<i>P. solitum</i>	Frisvad, 1986; Polonelli y col., 1987
	<i>P. viridicatum</i>	Bullerman 1997; Leistner y Pitt, 1977; Mantle, 1991; Moss, 1991; Pitt, 1997; Tabuc y col., 2004

### **4.3 PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS**

Después de la revisión de artículos y estudios, decidí incorporar al trabajo este ejemplo sobre cómo realizar el estudio de unas muestras de jamón ya que me pareció muy completo (Alapont Gutiérrez, 2015): Para el aislamiento fúngico se obtuvieron un total de 67 muestras de jamón y 80 de ambiente de 2 secaderos inscritos a la Denominación de Origen Protegida de Teruel, situados en los municipios de Mora de Rubielos (secadero 1, S1) y Puebla de Valverde (secadero 2, S2). En ambos secaderos se tomaron muestras de las superficies de los jamones y del ambiente, en las diferentes etapas de producción (Tabla 5). El proceso productivo difería ligeramente entre ambos secaderos ya que al final de cada etapa de S2 los jamones se lavaban, raspaban y se untaban con manteca para eliminar los micelios fúngicos desarrollados. Sin embargo, en S1 dichas acciones únicamente se llevaban a cabo antes de la venta de los jamones.

Para la determinación y cuantificación de Ácido Ciclopiazónico (CPA) y Ocratoxina A (OTA) en el producto cárnico se tomaron un total de 10 muestras comerciales de jamón. Los productos procedían de los mismos secaderos muestreados para realizar el aislamiento fúngico, S1 y S2.

Tabla 5. Toma de muestras de jamón y ambiente realizada en los dos secaderos estudiados (S1 y S2).

Secadero	Etapas	Meses en la etapa	Temperatura y HR <sup>a</sup> de la cámara	Muestras de jamón	Muestras de ambiente
S1	Postsalado	3	1,5°C, 85% HR	5	10
	Secado	3	9°C, 80% HR	5	10
	Envejecimiento	14	12°C, 70% HR	20	20
S2	Postsalado	3	3°C, 82% HR	10	20
	Secado	7	8°C, 85% HR	17	10
	Envejecimiento	10	16°C, 85% HR	10	10

<sup>a</sup>Humedad Relativa

#### **4.3.1 Muestras para el análisis de micotoxinas**

Para el estudio de la presencia de micotoxinas en el jamón se seleccionaron 10 perfiles que habían terminado su etapa de envejecimiento y que habían sido muestreados previamente durante dicha etapa para el aislamiento e identificación fúngica. Las muestras se obtuvieron mediante escisión de 100 gramos de cada pieza, formados a su vez de tres partes diferentes: maza, babilla y punta. Las muestras se conservaron en congelación (-18°C) hasta el posterior procesado y extracción de micotoxinas.

#### **4.4 DETECCIÓN Y CONTROL DE OTA Y CPA EN JAMÓN CURADO**

Uno de los aspectos fundamentales para llevar a cabo el control de micotoxinas en el jamón curado es la capacidad de detección analítica del compuesto. De forma general, las micotoxinas presentan una distribución poco uniforme en los alimentos y, dado su bajo peso molecular, pueden difundir hacia el interior de los mismos (Pitt, 2000). La capacidad de difundir en los productos cárnicos depende de las propiedades químicas de la toxina, como la polaridad y la carga, así como de las propiedades químicas y físicas del producto cárnico, como el pH, la actividad de agua y la distribución de grasa (Leistner y Eckardt, 1981). En este sentido, diversos trabajos han demostrado la capacidad de la OTA para difundir hacia el interior del jamón curado y otros productos cárnicos (Escher y col., 1973; Oncze y col., 1976; Spotti y col., 1999 y 2001a). Por ello, para investigar la presencia de micotoxinas el método de muestreo debe ser representativo y, previo a la extracción de la toxina fúngica con disolventes orgánicos, es necesario homogeneizar cuidadosamente la muestra. Por otra parte, la alta complejidad de los productos cárnicos, donde se encuentran presentes cantidades importantes de proteínas, lípidos, agua, hidratos de carbono y otros componentes minoritarios, requiere una purificación para eliminar las sustancias interferentes y aumentar la concentración de la micotoxina en el extracto obtenido. Así, después de la extracción con disolventes es importante llevar a cabo una etapa de purificación que permita obtener cromatogramas más limpios. En algunos métodos el extracto obtenido se lava una o más veces con isooctano para eliminar los lípidos presentes en la muestra (Gimeno y Martins, 1982).

Inicialmente, los métodos utilizados en la detección de micotoxinas en productos cárnicos se basaban en la extracción con solventes orgánicos y cromatografía en capa fina (TLC, *Thin layer Chromatography*) mediante placas de gel de sílice con indicador de fluorescencia o ultravioleta, según la micotoxina a determinar (Alperden y col., 1973; Escher y col., 1973; Wu y col., 1974). Sin embargo, aunque la TLC es una técnica que continúa siendo adecuada para realizar analíticas rutinarias de bajo coste, debido a que no precisa un equipamiento excesivamente caro, su límite de detección es demasiado elevado para la detección de trazas, por lo que esta técnica se utiliza principalmente como método de cribado o *screening* en un número limitado de muestras (Bailly y col., 2005). Los métodos analíticos para determinar micotoxinas en alimentos han sido actualizados recientemente en diversos trabajos (Andrade y col., 2014; Cigic y

Prosen, 2009; Krska y col., 2008; Pleadin y col., 2013; Turner y col., 2009; Zölner y Mayer-Helm, 2006). En la actualidad, los métodos para determinar micotoxinas están basados principalmente en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), debido principalmente a su alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y a que puede ser fácilmente automatizado. Del mismo modo, el HPLC tiene unas recuperaciones superiores al 90%. Por ello, este método analítico ha sido aceptado como método oficial por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Association of Official Analytical Chemists, AOAC International) para la determinación de micotoxinas en alimentos. El límite de detección de esta técnica es de 0,14 ng/g para la OTA y 0,01 µg/g para la CPA (Finoli y col., 1999; Matrella y col., 2006).

Para la detección y cuantificación de OTA y CPA mediante HPLC generalmente se usan columnas de fase reversa. Debido a las características ligeramente ácidas de estas micotoxinas, la fase móvil empleada en el HPLC de fase reversa debe ser ácida para evitar la adsorción inespecífica a la columna. En la mayoría de los casos se usan mezclas de acetonitrilo o metanol con ácido acético diluido o ácido fosfórico, generalmente en una elución isocrática. La utilización de acetonitrilo es más frecuente debido a que las mezclas de éste con agua tienen una menor viscosidad y mejor eficacia en la separación que las mezclas de metanol con agua. Para la detección de OTA se utiliza un detector de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 330 nm y 460 nm, respectivamente, siendo éste el método más utilizado en estudios realizados para determinar OTA en carne (Chiavaro y col., 2002; Gareis y Scheuer, 2000; Monaci y col., 2005; Toscani y col., 2007). Para la detección de CPA se mide el espectro de ultravioleta visible desde 200 a 400 nm (Hayashi y Yoshizawa 2005; Urano y col., 1992).

Por otro lado, los métodos inmunohistoquímicos para la detección de OTA han recibido una gran aceptación debido a su alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de analizar un gran número de muestras en un corto período de tiempo. Desde la descripción del primer ELISA para la detección de OTA en 1981 (Kuiper-Goodman y Scott, 1989), se han puesto a punto diversos métodos ELISA y RIA para la detección de OTA. Sin embargo, en la actualidad no existen kits inmunohistoquímicos para la determinación de CPA en alimentos.

La incidencia de micotoxinas en productos alimenticios ha permanecido estable durante los últimos años. Aunque el plan de vigilancia de micotoxinas en alimentos realizada por las Autoridades Sanitarias no incluye el muestreo de carnes y productos cárnicos, debido a que la presencia de micotoxinas en estos productos se atribuye a la alimentación de los animales con piensos contaminados, lo que conlleva la acumulación de la toxina en el músculo, sangre, grasa y diferentes órganos (Gareis y Wolff, 2000; Petzinger y Weidenbach, 2002). Así, en la actualidad el control de las micotoxicosis por ingestión de productos cárnicos se basa principalmente en la vigilancia sanitaria en la etapa de producción primaria, investigando la presencia de micotoxinas en piensos. En este sentido, a pesar de que existen múltiples investigaciones que han puesto de manifiesto tanto la presencia de hongos toxigénicos como de toxinas fúngicas en productos cárnicos, no existe legislación europea a día de hoy que regule los contenidos máximos permisibles de micotoxinas en estos productos. Sin embargo, aunque en la actualidad está derogada (Ley Ómnibus 25/2009), Italia contaba ya desde el año 1999 con una legislación específica que regula la presencia de OTA en productos cárnicos, estableciendo como límite máximo 1 µg/Kg.

Es necesario destacar que el control de micotoxinas en productos cárnicos curados no debe realizarse sólo a nivel de producción primaria, ya que durante la etapa de maduración del producto interviene una abundante micoflora, perteneciente fundamentalmente a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Eurotium*, que incluyen múltiples especies toxigénicas (Battilani y col., 2007). Así, aunque estos hongos contribuyen a la maduración de los productos curados, si se trata de cepas micotoxigénicas podrían contaminar estos alimentos.

#### **4.4.1 Extracción, detección y cuantificación de CPA y OTA en medio de cultivo**

En la gran mayoría de estudios los medios de cultivo utilizados eran iguales o muy parecidos, por lo que escogí este por lo específico que es: Los hongos se sembraron en el medio de cultivo sólido Czapeck Agar (Cz), inductor de la producción de CPA, ((sacarosa 3% (p/v), Czapeck concentrado 1% (v/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (p/v) y agar 1,5% (p/v); siendo Czapeck concentrado (100x) (NaNO<sub>3</sub> 30% (p/v), KCl 5% (p/v), MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 5% (p/v) y FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,1% (p/v)) y en medio de cultivo sólido Czapeck Yeast Agar (CYA), inductor de la producción de OTA (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (v/v), extracto de

levaduras 0,5% (p/v), sacarosa 3% (p/v) y agar 2% (p/v); siendo Czapeck concentrado (100x) ( $\text{NaNO}_3$  30% (p/v),  $\text{KCl}$  5% (p/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5% (p/v) y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1% (p/v)) y solución traza de metales ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5% (p/v) y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1% (p/v)). La siembra en ambos casos se realizó en tres puntos equidistantes en la palca de cultivo y se incubaron a 25°C durante 21 días. La extracción de la micotoxina se realizó siguiendo la metodología descrita por Bràgulat y col. (2006). Brevemente, el método de Bràgulat y col., (2006) consiste en tomar tres porciones de agar con un sacabocados (6 mm de diámetro) del centro, medio y extremo de cada una de las tres colonias de cada placa, tras 14 y 21 días de incubación para la extracción de CPA y tras 7 y 14 días de incubación para la extracción de OTA (Figura 3). Posteriormente, los trozos de agar se introdujeron en un tubo eppendorf con 500  $\mu\text{l}$  de metanol, se agitaron con el vortex durante 10 segundos y se dejaron macerar durante una hora. A continuación, el líquido se pasó por filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (MillerxR SLHV 013NK, Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.) y se almacenó en otro vial a -18°C hasta la realización de los análisis cromatográficos.

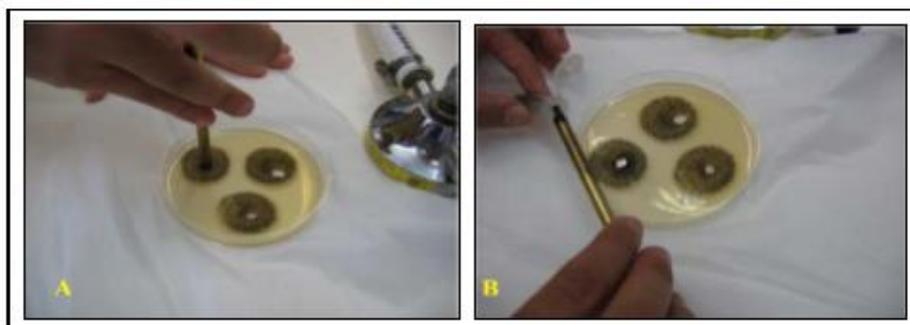


Figura 3. A y B) Extracción de una muestra de *Aspergillus* mediante un sacabocados a los 7 días de incubación en el medio de cultivo CYA.

La producción de CPA se detectó y cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula; Supercosil LC-18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA)) concetada a una pre-columna Security Guard (20x4.6 mm i.d., 5 $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, LC-18 Supelguard, Supelco), siguiendo la metodología descrita por Urano y col. (1992) y Hayashi y Yoshizawa (2005) con algunas modificaciones. La fase móvil consistía en metanol 85% (v/v) (diluyente A), metanol 85%, 4mM  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (v/v) (diluyente B) y ácido acético 0,1% (v/v) (diluyente C) con un gradiente de elución de: 100% A a 100% B (0-10 minutos), 100% B (10-12 minutos), 100% B a 100% C (12-15

minutos), 100% C (15-25 minutos), 100% C a 100% A (25-27 minutos) y 100% A (27-32 minutos). El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l, el flujo de 1 ml/minuto y el tiempo de retención de 9,6 minutos (Figura 4). El espectro de ultravioleta visible se midió desde 200 a 400 nm y presentó dos picos máximos de absorción obtenido en las muestras se compararon con el estándar puro de CPA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). El límite de detección en estas condiciones fue de 0,0001  $\mu$ g CPA/g medio cultivo.

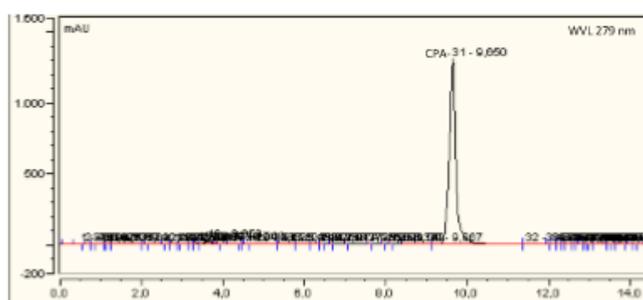


Figura 4. Cromatograma de un patrón comercial de CPA donde se puede ver que el tiempo de retención del pico del CPA se produce a los 9,6 minutos.

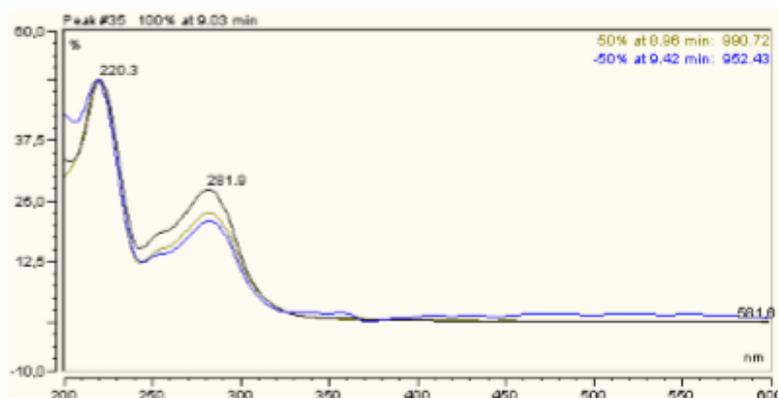


Figura 5. Espectro completo de absorción de un patrón de CPA medido a una longitud de onda de 279 nm.

La producción de OTA se detectó y cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La detección se realizó utilizando un detector de fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  330 nm;  $\lambda_{em}$  460 nm) (Dionex RF-2000, Sunnyvale, CA, USA) y una columna C18 (150 x 4,6 mm i.d., 5 mm de tamaño de partícula, Kromasil C18, Análisis Bíncos S.L., Tomelloso, España), conectada a una precolumna Kromasil C18 (10 x 4,6 mm i.d., 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, Análisis Vínicos S.L.). La fase móvil consistía en acético

0,1% (v/v), acetonitrilo 80% (v/v) con 0,1 % de acético y acético 40% (24:71:5, v/v). El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l, el flujo de 1 ml/minuto y un tiempo de retención de 4,4 minutos (Figura 6). El espectro ultravioleta característico de la OTA presentó dos picos máximos de absorción a 231,6 nm y 332,3 nm (Figura 7). El estándar de OTA para la cuantificación se obtuvo de *Aspergillus ochraceus* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). El límite de detección en estas condiciones fue de 0,0002  $\mu$ g OTA/g medio cultivo.

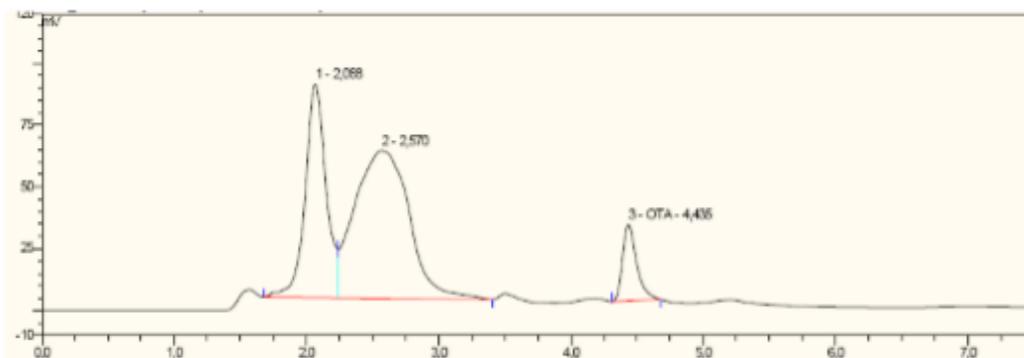


Figura 6 Cromatograma de un patrón comercial de OTA donde se puede ver que el tiempo de retención del pico de la OTA se produce a los 4,4 minutos.

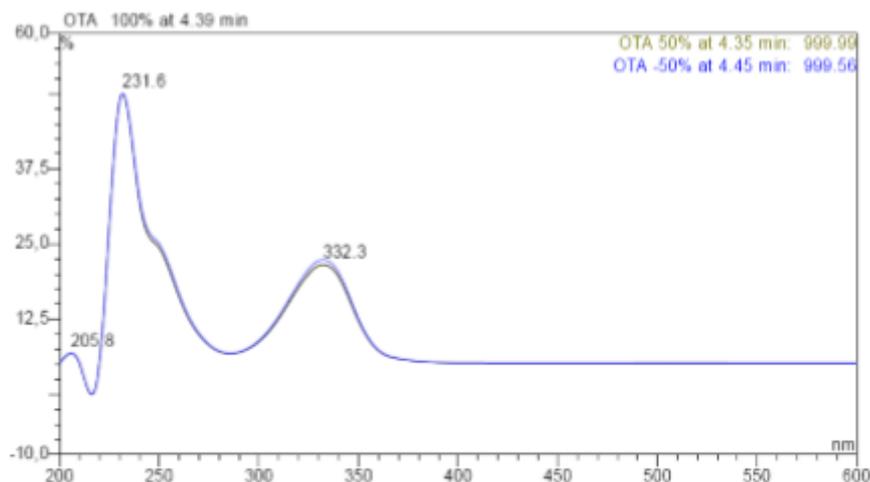


Figura 7. Espectro completo de absorción de la OTA (longitud de onda de 330 nm).

Para cuantificar la cantidad de CPA y OTA producida por las cepas, se elaboró una curva patrón con un total de ocho concentraciones de una muestra comercial de CPA (100  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml, 0,05  $\mu$ g/ml, 0,01  $\mu$ g/ml, 0,005  $\mu$ g/ml, 0,001  $\mu$ g/ml). Los picos de CPA y OTA obtenidos en cada una de las concentraciones de la curva patrón se

integraron y con ello se obtuvieron los distintos valores de área. En las figuras 8 y 9 se muestran las curvas patrón donde se representan los distintos valores de área obtenidos y los  $\mu\text{g/ml}$  de CPA y OTA a los que corresponde. A partir de estos valores se elaboró una recta de regresión. Utilizando dicha recta de regresión se calcularon las concentraciones de OTA y CPA producidas por cada una de las cepas analizadas.

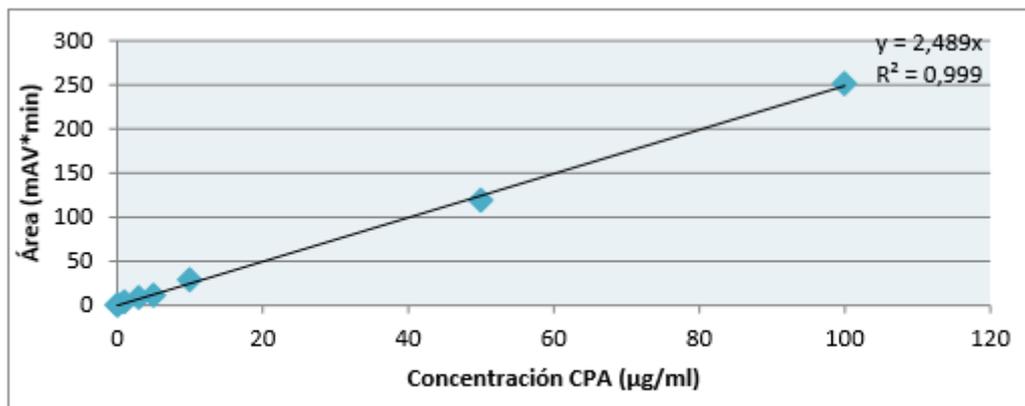


Figura 8. Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de CPA y la concentración de dichas muestras.

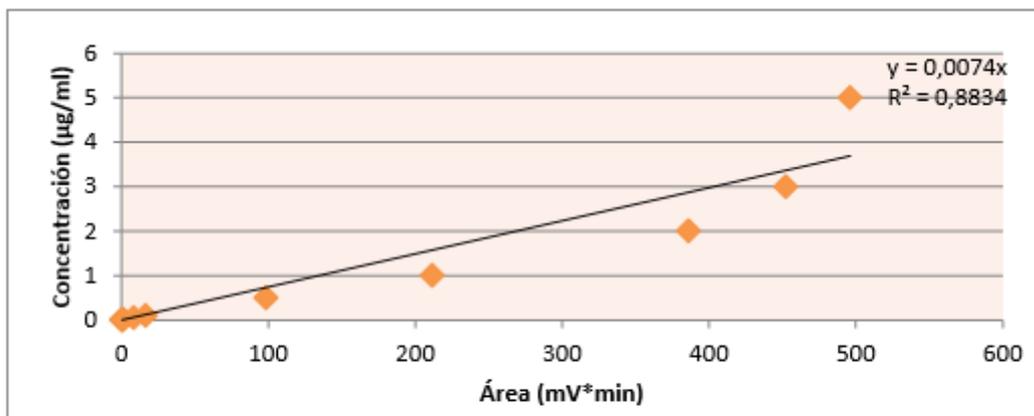


Figura 9 Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de OTA y la concentración de dichas muestras.

#### 4.4.2 Extracción, detección y cuantificación de CPA y OTA en muestras de jamón

La extracción y purificación del CPA de las muestras de jamón se realizó siguiendo la metodología descrita por Hayashi y Yoshizawa (2005) con algunas modificaciones. Las muestras de jamón /10 g de cada una) se extrajeron con acetonitrilo:bicarbonato sódico

1% (7:3, v/v, 50 ml), se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos y se filtraron usando filtros Whatman N°4. Se ajustó el pH del filtrado a pH 2 y se suspendió en 35 ml de cloroformo (1:1, v/v). Como paso adicional para purificar la muestra, la fase orgánica (50 ml) se extrajo 2 veces consecutivas con bicarbonato sódico 5% (25 ml por purificación). La fase acuosa (40 ml) se acidificó hasta pH 2 y se suspendió en 25 ml de cloroformo (1:1, v/v). Finalmente el cloroformo se evaporó al vacío en un rotovapor y la muestra se suspendió en 500 µl de metanol. El porcentaje de recuperación y el límite de detección de CPA bajo estas condiciones fue del 75% y 0,00015 µg/g, respectivamente. El líquido resultante se pasó por filtros de 0,45 µm (MillerxR SLHV 013NK, Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.) y se almacenó en otro vial a -18°C hasta la realización de los análisis cromatográficos.

Para cuantificar la cantidad de CPA existente en las muestras se elaboró una curva patrón con un total de seis concentraciones de una muestra comercial de CPA (0,3 µg/ml, 0,15 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,015 µg/ml, 0,005 µg/ml, 0,001 µg/ml). La figura 10 muestra la curva patrón donde se representan los distintos valores de área obtenidos y la concentración de CPA a la que corresponde. A partir de estos valores se elaboró una recta de regresión que permitió calcular la concentración de CPA existente en cada una de las muestras de jamón analizadas.

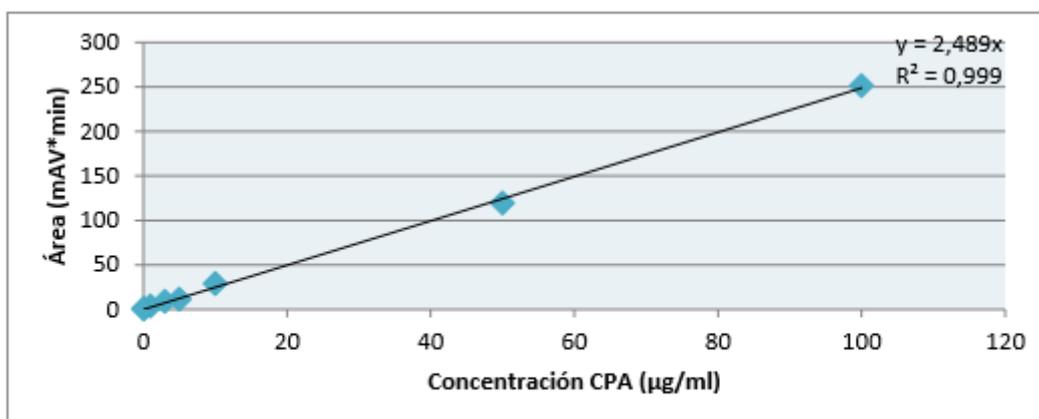


Figura 10 Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de CPA y la concentración de dichas muestras.

La extracción y purificación de la OTA de las muestras de jamón se realizó de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el proveedor del kit ELISA (Ridascreen Ochratoxin A; R-Biopharm, Italy), un método que se utilizó por primera vez en 1981 (Kuiper-

Goodman y Scott, 1989) y del que se han puesto diferentes métodos para la detección de OTA en productos cárnicos y otros productos. Para ello se adicionó 17,5 ml de HCl 1M a 10 g de la muestra picada y se realizó una extracción con 20 ml de diclorometano. El líquido resultante se analizó mediante kit ELISA. El límite de detección en estas condiciones fue de 0,00125 µg/g.

Para cuantificar la cantidad de OTA existente en el jamón se elaboró una curva patrón con un total de seis concentraciones de una muestra comercial de OTA (1800 ppt, 900 ppt, 300 ppt, 100 ppt, 50 ppt, 0 ppt). La absorbancia a 450 nm obtenida con cada una de las concentraciones de la curva patrón se integró y con ello se obtuvieron los distintos valores de absorbancia. En la Figura 11 se muestra la curva patrón donde se representan los distintos valores de absorbancia obtenidos y la concentración de OTA a la que corresponde. A partir de estos valores se elaboró una línea de tendencia polinómica. Utilizando dicha línea de tendencia se calcularon las concentraciones de OTA existentes en cada una de las muestras analizadas.

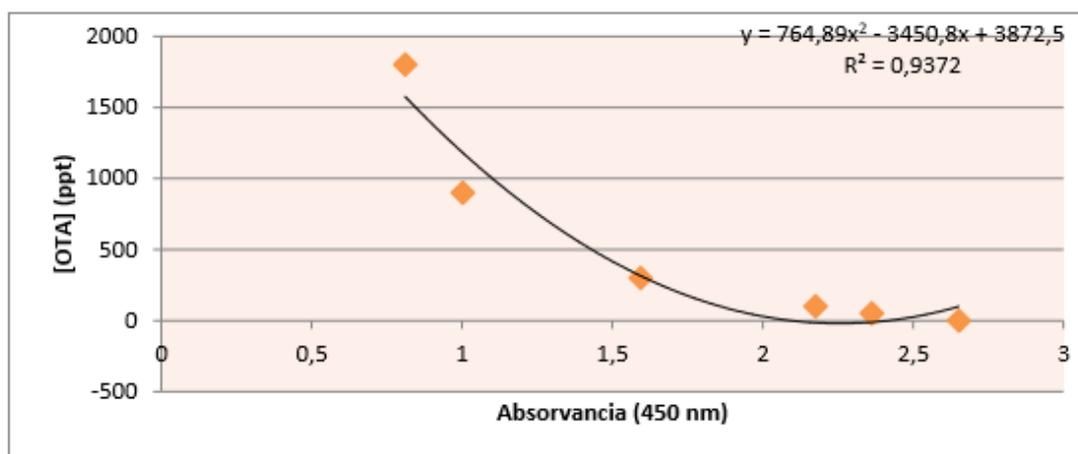


Figura 11 Curva que representa la relación polinómica entre la absorbancia obtenida en el ensayo ELISA de las muestras patrón de OTA y la concentración de dichas muestras.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### **5.1 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA Y OTA *IN VITRO***

Estos resultados están relacionados con el estudio desarrollado en el apartado metodología (Alapont Gutiérrez, 2015): En este apartado se ha fijado como objetivo principal estudiar la capacidad de producir CPA y OTA *in vitro* de las cepas identificadas en el estudio.

#### **5.1.1 Detección y cuantificación de CPA *in vitro***

En la figura 12 se muestra el cromatograma completo y el espectro de absorción de una muestra positiva de CPA. Tal y como se puede observar en el cromatograma, el pico de CPA apareció a un tiempo de retención de 9,6 minutos. Por otra parte, se puede observar el espectro característico del CPA que presenta dos picos máximos de absorción a una longitud de onda 279 nm.

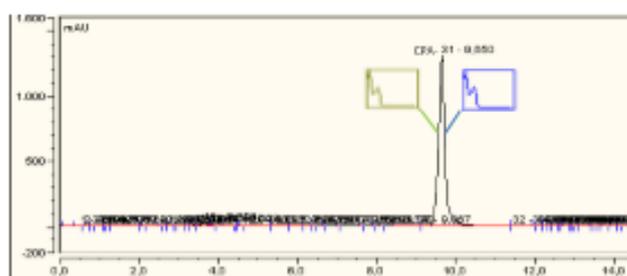


Figura 12. Cromatograma de una de las muestras inyectadas. Se observa un pico de CPA a 9,650 minutos. Se observan espectros de absorción característicos (longitud de onda de 279 nm), lo que confirma que dicho pico corresponde con el CPA.

De las 74 cepas analizadas, un 37,84% (28 cepas) resultaron productoras de CPA, de las cuales 13 (46,43%) lo hicieron a los 14 días de incubación, 15 (53,57%) a los 21 días de incubación y 7 cepas (25%) produjeron la micotoxina indistintamente a los 14 y 21 días de incubación. Todas las cepas productoras de CPA pertenecían al género *Penicillium*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones en las que el género *Penicillium* fue la principal fuente de contaminación de CPA en jamón curado y otros productos cárnicos (Bailly y col., 2005; López-Díaz y col., 2001; Moldes-Anaya y col., 2009; Núñez y col., 2007; Soriano del Castillo, 2007). Del mismo modo, en relación al tiempo necesario para producir CPA, algunas cepas dieron positivo a los 14 días de incubación pero posteriormente el análisis a los 21 días dio negativo, lo que podría sugerir una posible degradación del CPA en otros metabolitos. A este respecto, el

trabajo realizado por Bailly y col. (2005) en el que evaluaron la estabilidad del CPA en el jamón curado contradice el resultado obtenido, ya que éste concluye que el CPA permanece estable durante más de 192 horas bajo temperaturas entre 4 y 20°C.

### 5.1.2 Detección y cuantificación de OTA *in vitro*

En la figura 13 se muestra el cromatograma completo y los espectros de fluorescencia y ultravioleta de una muestra positiva de OTA. Tal y como se puede observar en el cromatograma de fluorescencia, el pico de OTA apareció a un tiempo de retención de 4,392 minutos. Por otra parte, se puede observar espectro de ultravioleta característico de la OTA que presenta dos picos máximos de absorción a 231,6 nm y 332,3 nm. La detección mediante ultravioleta es menos sensible que la detección por fluorescencia, pero nos aporta la seguridad que el pico que estamos observando se corresponde con la sustancia analizada. Mediante este tipo de comprobación se pueden verificar aquellos picos de fluorescencia que pudieran presentar dudas y confirmar que se trata de OTA y no de otra sustancia que también produce fluorescencia a la misma longitud de onda.

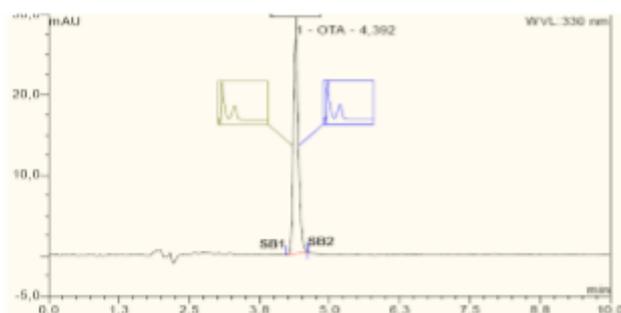


Figura 13. Cromatograma de una de las muestras inyectadas. Se observa un pico de OTA a 4,392 minutos. Se observan espectros de absorción característicos (longitud de onda de 330 nm), lo que confirma que dicho pico corresponde con la OTA.

Respecto a la producción de OTA, de las 74 cepas analizadas un 14,86% (11 cepas) resultaron productoras de OTA, de las cuales 6 (54,54%) lo hicieron a los 14 días de incubación, 5 (45,45%) a los 7 días, y 2 cepas (18,18%) producían OTA indistintamente a los 7 y 14 días de incubación, perteneciendo todas las cepas productoras de OTA al género *Penicillium*. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Xinghong y col. (2006) en los que un porcentaje de cepas ligeramente superior resultaron ser ocratoxigénicas. La identificación de cepas productoras de OTA en jamón y otros productos cárnicos también se ha descrito en otros trabajos (El-Kady y col., 1994; Núñez y col., 2002; Spotti y col., 2001a; Wu y col., 1974).

## **5.2 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA Y OTA EN JAMÓN**

Tomando como referencia el trabajo de Alapont Gutiérrez (2015): En este apartado se ha fijado como objetivo principal detectar y cuantificar la contaminación de CPA y OTA en 10 muestras comerciales de jamón.

### **5.2.1 Detección y cuantificación de CPA en jamón**

Se detectó CPA en 8 de las 10 muestras analizadas, con valores comprendidos entre 0,0362 y 2,4955  $\mu\text{g/g}$  de jamón. Dichos resultados coinciden con los obtenidos en diversos trabajos en los que también describieron la presencia de CPA en jamón curado y otros productos cárnicos. En este sentido, Bailly y col. (2005) detectaron muestras de jamón curado contaminadas con dicha micotoxina, alcanzando un nivel máximo de contaminación de 50  $\mu\text{g/g}$ . Del mismo modo, el trabajo realizado por Ostrý y Polster (1989) también obtuvo resultados similares. Así, detectaron dicha micotoxina en 6 productos alimenticios comerciales diferentes, entre los cuales se encontraba el salami, con una concentración máxima de 500  $\mu\text{g/g}$ . Por otro lado, es necesario indicar que, en todas las muestras positivas de CPA del estudio se habían aislado cepas productoras de esta micotoxina *in vitro* durante la elaboración de dichos perniles. Los resultados podrían indicar que la contaminación de CPA observada en las muestras de jamón fue consecuencia de la presencia de biota fúngica productora de dicha micotoxina durante su elaboración. Así, este hecho coincidiría con el estudio realizado por Bailly y col. (2005) en el que atribuyen la presencia de CPA, detectada en diversas muestras de jamón curado, al crecimiento de cepas toxigénicas de *Penicillium* sobre la superficie de las mismas. Por ello, el elevado porcentaje de muestras de jamón contaminadas con CPA era un resultado esperado ya que un elevado porcentaje de las cepas aisladas durante el proceso de elaboración, concretamente un 37,84%, mostró capacidad de producir CPA *in vitro*.

### **5.2.2 Detección y cuantificación de OTA en jamón**

En relación a la detección y cuantificación de OTA, se detectó dicha micotoxina en 7 de las 10 muestras analizadas, con valores comprendidos entre 2,1 y 11,6  $\mu\text{g/kg}$  de jamón. Asimismo, es necesario señalar que todas las muestras contaminadas con OTA superarían el límite máximo que estaba establecido en 1  $\mu\text{g/kg}$  para productos cárnicos en la legislación italiana (no vigente en la actualidad). Estos resultados coinciden con

los obtenidos en los diversos trabajos en los que también detectaron OTA en un elevado porcentaje de las muestras analizadas de jamón curado y otros productos cárnicos, algunas de ellas superando concentraciones de 1 µg/kg (Escher y col., 1973; Gareis y Scheuer, 2000; Jiménez y col., 2001; Pietri y col., 2006 y 2011; Sharman y col., 1992). En este sentido, Toscani y col. (2007) investigaron la presencia de OTA en muestras comerciales de jamón curado y jamón ahumado, detectando la presencia de dicha micotoxina en el 50% de los productos muestreados. Asimismo, los niveles de contaminación de OTA obtenidos en dicho resultado estaban comprendidos entre 0,11 y 7,28 µg/kg. También, Chiavaro y col. (2002) estudiaron la presencia de OTA en 42 muestras de jamón curado, 21 de ellas obtenidas tras 6 meses de maduración y las 21 restantes obtenidas tras una maduración de 12 meses. En este caso, se detectaron OTA en el 66,66% de las muestras de jamón con 6 meses de maduración y en el 57,14% de las muestras de jamón con 12 meses de maduración, de las cuales el 57,69% presentó un nivel de contaminación superior a 1 µg/kg. La Tabla 6 muestra los resultados de detección y cuantificación de CPA y OTA de cada una de las muestras de jamón analizadas.

Tabla 6. Detección y cuantificación de OTA y CPA en muestras de jamón.

Código muestra	Procedencia	OTA (µg/g)	CPA (µg/g)	Especies toxigénicas identificadas <sup>1</sup>
M1	S2	0,0116	1,1175	<i>P. atramentosum</i> (H09-86); <i>P. verrucosum</i> (H09-121)
M2	S2	0,0087	0,4345	<i>P. chrysogenum</i> (H09-100); <i>P. commune</i> (H09-99)
M3	S1	<LD <sup>2</sup>	<LD <sup>2</sup>	<i>P. chrysogenum</i> (H09-35)
M4	S1	0,0043	1,6431	<i>P. commune</i> (H09-39)
M5	S2	0,0100	0,9732	<i>P. commune</i> (H09-90)
M6	S2	0,0077	2,4955	<i>P. commune</i> (H09-103); <i>P. commune</i> (H09-93)
M7	S2	0,0088	1,3654	<i>P. polonicum</i> (H09-98)
M8	S1	<LD <sup>2</sup>	<LD <sup>2</sup>	ND <sup>3</sup>
M9	S1	0,0021	0,6858	<i>P. commune</i> (H09-27)
M10	S1	<LD <sup>2</sup>	0,0362	<i>P. echinulatum</i> (H09-34)

<sup>1</sup>Las cepas resaltadas en rojo fueron productoras de OTA, las resaltadas en azul fueron productoras de CPA y las resaltadas en verde fueron productoras de OTA y CPA.

<sup>2</sup>Límite de Detección OTA: 0,00125 µg/g; Límite de Detección CPA: 0,00015 µg/g

<sup>3</sup>No detectada

## 6. CONCLUSIONES

Con esta revisión bibliográfica, tras la búsqueda de artículos científicos relacionados con la producción de micotoxinas en jamón, una de las conclusiones es que es muy poco probable la producción de este tipo de toxinas durante el proceso de maduración del jamón.

Otra conclusión que se puede obtener es que aunque se puedan obtener resultados positivos en cuanto a la presencia de micotoxinas (como se aprecia en el apartado de resultados y discusión) las cantidades obtenidas casi nunca serán lo suficientemente altas como para causar daño al ser humano.

Se suelen tomar pocas muestras de diferentes lotes para analizar ya que es un procedimiento bastante caro, y se obtiene que la mayor parte de los aislamientos pertenecen a los géneros *Penicillium* (65,45%), *Aspergillus* (15,89%) y *Cladosporium* (13,81%). De forma general se puede concluir que la contaminación de los jamones podría deberse a la presencia de los hongos toxigénicos en la superficie del jamón.

### **6.1 Conclusions**

On this literature review, after the searching of some scientific articles related to the production of mycotoxins in ham, one of the conclusions is that the production of these toxins is not very frequent during the ham maturation

Although you can have positive results in the presence of mycotoxins (as we have seen in the results and discussion part), the amount of mycotoxins will never be so high to cause harm to the people.

A few samples are usually taken from different lots because the process is very expensive, and most of the isolations correspond to fungus belonging to *Penicillium* (65,45%), *Aspergillus* (15,89%) and *Cladosporium* (13,81%) genres. In general, we could conclude that the ham contamination could be produced because of the presence of toxigenic fungus on the surface of the ham.

## 7. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

Al haber realizado este proyecto, me he dado cuenta de la importancia de la investigación y de la revisión bibliográfica de diferentes artículos de cara a obtener un resultado a lo largo de este proceso.

Se trata de la última asignatura de la carrera, aunque eso no le resta dificultad ya que engloba gran parte de los conocimientos que he ido obteniendo a lo largo de los años en la carrera. Como base me ha servido mucho la elaboración de las Prácticas Externas en un secadero de jamones (Jamones Velázquez) y en parte también como inspiración a la hora de proponer el tema de este proyecto.

Dada la importancia de esta asignatura, entiendo que podría ser apropiado darle mayor peso en cuanto a créditos que al resto de asignaturas del Grado, ya que engloba la gran mayoría de conocimientos que se imparten en la carrera.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Asensio. Bermúdez, J.J. Córdoba, M.A. Núñez, F. Rodríguez, M.M. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* 32, (1996), 185-197.
- Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.
- Boletín de innovación del sector del cerdo ibérico. Boletín N° IX. Noviembre 2012.
- Reglamento (CE) No 123/2005 de la comisión de 26 de enero de 2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 466/2001 con respecto a la ocratoxina A.
- Reglamento (CE) No 401/2006 de la comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.
- Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.
- Reglamento (CE) No 509/2006 del consejo de 20 de marzo de 2006 sobre las especialidades tradicionales garantizadas de los productos agrícolas y alimenticios.
- Gallardo Broncano, G. Hernández León, A. Martín González, A. Ruiz-Moyano Secode Herra, S. Uso de levaduras autóctonas como biocontrol de la población de mohos toxigénicos en el jamón ibérico. *La agricultura y la ganadería extremeñas*. 2011.
- Arias Rodríguez, B. Calvo Torras, M<sup>a</sup> de los Ángeles. Hongos y micotoxinas: su posible incidencia en dietética infantil. Departamento de microbiología. Facultad de Farmacia de Barcelona.
- López de Goicoechea, A. Especies fúngicas micotoxigénicas en productos cárnicos embutidos secos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. Julio de 2010.
- Rodríguez Marín, A. Caracterización de proteínas con actividad antifúngica producidas por *Penicillium chrysogenum*. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.

- Esteban Franco, Alexandre. *Aspergillus* Sección *Nigri*: Estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxigénicas. Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Velázquez González, C.A. Análisis de micotoxinas aminopolihidroxiladas. Universitat de Lleida.
- Gimeno, A. Ligia Martín, M. Riesgos de Micotoxicosis que algunas Micotoxinas (Como contaminantes de los Alimentos) Pueden Provocar en Humanos.
- Arroyo-Manzanares, N. Gámiz-Gracia, L. García-Campaña, A.M. Huertas-Pérez, J.F. Control de micotoxinas en alimentos. Boletín Graseqa N°7. Enero 2004.
- Alapont Gutiérrez, C. Caracterización enzimática, toxigénica y molecular de hongos filamentosos aislados en jamón D.O.P. de Teruel. Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Cardenal Herrera-CEU. Valencia. 2015.
- Acosta Guerrero, R. Selección de *Penicillium* productores de péptidos antifúngicos para su utilización en productos cárnicos madurados. Departamento de Zootecnia. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres. 2006.
- Comi, G. Iacumin, L. Orlic, S. Redzepovic, S. Urso, R. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. International Journal of Food Microbiology. 96, (2004), 29-34.
- Buxadé Carbó, C. Porcino ibérico. Ed. Mundi –Prensa.
- Stephen J. Forsythe. Alimentos seguros: Microbiología. Ed. Acribia, S.A.
- Espíndola Figueroa, S. Micotoxinas y Micotoxicosis en el ganado bovino lechero. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo.
- Documento de requisitos mínimos de control de las características específicas del *Jamón Serrano*. Elaborado por el M.A.P.A. Capítulo 4.

- Delgado Perón, J. Control de mohos toxigénicos mediante la proteína PgAFP. Influencia en el metabolismo, proteoma y síntesis de micotoxinas. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. IPROCAR (Instituto Universitario de Investigación de Carne y Productos Cárnicos). Universidad de Extremadura. 2016.
- Sánchez Molinero, F. Modificaciones tecnológicas para mejorar la seguridad y calidad del jamón curado. Universitat de Girona. 2003.
- Asensio. Bermúdez, J.J. Córdoba, M.A. Núñez, F. Rodríguez, M.M. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* 29, (1996), 271-280.
- Battilani, P. Camardo Leggieri, M. Formenti, S. Simoncini, N. Toscani, T. Virgili, Roberta. Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. *Toxins* ISSN 2072-6651. 1 February 2012.
- Asefa D.T. Kure C. F. Gjerde R. O. L. S. Omer M. K. Nesbakken, T. Skaar, I. A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. *Food Control*. 22, (2011), 831-837.
- Asefa D.T. Kure C. F. Gjerde R. O. L. S. Omer M. K. Nesbakken, T. Skaar, I. Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International Journal of Food Microbiology*. 140, (2010), 131–135.

## AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, por todo el apoyo que me han dado durante estos años a pesar de todas las dificultades encontradas, ya que nunca han dejado de creer en mí y me han dado su plena confianza, así como al resto de la familia, ya que sin ellos hubiera sido imposible poder terminar esta aventura.
- A José Antonio Beltrán, por toda la paciencia que ha tenido conmigo y por toda la ayuda que me ha dado para terminar este proyecto a tiempo.
- A Francisco Malo, Responsable de Calidad de Jamones Velázquez, por el trato recibido en la realización de las Prácticas Externas y por ayudarme en las posibles opciones para realizar este trabajo.
- A todos mis compañeros de CTA pero sobre todo a Fernando Aznar, Pasqual Almela, Eduardo Atienza, Oscar Valenzuela y Diego Torrecilla ya que no me llevo 5 compañeros, sino que me llevo 5 amigos para toda la vida con los que confío no perder el contacto nunca y seguir festejando como sabemos.
- A mis amigos de toda la vida del instituto ya que sin su apoyo esto tampoco hubiera sido posible y son un ejemplo a seguir para mí tanto dentro como fuera de las aulas.