

Noemi Bervis Semilanelue

# Investigación de aflatoxinas en leche y en productos destinados a la alimentación animal

Departamento  
Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es  
Ariño Moneva, Agustín  
Carramiñana esteban, Juan José

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

INVESTIGACIÓN DE AFLATOXINAS EN LECHE Y  
EN PRODUCTOS DESTINADOS A LA  
ALIMENTACIÓN ANIMAL

Autor

Noemi Bervis Semilanelue

Director/es

Ariño Moneva, Agustín  
Carramiñana esteban, Juan José

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2019





**Universidad**  
**Zaragoza**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

**INVESTIGACIÓN DE AFLATOXINAS EN LECHE Y EN PRODUCTOS  
DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN ANIMAL**

Memoria

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza

Presenta

**D<sup>a</sup> Noemi Bervis Semilanelue**

Zaragoza, Abril 2019

Dirigida por los profesores Doctores: D. Agustín Ariño Moneva

D. Juan José Carramiñana Esteban





Departamento de  
Producción Animal  
y Ciencia de los Alimentos  
**Universidad Zaragoza**

**DR. AGUSTÍN ARIÑO MONEVA Y DR. JUAN JOSÉ CARRAMIÑANA ESTEBAN,**

Profesores del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza

**CERTIFICAN,**

Que el trabajo contenido en la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada:

“Investigación de aflatoxinas en leche y en productos destinados a la alimentación animal”, realizada por D<sup>a</sup>. NOEMI BERVIS SEMILIANELUE, ha sido desarrollado bajo nuestra dirección y se corresponde y adecúa al proyecto de tesis aprobado por el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmamos este certificado en Zaragoza, a 5 de abril de 2019.

Fdo.: Agustín Ariño Moneva

Fdo.: Juan José Carramiñana Esteban



*La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por el Proyecto AGL2014-57069-R del Ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (MINECO-FEDER), así como por el Grupo de Investigación de Referencia A06\_17R "Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria" del Gobierno de Aragón y por último la autora del trabajo ha contado con una beca FPU para la realización de la tesis doctoral del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.*



*A Alíah*

*A Jean Elie*

*A mi Familia*



## **AGRADECIMIENTOS**

---



Durante este recorrido son muchas las personas que han estado presentes y me han ayudado en el desarrollo de esta tesis, mi más sincero agradecimiento, sin ustedes no hubiera sido posible este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Agustín Ariño, director de esta tesis doctoral, la oportunidad que me ha brindado de trabajar en su grupo de investigación e iniciarme en el apasionante mundo de las micotoxinas, por todo su apoyo, comprensión, por guiarme y aconsejarme, por su paciencia en todo momento y por poner ese toque de humor al Departamento mediante canciones y frases muy suyas.

A el Dr. Juan José Carramiñana, director de esta tesis por su dedicación y apoyo en cada momento.

A las Dras. Marta Herrera y Susana Lorán, miembros de nuestro grupo de investigación, gracias por toda la ayuda y colaboración en el laboratorio, por hacer que el trabajo de laboratorio sea muy ameno y por siempre poner ese toque divertido y de humor incluso en los momentos en que no todo era como esperábamos. Muchísimas gracias ha sido un honor trabajar con ustedes durante todo este tiempo.

A mis compañeros de la Unidad de Bromatología Miriam, Laura, Patricia, Paula, Héctor y Natalia, hoy algunos de ellos ya convertidos en doctores, gracias por estar en los momentos buenos y en los no tan buenos, por los momentos de cafés para distracción cuando los ánimos no estaban muy arriba y siempre tener una palabra de aliento.

A Nieves gracias por hacernos la vida más fácil en el laboratorio.

También quiero agradecer a mis antiguos compañeros de la Unidad, pero no menos importantes, con quienes me he iniciado en el laboratorio de micotoxinas, en especial a Isabel Giménez quien estuvo conmigo en los momentos que no sabía nada de las aflatoxinas,

gracias por tu amistad y apoyo, a Elena Ferruz y Agostina Rodríguez. Gracias chicas porque ustedes forman parte de este trabajo.

De igual modo gracias al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades que me otorgó la oportunidad de realizar esta tesis con la Beca FPU de Formación de Profesorado Universitario.

A mis hermanas por elección Vanesa Flores, Vanesa Sánchez, Gabriela Quijano y Heydi Balanta, por las palabras de aliento y siempre intentar subir los ánimos.

A la Universidad Autónoma de Santo Domingo y al Instituto de Microbiología y Parasitología por el apoyo institucional en los momentos de mis inicios como doctorando.

A la Mtra. Yovany Cedano, en su día directora de la Escuela de Microbiología y Parasitología de la Universidad Autónoma de Santo Domingo, Rep. Dominicana. Gracias por siempre estar ahí a pesar de la distancia y siempre creer en mí.

A mis padres, Segue y Leonita y mis hermanos, César, Esther, Anabel, Digna, Débora e Isaac, gracias por estar siempre a mi lado, incluso en la distancia y por siempre haber creído en mi de manera incondicional.

A mi hija Alíah, por darme la fuerza para continuar cada día.

Por último, pero no menos importante, agradecerte a ti Jean Elie, por tu cariño, por tu entrega y por vivir esta etapa con la misma intensidad que yo, por tus ánimos y siempre ver el lado positivo de todo y sobre todo por estar siempre a mi lado y hacerme tan feliz.

# ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
LISTA DE ACRÓNIMOS .....	xiii
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2. <b>OBJETIVOS</b> .....	13
3. <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1. Mohos del género <i>Aspergillus</i> .....	17
3.2. Aflatoxinas.....	20
3.2.1. Aspectos generales de las aflatoxinas .....	20
3.2.2. Estructura y propiedades físico-químicas de las aflatoxinas .....	25
3.3. Toxicidad y metabolismo de las aflatoxinas.....	29
3.4. Efectos tóxicos de las aflatoxinas en rumiantes .....	32
3.5. Impacto de las aflatoxinas en la salud humana.....	35
3.6. Incidencia de micotoxinas en alimentación animal .....	40
3.6.1. Aflatoxinas y productos para alimentación animal.....	46
3.6.2. Aflatoxinas y leche.....	51
3.7. Prevención y detoxificación de aflatoxinas .....	55
3.7.1. Estrategias para la prevención y control de aflatoxinas .....	55
3.7.2. Ácidos fenólicos como antifúngicos naturales.....	57
3.7.3. Detoxificación de aflatoxinas.....	59
3.7.4. Reductores de la contaminación de los piensos por aflatoxinas .....	61

3.7.4.1. Adsorbentes inorgánicos .....	65
3.7.4.2. Adsorbentes orgánicos .....	67
3.8. Legislación sobre aflatoxinas en alimentos y piensos.....	69
3.9. Métodos de análisis de aflatoxinas .....	73
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
4.1. Materiales .....	83
4.2. Equipos e instrumentos de trabajo .....	84
4.3. Reactivos, medios de cultivo y productos de referencia.....	86
4.4. Puesta a punto y optimización de los métodos analíticos .....	88
4.5. Validación de los métodos analíticos.....	90
4.5.1. Especificidad.....	91
4.5.2. Linealidad y calibración .....	92
4.5.3. Sensibilidad .....	93
4.5.4. Exactitud (Recuperación) .....	94
4.5.5. Precisión, repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	96
4.5.6. Participación en estudios interlaboratorios.....	97
4.6. Métodos de análisis optimizados y validados .....	98
4.7. Muestreo y procedencia de las muestras .....	102
4.7.1. Muestras de raciones alimenticias completas y de leche cruda de vaca .....	102
4.7.2. Muestras de materias primas a base de maíz.....	107
4.8. Estudios in vitro con antifúngicos naturales (ácidos fenólicos) .....	108
4.8.1. Estudio en caldo extracto de levadura y sacarosa .....	108
4.8.2. Estudio en granos de maíz.....	112
4.9. Evaluación de adsorbentes de aflatoxinas.....	113
4.10. Análisis estadístico.....	115

5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	119
5.1.	Optimización de los métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas ....	119
5.1.1.	Optimización de las condiciones cromatográficas.....	121
5.2.	Validación los métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas.....	125
5.2.1.	Especificidad de los métodos de análisis de aflatoxinas.....	125
5.2.2.	Linealidad de los métodos de análisis de aflatoxinas .....	130
5.2.3.	Sensibilidad de los métodos de análisis de aflatoxinas.....	132
5.2.4.	Exactitud (recuperación) de los métodos de análisis de aflatoxinas.....	134
5.2.5.	Precisión de los métodos de análisis de aflatoxinas.....	137
5.2.5.1.	Precisión de la inyección manual.....	137
5.2.5.2.	Repetibilidad intralaboratorio.....	139
5.2.5.3.	Reproducibilidad intralaboratorio.....	140
5.2.6.	Participación en un ejercicio de intercomparación.....	141
5.3.	Aflatoxinas en raciones alimenticias completas y en leche cruda.....	144
5.3.1.	Aflatoxinas en raciones alimenticias completas.....	144
5.3.2.	Aflatoxinas en leche cruda de vaca .....	154
5.4.	Tasa de transferencia de aflatoxinas de las raciones completas a la leche.....	163
5.5.	Aflatoxinas en materias primas a base de maíz.....	169
5.6.	Prevención del crecimiento fúngico y síntesis de aflatoxinas.....	175
5.6.1.	Actividad antifúngica de los ácidos fenólicos.....	175
5.6.2.	Actividad antiaflatoxigénica de los ácidos fenólicos .....	178
5.7.	Capacidad de los adsorbentes para la fijación de aflatoxina B1.....	181
6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	187
7.	<b>CONCLUSIONS</b> .....	191
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	197

9.	<b>RESUMEN</b> .....	243
10.	<b>SUMMARY</b> .....	245
11.	<b>ANEXO</b> .....	249

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un conidióforo de <i>Aspergillus</i> (1a); microfotografía de un conidióforo de <i>Aspergillus flavus</i> (1b); fotografía de una mazorca de maíz infectada por <i>A. flavus</i> .....	14
Figura 2. Ciclo de vida de <i>A. flavus</i> en planta de maíz.....	15
Figura 3: Estructuras químicas de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1.....	24
Figura 4. Vías de biotransformación de AFB1.....	26
Figura 5. Prevalencia de micotoxinas en productos para alimentación animal.....	39
Figura 6. Ejemplos de algunos ácidos fenólicos presentes en alimentos.....	54
Figura 7. Estructura tridimensional de las montmorillonitas.....	62
Figura 8. Procedimiento de análisis de AFB1 en muestras de alimentación animal.....	93
Figura 9. Procedimiento de análisis de AFM1 en leche cruda de vaca.....	94
Figura 10. Procedimiento de análisis de aflatoxinas totales en caldo YES.....	95
Figura 11. Esquema de trabajo de los ensayos realizados para la detección de aflatoxinas en diferentes matrices.....	96
Figura 12. Muestras de ración unifeed (a); pienso completo (b); ensilado de maíz (c).....	100
Figura 13. <i>Aspergillus parasiticus</i> : aspecto de las colonias en PDA.....	103
Figura 14. Crecimiento de <i>Aspergillus</i> en agar PDA inclinado incubado a 25°C durante 7 días.....	103
Figura 15. Confirmación de recuento de número de esporas por mL en PDA.....	104

Figura 16. Fotografías del proceso de evaluación del efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento del moho: peso del micelio seco.....	105
Figura 17. Cromatograma del patrón de aflatoxinas a 10 µg/mL (B1 y G1) y 3 µg/mL (B2 y G2).....	118
Figura 18. Cromatograma del patrón de aflatoxina M1 a 200 ng/L.....	119
Figura 19. Cromatograma de los blancos analíticos de los tres métodos optimizados.....	120
Figura 20. Cromatogramas de muestras blanco: A) productos para alimentación animal para AFB1, B) leche para AFM1 y C) caldo YES para aflatoxinas.....	121
Figura 21. Recta de calibrado mediante patrón externo de una mezcla de aflatoxinas.....	123
Figura 22. Recta de calibrado mediante patrón externo de AFM1.....	124
Figura 23. Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AF totales de los diferentes participantes.....	134
Figura 24. Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AFB1 de los diferentes participantes.....	134
Figura 25. Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AFB2 de los diferentes participantes.....	135
Figura 26. Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AFG1 de los diferentes participantes.....	135
Figura 27. Cromatogramas de: (A) mezcla patrón de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2; (B) alimento para ganado contaminado con aflatoxinas B1 y B2.....	142

Figura 28. Cromatogramas de: (A) muestra negativa de leche; (B) solución patrón de AFM1 a 75 ng/kg; (C) leche de vaca contaminada con AFM1 a 50,2 ng/kg.....	148
Figura 29. Gráfico de correlación de valores entre AFB1 y AFM1.....	159
Figura 30. Cromatograma de una muestra de ensilado de maíz positiva a AFB1.....	164
Figura 31. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de <i>A. parasiticus</i> en medio líquido.....	168
Figura 32. Producción de aflatoxinas totales por <i>A. parasiticus</i> .....	171
Figura 33. Porcentajes de fijación de aflatoxina B1 con los adsorbentes ensayados a distintos valores de pH en soluciones buffer.....	174



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales aflatoxinas, sus metabolitos y las especies productoras .....	22
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de las aflatoxinas .....	23
Tabla 3. Efectos y sintomatología producidos por AFB1 en rumiantes .....	30
Tabla 4. Contenidos máximos de aflatoxinas en productos alimenticios según el Reglamento (CE) n.º 1881/2006 (versión consolidada) .....	66
Tabla 5. Contenidos máximos de aflatoxina B1 en productos destinados a la alimentación animal .....	67
Tabla 6. Media y rango de niveles máximos tolerables ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) para las aflatoxinas y número de países en los cuales está regulado .....	68
Tabla 7. Métodos vigentes de análisis de aflatoxinas adoptados por la Organización Internacional de Normalización .....	70
Tabla 8. Criterios de funcionamiento para las aflatoxinas .....	74
Tabla 9. Concentraciones de las soluciones de AFB1 y AFM1 para determinar las rectas de calibración.....	87
Tabla 10. Niveles de enriquecimiento de AFB1 y AFM1 en las matrices pienso, leche cruda de vaca y caldo YES.....	89
Tabla 11. Codificación de las muestras de raciones completas para el ganado .....	98
Tabla 12. Composición típica de las raciones unifeed para vacuno lechero .....	99
Tabla 13. Composición de las fases móviles ensayadas para determinar aflatoxina B1.....	114

Tabla 14. Condiciones cromatográficas para el análisis de AFB1 en productos destinados a la alimentación animal.....	115
Tabla 15. Condiciones cromatográficas para el análisis de AFM1 en leche de vaca.....	116
Tabla 16. Valores de R <sup>2</sup> y RSD% de 5 rectas de linealidad de soluciones patrones de aflatoxinas B, G y M.....	123
Tabla 17. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) (µg/kg) de las aflatoxinas objeto de estudio en cada una de las matrices investigadas.....	125
Tabla 18. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de aflatoxinas obtenidos por otros autores mediante el uso de HPLC.....	126
Tabla 19. Porcentajes de recuperación de aflatoxinas en raciones alimenticias (media ± RSD%).....	127
Tabla 20. Porcentajes de recuperación de AFM1 en leche cruda de vaca (media ± RSD%).....	127
Tabla 21. Porcentajes de recuperación de aflatoxinas en caldo YES ( $\bar{x} \pm RSD\%$ ).....	128
Tabla 22. Criterios para aflatoxinas establecidos en el Reglamento (CE) nº 401/2006.....	128
Tabla 23. Precisión de la inyección de soluciones patrón de aflatoxinas, con indicación del tiempo de retención (TR) y la señal FLD (cuentas de área).....	130
Tabla 24. Precisión en condiciones de repetibilidad (RSD <sub>r</sub> %) (n=6) para AFB1, B2, G1, G2 y M1.....	131
Tabla 25. Precisión en condiciones de reproducibilidad (RSD <sub>R</sub> %) (n=6) para AFB1, B2, G1, G2 y M1.....	132

Tabla 26. Estudio descriptivo de los valores de aflatoxina B1 en raciones completas, calculados sobre la base de un contenido de humedad del 12 %.....	138
Tabla 27. Concentración de aflatoxina B1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en los 60 lotes de productos destinados a la alimentación animal, expresada sobre 12% de humedad y en materia seca.....	140
Tabla 28. Estudio descriptivo de los valores de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca.....	147
Tabla 29. Concentración de aflatoxina M1 ( $\text{ng}/\text{kg}$ ) en los 60 lotes de leche cruda de vaca y tasa de transferencia de aflatoxinas del alimento del ganado a la leche.....	149
Tabla 30. Tasa de transferencia de aflatoxinas desde las raciones alimenticias ( $\mu\text{g}$ de AFB1 por kg de materia seca) hasta la leche cruda de vaca ( $\text{ng}$ de AFM1 por kg de leche).....	158
Tabla 31. Prevalencia de AFB1 en materias primas a base de maíz, expresada en porcentaje de positividad y rango de concentraciones.....	136



## LISTA DE ACRÓNIMOS

<b>%:</b> Porcentaje	<b>CE:</b> Comisión Europea
<b>(r):</b> Coeficiente de correlación	<b>CECT:</b> Colección Española de Cultivos Tipo
<b>(R<sup>2</sup>)</b> Coeficiente de determinación	<b>DAD:</b> Detector de red de diodos
<b>µg:</b> Microgramos	<b>DL:</b> Dosis letal
<b>µL:</b> Microlitros	<b>DNA:</b> Ácido desoxirribonucleico
<b>µm:</b> Micrómetro o micra	<b>EE.UU.:</b> Estados Unidos
<b>AF:</b> Aflatoxina	<b>EFSA:</b> European Food Safety Authority
<b>AFB1:</b> Aflatoxina B1	<b>ELIKA:</b> Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria
<b>AFB2:</b> Aflatoxina B2	<b>FAO:</b> Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>AFG1:</b> Aflatoxina G1	<b>FDA:</b> Food and Drug Administration
<b>AFG2:</b> Aflatoxina G2	<b>FLD:</b> Detector de fluorescencia
<b>AFI:</b> Índice de riesgo de aflatoxinas	<b>GSH:</b> Glutación
<b>AFM1:</b> Aflatoxina M1	<b>GST:</b> Glutación S-transferasa
<b>AFM2:</b> Aflatoxina M2	<b>HPLC:</b> High performance liquid chromatography
<b>ALARA:</b> As Low As Reasonably Achievable	<b>HSCAS:</b> Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado
<b>AOAC:</b> Association of Official Analytical Chemists	<b>IAC:</b> Columnas de inmunoafinidad
<b>aW:</b> Actividad de agua	<b>IARC:</b> Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
<b>BMD:</b> Margen de referencia	<b>IDA:</b> Ingesta diaria admisible
<b>BPA:</b> Buenas Prácticas Agrícolas	<b>IDT:</b> Ingesta diaria tolerable
<b>BPAL:</b> Buenas Prácticas de Almacenamiento	
<b>BPF:</b> Buenas Prácticas de Fabricación	
<b>Ca<sup>+</sup>:</b> Calcio	

**ISO:** Organización Internacional de Normalización

**JECFA:** Joint Expert Committee for Food Additives of the Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization

**kg:** Kilogramos

**LC-FLD:** Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia

**LC-MS:** Cromatografía líquida de alta resolución con detector de espectrometría de masas

**LOD:** Límite de detección

**LOQ:** Límite de cuantificación

**MAPA:** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

**min:** Minutos

**mL:** Mililitros

**MMT:** Montmorillonita

**MOE:** Margen de exposición

**MS:** materia seca

**Na<sup>+</sup>:** Sodio

**NaCl:** Cloruro de sodio

**nm:** nanómetro

**NRC:** National Research Council

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PDA:** Agar Patata Dextrosa

**pg:** Picogramo

**PHRED:** Detector de derivatización fotoquímica

**RASFF:** Rapid Alert System for Food and Feed

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RSD:** Desviación estándar relativa

**TD:** Dosis tóxica

**TLC:** Cromatografía en capa fina

**TMR:** Total Mixed Ration

**UE:** Unión Europea

**YES:** Caldo extracto de levadura

**$\lambda_{Em}$ :** Longitud de onda de emisión

**$\lambda_{Ex}$ :** Longitud de onda de excitación

## **INTRODUCCIÓN**

---



## 1. INTRODUCCIÓN

Entre los problemas emergentes para la seguridad de alimentos y piensos, destaca el aumento de enfermedades de los cultivos asociado a la aparición de especies de hongos toxigénicos y sus metabolitos secundarios. Estos hongos pueden sintetizar micotoxinas, compuestos tóxicos de bajo peso molecular, que representan un grave riesgo para la salud humana y animal en todo el mundo. Los cereales son a menudo los cultivos más gravemente afectados, y como son un alimento básico tanto para personas como para animales, la presencia de micotoxinas constituye un riesgo muy prevalente. La gran atención científica y económica a nivel mundial sobre las micotoxinas, también se debe a las importantes pérdidas económicas asociadas con su impacto negativo en la salud humana, la productividad animal y el comercio internacional (Wu, 2015).

Las micotoxinas que más preocupan en la seguridad de alimentos y piensos son producidas por varias especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos hongos colonizan una gran variedad de especies de cultivo y pueden adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales. Debido a que el clima puede afectar profundamente el crecimiento, la distribución y la producción de micotoxinas, el actual cambio climático tiene el potencial de aumentar los riesgos que éstas representan para la seguridad de los alimentos y los piensos (Medina et al., 2017).

Las aflatoxinas (AF) son agentes genotóxicos y carcinógenos, que incluyen cuatro análogos estructurales principales denominados AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. Los animales alimentados con productos contaminados por aflatoxina B1, pueden transformarla en aflatoxina M1 y eliminarla por la leche, lo que supone un riesgo notable para la salud pública. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado las

aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1) como Grupo 1, carcinogénicas para los humanos (IARC, 2012). En particular se relacionan con el cáncer de hígado.

Las aflatoxinas se producen en diversos productos agrícolas por varias especies de *Aspergillus*, pero las dos especies de mayor preocupación son *A. flavus* y *A. parasiticus* (Marasas et al., 2008). La contaminación con aflatoxinas en los alimentos y los piensos es más grave en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, donde las condiciones de temperatura y humedad son óptimas para el crecimiento de los mohos aflatoxígenos (Soriano, 2007; FAO, 2011). Además del riesgo que supone la contaminación primaria del maíz con mohos toxigénicos y aflatoxinas, no hay que olvidar que las malas prácticas agrícolas, de fabricación, transporte y almacenamiento pueden conducir a un aumento en las tasas de contaminación en la fase de post-cosecha.

Hasta hace muy poco, la perspectiva europea sobre la contaminación por aflatoxinas se limitaba solo a las materias primas y alimentos importados (EFSA, 2004). Por lo tanto, se dispone de pocos datos con respecto a la contaminación por aflatoxinas en las materias primas para piensos que se originan en Europa. Sin embargo, un gran estudio realizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), señaló el problema emergente de la posible contaminación por aflatoxinas en el maíz cultivado en áreas del sur de Europa, debido al clima subtropical que había ocurrido en los últimos años (EFSA, 2007). Por lo tanto, se prevé un cambio en las áreas tradicionales de incidencia de las aflatoxinas debido al aumento de las temperaturas promedio.

A este respecto, las zonas mediterráneas se han identificado como muy susceptibles al cambio climático, caracterizado por cambios en la temperatura, los niveles de CO<sub>2</sub> y los patrones de precipitación. Con respecto a las aflatoxinas en maíz, los episodios de contaminación son más frecuentes en épocas de mucho calor y sequía, con fuertes ataques

de insectos, lo que conjuntamente puede estresar a la planta huésped y, por lo tanto, facilitar la infección por *A. flavus* (Marasas et al., 2008). No en vano, en los últimos 15 años, una serie de temporadas cálidas y secas en varios países de Europa, entre ellos Italia, Rumania, Serbia y España, han dado lugar a la aparición de aflatoxinas en el maíz utilizado para alimentación animal, así como en la leche del ganado alimentado con dichos productos contaminados (Moretti et al., 2019).

Recientemente, un estudio modelizó la posible contaminación por aflatoxina B1 en el maíz, dependiendo de las condiciones climáticas durante los próximos cien años en Europa (Battilani et al., 2012). Se analizó el riesgo de contaminación por AFB1 en tres escenarios climáticos diferentes: con la temperatura diaria promedio actual; con un aumento medio diario de la temperatura de +2 °C; y con un aumento de temperatura promedio de +5 °C. Para este propósito, se utilizó el índice de riesgo de aflatoxinas (AFI) en el maíz, que predice el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas. Los AFI varían de 0 (sin riesgo) a 200 (un alto riesgo). La temperatura del aire, la humedad relativa y los datos de lluvia se utilizaron como parámetros del modelo. De acuerdo con los resultados de dicho estudio, se espera un aumento del riesgo de contaminación por aflatoxinas en el maíz, principalmente en el escenario de + 2 °C. Específicamente, se mostró un claro aumento en el riesgo por aflatoxinas en áreas agrícolas del centro y sur de España, el sur de Italia y los Balcanes.

Por todo ello, la posible contaminación por aflatoxinas de las materias primas utilizadas en alimentación animal y de los alimentos cultivados en la UE, debe ser objeto de revisión, particularmente a la luz de los cambios potenciales en el clima. En consecuencia, la aportación de datos actuales de contaminación por aflatoxinas en materias primas (especialmente a base de maíz), piensos y leche en España, es de gran interés para evaluar el grado actual de exposición a estas toxinas en el contexto del cambio climático.

El sector lácteo en España es muy importante. Las entregas totales de leche cruda durante 2018 ascendieron a 7.110.319 Tm de leche, lo que supone un 1,3% más con respecto a 2017 (MAPA, 2019). En el mes de febrero de 2019, el censo de vacuno lechero en España era de 840.820 vacas en ordeño (>24 meses); la Comunidad Autónoma con mayor censo de vacas lecheras es Galicia, que cuenta con 329.473 animales (39 %), seguida de Castilla y León con 96.550 animales. El número total de ganaderos con entregas declaradas de leche fue de 13.630 para el mes de diciembre de 2018. Durante el año 2018, se consumieron en España un promedio de 70 kg de leche líquida por persona/año (MAPA, 2019).

La leche es un alimento principal para el crecimiento de niños y jóvenes, cuya vulnerabilidad es notable ya que son más sensibles a los efectos tóxicos que los adultos. Por tanto, la aparición de aflatoxina M1 en leche de vaca y productos lácteos, es un serio problema de seguridad alimentaria (FAO, 2004). La tasa de transferencia de aflatoxinas desde el pienso (AFB1) a la leche (AFM1), depende del nivel de contaminación, la cantidad ingerida, la duración de la exposición, el tipo de alimentación y el metabolismo de la vaca, entre otros factores. La EFSA ha estimado que la tasa de transferencia de aflatoxinas de las raciones del ganado a la leche es del 1-2% como media, aunque en ganado de alta productividad puede aumentar hasta el 6% o más (EFSA, 2004).

Las vacas lecheras de alto rendimiento, que son las que predominan en las explotaciones actuales, podrían representar una categoría de animales en la que una mayor tasa de transferencia de aflatoxina M1 a la leche, podría dar como resultado concentraciones tanto a nivel de animales individuales como de granjas, que excedan los límites actuales de la UE en leche cruda. Por tanto, se deben generar datos actuales sobre la tasa de transferencia de aflatoxinas a la leche teniendo en cuenta los sistemas de producción modernos, los

animales de alto rendimiento y las modificaciones en los sistemas de alimentación del ganado vacuno lechero.

La legislación actual de la Unión Europea (UE) tiene un enfoque restrictivo para controlar y reducir los efectos perjudiciales de las aflatoxinas, por lo que se han establecido contenidos máximos de aflatoxina B1 y de la suma total de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) en productos alimenticios, y de aflatoxina M1 en leche (Reglamento (CE) nº 1881/2006). Paralelamente, en productos destinados a la alimentación animal (materias primas y piensos) se han establecido límites máximos de aflatoxina B1 (Directiva 2002/32/CE y Reglamento (UE) nº 574/2011). Por comparación, el contenido máximo de aflatoxina M1 en leche es de 0,05 µg/kg, mientras que el contenido máximo de aflatoxina B1 en piensos compuestos para vacas lecheras es de 5 µg/kg.

Para el control de aflatoxinas en materias primas, piensos y alimentos es muy importante disponer de métodos analíticos robustos y sensibles. En laboratorios avanzados se dispone de cromatografía líquida de alta resolución con detectores de espectrometría de masas (LC-MS/MS), pero los métodos de análisis estandarizados (ISO, AOAC) para la determinación de aflatoxinas se basan en cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (LC-FLD). Cuando se quiere poner a punto y optimizar un método analítico basado en normas de referencia, siempre es necesario validarlo para las matrices objeto de estudio, en términos de sensibilidad, exactitud y precisión.

Las consecuencias económicas de la contaminación por micotoxinas son muy importantes y, a menudo, los cultivos muy contaminados por micotoxinas deben ser destruidos o destinados a usos industriales. Se sabe que la contaminación por aflatoxinas es relativamente frecuente, tanto en precosecha como postcosecha, y su eliminación es muy complicada, por lo que la mayoría de las investigaciones se centran en la prevención, como

la mejor estrategia para reducir el riesgo (Di Gregorio et al., 2014). Se han desarrollado diferentes estrategias para prevenir y reducir el riesgo por aflatoxinas en alimentación animal, que incluyen medidas antes y después de la cosecha, como las buenas prácticas agrícolas (BPA), las buenas prácticas de almacenamiento (BPAL) y las buenas prácticas de fabricación (BPF).

Asimismo, se han estudiado tecnologías de descontaminación de materias primas, basadas en diferentes tratamientos físicos, químicos y biológicos (Karlovsy et al., 2016). En la medida que sea posible, se deberían utilizar procedimientos físicos como lavado, eliminación de capas externas, clasificación, separación mecánica y segregación por densidad. Sin embargo, la eficiencia de estos tratamientos físicos depende del nivel de contaminación y la distribución de micotoxinas en todo el producto.

El uso de conservantes naturales como aditivos en alimentación animal para prevenir el crecimiento fúngico, ha sido ampliamente estudiado, enfocado principalmente a los ácidos orgánicos (y sus sales), como ácido fórmico, acético, propiónico, sórbico, benzoico y láctico (CESFAC, 2016). En nuestro laboratorio, hemos mostrado la capacidad de varios ácidos fenólicos naturales para inhibir el crecimiento de mohos del género *Fusarium*, así como la síntesis de sus micotoxinas principales (Ferruz et al., 2016). Por tanto, nos planteamos evaluar los efectos de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de mohos aflatoxigénicos y la síntesis de aflatoxinas, para estudiar su potencial como aditivos conservantes en alimentación animal.

Asimismo, una de las estrategias más utilizadas a nivel de granja es la utilización de aditivos reductores de micotoxinas en los piensos. Estos compuestos actúan disminuyendo la absorción gastrointestinal de micotoxinas, mitigando los efectos tóxicos y reduciendo la transferencia a productos de origen animal, especialmente la transferencia de aflatoxinas a

la leche (Vila-Donat et al., 2018). Por ello, nos hemos planteado investigar la capacidad de fijación de aflatoxina B1 de varios aditivos adsorbentes, que se utilizan actualmente bajo la categoría de aditivos tecnológicos antiaglomerantes.

El presente trabajo se enmarca en el proyecto AGL2014-57069-R “Aflatoxinas y cambio climático: estrategias integradas para la prevención y reducción del riesgo en la cadena alimentaria”. La autora del trabajo ha contado con una beca FPU para la realización de la tesis doctoral. Asimismo, las investigaciones se han realizado en colaboración con empresas del sector agrícola (maíz) y ganadero (vacuno lechero), así como del sector de alimentación animal (aditivos adsorbentes de micotoxinas). El trabajo conjunto entre las empresas privadas y la Universidad, ha sido determinante para llevar a cabo los objetivos propuestos. Finalmente, los resultados obtenidos contribuyen a la Red nacional sobre las micotoxinas y hongos toxigénicos y sus procesos de descontaminación (MICOFOOD).



## **OBJETIVOS**

---



## 2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis es evaluar la contaminación por aflatoxinas en productos destinados a la alimentación del ganado lechero y en la correspondiente leche cruda de vaca, lo que nos dará una idea de la posible gravedad y extensión del problema en España. Por un lado, se estudiarán las tasas de contaminación por aflatoxina B1 (AFB1) en raciones completas para vacuno lechero a base de unifeed y de pienso completo, y también se investigará la incidencia de AFB1 en materias primas a base de maíz, como maíz grano en cosecha y postcosecha, harina de maíz y ensilado de maíz. Paralelamente, se estudiarán los niveles de contaminación por aflatoxina M1 (AFM1) en leche cruda de vaca, para evaluar las tasas de transferencia de aflatoxinas, así como la posible influencia del tipo de alimentación y la estación del año.

Asimismo, la tesis plantea estrategias de prevención y reducción de aflatoxinas en la alimentación animal, como la utilización de sustancias naturales con actividad antifúngica y antiaflatoxigénica, así como el uso de adsorbentes, tanto para la reducción de las micotoxinas en las raciones alimenticias como de la tasa de transferencia a la leche .

Los **objetivos específicos** planteados en la siguiente tesis doctoral fueron los siguientes:

- 1) Puesta a punto y validación de métodos analíticos para la determinación de AFB1 en productos destinados a la alimentación animal.
- 2) Puesta a punto y validación de métodos analíticos para la determinación de AFM1 en leche cruda de vaca.
- 3) Evaluación de las tasas de contaminación por AFB1 y AFM1 en raciones alimenticias completas y en leche cruda de vaca, respectivamente.

- 4) Cálculo de la tasa de transferencia de aflatoxinas del alimento del ganado a la leche, en explotaciones de vacas de alta producción. Adicionalmente, evaluación de la exposición dietética a la AFM1 por el consumo de leche.
- 5) Estudio de las tasas de contaminación por AFB1 en productos a base de maíz utilizados en alimentación animal, en el contexto del cambio climático.
- 6) Determinación de la eficacia *in vitro* de ácidos fenólicos naturales (ferúlico, cafeico, p-cumárico y clorogénico) sobre el crecimiento fúngico y la síntesis de aflatoxinas.
- 7) Evaluación *in vitro* de la capacidad de fijación de AFB1 de varios aditivos adsorbentes de origen inorgánico y orgánico.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Mohos del género *Aspergillus*

Las especies fúngicas del género *Aspergillus* son microorganismos cosmopolitas filamentosos que se pueden aislar del suelo, residuos de cosechas, plantas, animales y medio ambiente (Geiser, 2009). Son mohos formadores de esporas, cuya estructura es parecida a un “hisopo”, de ahí el nombre de *Aspergillus* con el que fueron bautizados en 1729 por el botánico italiano Micheli (Asan, 2004). Al igual que en el resto de los mohos, la taxonomía del género *Aspergillus* es compleja y está en constante evolución.

#### **Clasificación taxonómica de *Aspergillus* (adaptado de Mycobank, 2019):**

Dominio: *Eukarya*

Reino: *Fungi*

Filo o División: *Ascomycota*

Clase o Subdivisión: *Pezizomycotina*

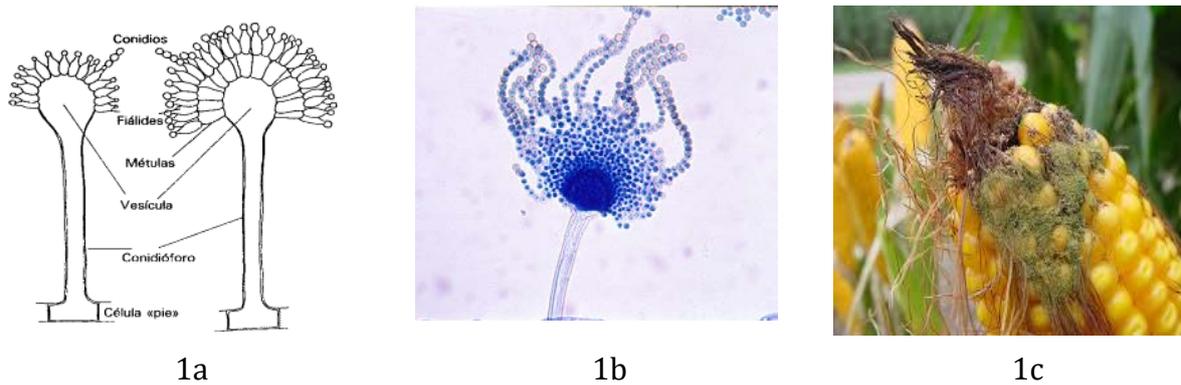
Orden: *Eurotiales*

Familia: *Aspergillaceae*

Género: *Aspergillus*

Especies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, etc.

El género *Aspergillus* se identifica fácilmente por su conidióforo característico (Figura 1), pero la identificación y diferenciación de las especies por técnicas tradicionales es compleja, se basa en una variedad de características morfológicas y culturales (Cotty y Bhatnagar, 1994), aunque modernamente se utilizan técnicas de biología molecular.



**Figura 1.** Esquema de un conidióforo de *Aspergillus* (1a); microfotografía de un conidióforo de *Aspergillus flavus* (1b); fotografía de una mazorca de maíz infectada por *A. flavus*

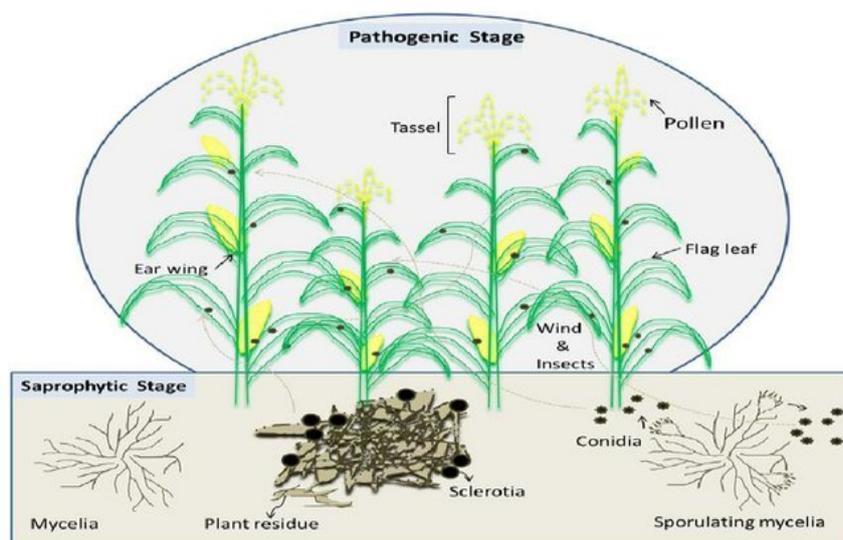
**Fuente:** [www.uprm.edu](http://www.uprm.edu); [www.aspergillus.org.uk](http://www.aspergillus.org.uk); [www.pioneer.com](http://www.pioneer.com)

Los mohos del género *Aspergillus* pueden contaminar una gran variedad de productos alimenticios como cereales y derivados, cacahuets y otras semillas oleaginosas, frutos secos, frutas desecadas y especias. Asimismo, pueden contaminar prácticamente todas las materias primas destinadas a la alimentación animal, ensilados y piensos. Uno de los productos más susceptibles a *A. flavus* es el maíz (Figura 2), que puede colonizarse por el hongo tanto en la fase de precosecha como de post cosecha (Kleter y Marvin, 2009). El maíz, que es un cereal muy utilizado en la alimentación animal y particularmente en las raciones de ganado vacuno lechero, ha sido relacionado reiteradamente con la contaminación por aflatoxinas (Whitlow, 2006). En otros cereales como trigo y cebada, la contaminación por aflatoxinas sucede más frecuentemente en la fase de postcosecha.

En una encuesta de 338 muestras de alimentos y piensos realizada en España (Sanchis et al., 1986), las muestras de maíz ( $n = 34$ ) fueron las más frecuentemente contaminadas con *Aspergillus flavus* (100% de las muestras y 54,5% de los granos). Además, las cepas de *A. flavus* aisladas del maíz también mostraron la mayor proporción de mohos aflatoxigénicos (17,2%), en comparación con los aislados de otras fuentes.

Las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son saprófitas o parásitas agrícolas, es decir, que colonizan y causan el deterioro de muchos productos agrícolas (Klich, 2002). Estas especies reducen la calidad de estos productos, dando lugar a importantes pérdidas económicas, tanto en el sector agrícola como en la producción de ganado (Zirbes y Milla, 2008). De todas las especies toxigénicas de *Aspergillus*, *A. flavus* es la especie más notoria, vinculada desde hace tiempo con la contaminación por aflatoxinas de varios cultivos destinados a la obtención de alimentos y piensos (Cotty et al., 1997). Otra de las especies de mohos productores de aflatoxinas, *A. parasiticus*, se ha relacionado con la contaminación de algunas materias primas agrícolas, en particular, con los cacahuets en los EE.UU. (Horn, 2005) y en África Occidental (Ismail, 2001).

Ambas especies toxigénicas son consideradas como estrictamente asexuales y carentes de la capacidad de realizar la meiosis (Geiser et al., 1996; Fernández et al., 2000), aunque algunos autores reivindican que pueden tener formas sexuales (Horn et al., 2009).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *A. flavus* en planta de maíz.

**Fuente:** Lakkireddy et al. (2014).

## 3.2. Aflatoxinas

### 3.2.1. Aspectos generales de las aflatoxinas

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas principalmente por el hongo *Aspergillus flavus* y la especie estrechamente relacionada *A. parasiticus* (Peterson et al., 2001). Ambas son especies bien definidas: *A. flavus* produce solo aflatoxinas B, mientras que *A. parasiticus* produce aflatoxinas tanto B como G. Sin embargo, se han identificado algunas cepas de *A. flavus* que también producen AFG1 y AFG2 (Moore et al., 2017). Estas dos especies de *Aspergillus* son especialmente abundante en áreas con climas cálidos, como los trópicos y zonas subtropicales. Debido a la distribución mundial de las especies de mohos productores, las aflatoxinas son un riesgo permanente entre las latitudes 40 °N y 40 °S del ecuador (Negash, 2018).

*A. flavus* es ubicuo, afectando principalmente las partes aéreas de las plantas, mientras que *A. parasiticus* está más adaptado al ambiente del suelo y tiene una distribución más limitada. La presencia de *A. flavus* en climas templados y fríos como los de EE. UU. y Europa es menos frecuente, excepto en alimentos y piensos importados de países tropicales (EFSA, 2007). Otras especies de *Aspergillus* capaces de producir aflatoxinas incluyen *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* y *A. australis*, entre otros (Frisvad y Samson, 1991; Giorni, 2007).

Las aflatoxinas principales son aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) y aflatoxina G2 (AFG2). Las aflatoxinas M1 (AFM1) y M2 (AFM2) son productos hidroxilados de la bioconversión, en mamíferos, de la AFB1 y AFB2, respectivamente, por lo que aparecen en la leche de animales que consumen alimentos contaminados con aflatoxinas B (Boudra et al., 2007). La denominación de la letra M les viene al encontrarse en la leche, del inglés *milk* (Garrido et al., 2003).

Los principales hospedadores de *A. flavus* son el maíz, los pistachos y las semillas de algodón, aunque se pueden encontrar pequeñas cantidades de aflatoxinas en una amplia gama de otros alimentos (IARC, 2002). Parece probable que, aunque *A. parasiticus* se encuentre en el mismo rango geográfico que *A. flavus*, esté menos distribuido. Los hospedadores de *A. parasiticus* relacionados con los alimentos son similares a los de *A. flavus*, excepto que *A. parasiticus* es muy poco frecuente en el maíz y muy frecuente en cacahuete (IARC, 2002).

Las aflatoxinas son especialmente problemáticas en climas cálidos, y su prevalencia se ve agravada por la sequía, las plagas, el retraso en la cosecha, el secado insuficiente y el mal manejo posterior a la cosecha. En los productos agrícolas susceptibles, la invasión por *Aspergillus* toxigénicos puede ocurrir antes de la cosecha, lo que resulta en niveles potencialmente altos de aflatoxinas. Con otros cultivos, la prevención de la formación de aflatoxinas se basa principalmente en evitar la contaminación después de la cosecha mediante el uso de secado rápido y buenas prácticas de almacenamiento (IARC, 2002).

La síntesis de aflatoxinas y el desarrollo de los mohos productores se ven muy condicionados por la especie fúngica y por factores ambientales como temperatura, actividad de agua, contenido en humedad y pH (Krishan y Kretser, 2014). Generalmente, la aflatoxina B1 es el principal contribuyente al total de aflatoxinas. Se ha calculado que la correlación entre AFB1 y aflatoxinas totales es de  $r = +0,93$  (EFSA, 2007). Sin embargo, la relación de AFB1 con las aflatoxinas totales variará dependiendo de la especie de *Aspergillus* spp. presente en el producto, ya que *A. flavus* únicamente sintetiza AFB1 y AFB2 mientras que *A. parasiticus* produce AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.

Las aflatoxinas se pueden sintetizar en un rango de temperatura de 12-40 °C (Duncan y Hagler, 2008). Cada especie de *Aspergillus* tiene su propia temperatura óptima para la

producción de aflatoxinas que oscila entre los 25 y 28 °C (Gnonlonfin et al., 2013). *A. flavus* tiene un crecimiento lento a los 10°C y tiene un crecimiento rápido a los 37°C, pero no produce AF a temperaturas inferiores a los 12°C o superiores a los 40°C. La humedad crítica para el crecimiento de *A. flavus* en maíz es del 14%, en semillas de soja del 15 a 15,5% y en pistacho y cacahuete varía entre 8 a 9%.

La mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de las aflatoxinas están en un solo grupo en el genoma de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Bhatnagar et al., 2003), aunque su regulación y expresión no están totalmente claras. La vía de la formación de aflatoxinas se ha descrito como un proceso complicado, que implica muchos niveles de control transcripcional y post-transcripcional (Abbas et al., 2009; Chanda et al., 2009; Georgianna y Payne, 2009; Schmidt-Heydt et al., 2009).

Sin embargo, las principales etapas bioquímicas de la biosíntesis de aflatoxinas se han aclarado o dilucidado en las dos últimas décadas (Bhatnagar et al., 2002; Yu et al., 2004). Las aflatoxinas son sintetizadas a través de la vía de los policétidos, iniciándose con la condensación de una unidad de acetilo con dos unidades de malonil-CoA y la pérdida de un dióxido. En una etapa intermedia de la síntesis, se produce ácido norsolínico; éste ácido tiene diferentes conversiones bioquímicas hasta formar la AFB1 (Yu et al., 2004; Montville y Matthews, 2007).

Las aflatoxinas son las micotoxinas que han recibido mayor atención debido a su poder carcinógeno demostrado (Ozay et al., 2008). Estas toxinas se descubrieron en 1960 cuando más de 100.000 pavos jóvenes murieron en granjas de Inglaterra, en el transcurso de pocos meses, por una enfermedad desconocida que se denominó "enfermedad X" (Blount, 1961; Jiménez et al., 2007). Esta enfermedad se caracterizaba por pérdida de apetito, letargo y debilidad de las alas. Los estudios iniciales sugirieron que el problema podría ser de origen

fúngico. Así, un estudio posterior demostró la asociación con la ingesta de una harina de cacahuete brasileña contaminada, añadida a la ración de la alimentación de los animales. Por esta razón, se llevó a cabo una investigación intensiva de la harina de cacahuete sospechosa, usando la cromatografía de capa fina (TLC) y se encontró rápidamente que la harina de cacahuete era altamente tóxica.

Durante los análisis se identificó el moho que producía aquella toxina y, en 1961, recibió el nombre de *Aspergillus flavus*. La toxina también fue llamada aflatoxina en relación a su origen, donde la primera letra “a” hace referencia al género *Aspergillus*, las tres siguientes “fla”, proceden de la especie *flavus* y el término “toxina” se refiere a su efecto tóxico (Craufurd et al., 2006).

Las aflatoxinas de *Aspergillus* contaminan naturalmente materias primas, piensos y alimentos, y son capaces de generar una amplia variedad de efectos tóxicos tanto en animales como en personas (Coulombe et al., 1991). Los mohos toxigénicos y las aflatoxinas pueden contaminar los productos susceptibles en las fases de precosecha y postcosecha, incluyendo el transporte, almacenamiento y procesado (Guzmán, 2007; Madrigal et al., 2007). Además, las aflatoxinas muestran alta estabilidad química, por lo que pueden persistir en los productos contaminados incluso después de que los mohos hayan sido eliminados (Chu, 1991).

Como se ha mencionado, el maíz es uno de los productos agrícolas más susceptibles a las aflatoxinas (Pitt et al., 2018). Pueden producirse en el campo cuando el maíz en maduración se encuentra bajo sequía y estrés de insectos, durante períodos prolongados de clima cálido (Negash, 2018). La contaminación posterior a la cosecha puede ocurrir si se retrasa el secado del cultivo. El grano de maíz debe ser secado hasta lograr un contenido de

humedad inferior al 15% (aW inferior a 0,70), inmediatamente después de la cosecha y lo antes posible.

En caso de no poder secar el maíz inmediatamente tras la cosecha, el tiempo de almacenamiento intermedio debe ser menor de 10 días, y el cereal se mantendrá a una temperatura inferior a 20°C (CAC/RCP 51-2003 del Codex Alimentarius, 2014). No obstante, el maíz también puede contaminarse posteriormente durante el almacenamiento del grano si la humedad excede los valores críticos, o si hay plagas de insectos.

Los problemas asociados con *Aspergillus* y aflatoxinas son más comunes con condiciones ambientales cálidas y secas. Según Munkvold (2009), condiciones de sequía y altas temperaturas (27-40 °C) durante el período de llenado de la mazorca, son los factores más comúnmente asociados con la producción de aflatoxinas. Durante condiciones de bajo contenido de humedad en el suelo, aumenta la cantidad de esporas de *Aspergillus* en el aire, por lo tanto, cuando se produce sequía durante el estado de polinización, aumenta la posibilidad de contaminación de los granos por aflatoxinas (Díaz-Royón y García, 2012).

La aflatoxina M1 es el derivado metabólico más importante de la AFB1, producido por la actividad del citocromo P450, variando su concentración en la leche en función de la cantidad de AFB1 ingerida, la duración del consumo de alimento contaminado y el estado de salud del animal. La AFM1 se detecta en leche entre 12 y 24 horas después de la ingestión de las raciones contaminadas con AFB1 (JECFA, 2001). El sistema metabólico de los animales poligástricos provoca que las concentraciones de AFM1 en leche varíen entre animales, de un día para otro, y de una producción de leche en la otra. También se ha observado una variación estacional de la contaminación de la leche, con un incremento de la micotoxina durante el periodo invernal vinculado directamente con el incremento de pienso en la dieta de los animales (Prandini et al., 2009).

### **3.2.2. Estructura y propiedades físico-químicas de las aflatoxinas**

Las AF y sus metabolitos pertenecen a un grupo de difurano-cumarinas (Bbosa et al. (2013), que se clasifican en dos grandes subgrupos según su estructura química: difurocumaro-ciclopentenonas (AFB1, AFB2, AFB2a, AFM1, AFM2, AFM2a y aflatoxicol) y difurocumaro-lactonas (AFG1, AFG2, AFG2a, AFGM1, AFGM2, AFGM2a y AFB3) (Tabla 1).

Los pesos moleculares de las aflatoxinas oscilan entre 212 y 330 daltons. La mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, como el cloroformo o el metanol. Las AF purificadas en forma de cristales son bastante termorresistentes, estables en un rango de pH entre 3 y 10, y sus puntos de fusión son superiores a los 237 °C (Tabla 2).

**Tabla 1.** Principales aflatoxinas, sus metabolitos y las especies productoras.

<b>Difurano-cumarinas</b>	<b>Aflatoxina</b>	<b>Especies de <i>Aspergillus</i></b>	
<b>Difurocumaro-ciclopentenonas</b>	AFB1	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. rambellii</i> , <i>Emericella venezuelensis</i>	
	AFB2	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i>	
	AFB2a	<i>A. flavus</i>	
	AFM1	Metabolito de AFB1 en leche animal y humana	
	AFM2	Metabolito de AFB2 en leche animal y humana	
	AFM2a	Metabolito de AFM2	
	Aflatoxicol	Metabolito de AFB1	
	Aflatoxicol M1	Metabolito de AFM1	
	<b>Difurocumaro-lactonas</b>	AFG1	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i>
		AFG2	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i>
AFG2a		Metabolito de AFG2	
AFGM1		<i>A. flavus</i>	
AFGM2		Metabolito de AFG2	
AFGM2a		Metabolito de AFGM2	
AFB3		Especie no definida de <i>Aspergillus</i>	
Parasiticol		<i>A. flavus</i>	
Aflatrem		<i>A. flavus</i> , <i>A. minisclerotigenes</i>	
Aspertoxina		<i>A. flavus</i>	
AFQ1		Metabolito de AFB1 en hígado.	

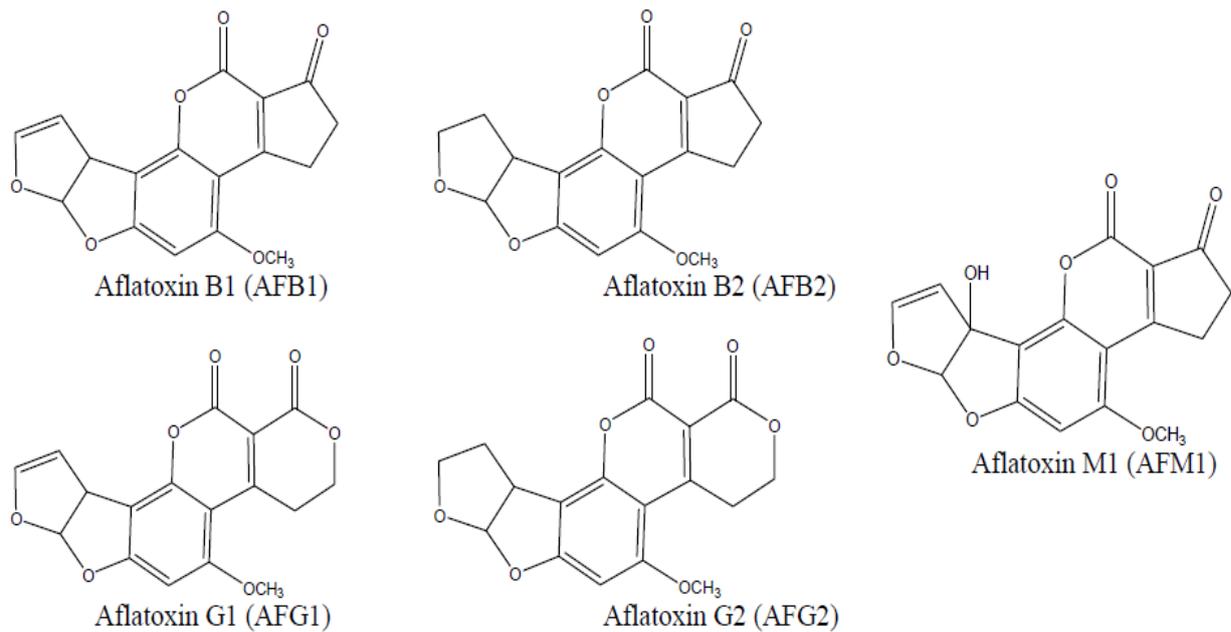
**Fuente:** Bbosa et al. (2013).

**Tabla 2.** Propiedades físicas y químicas de las aflatoxinas.

<b>Aflatoxina</b>	<b>Formula</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Punto de fusión (°C)</b>
<b>AFB1</b>	$C_{17}H_{12}O_6$	312,28	268-269
<b>AFB2</b>	$C_{17}H_{14}O_6$	314,30	286-289
<b>AFG1</b>	$C_{17}H_{12}O_7$	328,28	244-246
<b>AFG2</b>	$C_{17}H_{14}O_7$	330,30	237-240
<b>AFM1</b>	$C_{17}H_{12}O_7$	328,28	299
<b>AFM2</b>	$C_{17}H_{14}O_7$	330,30	293
<b>AFB2a</b>	$C_{17}H_{14}O_7$	330,30	240

**Fuente:** Waliyar et al. (2003).

En la Figura 3 se aprecia la estructura y las características químicas de algunas aflatoxinas. Todas las aflatoxinas son sustancias estructuralmente relacionadas. El esqueleto de la aflatoxina B1 es el análogo estructural de todos los otros tipos de aflatoxinas. AFB1, AFG1 y AFM1 difieren de AFB2, AFG2, y AFM2, respectivamente, por el doble enlace en el grupo fenol del extremo izquierdo. La AFB2a y AFG2a se obtienen a partir de la AFB1 y AFG1, respectivamente, en medios fuertemente ácidos.



**Figura 3:** Estructuras químicas de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1.

**Fuente:** EFSA (2007).

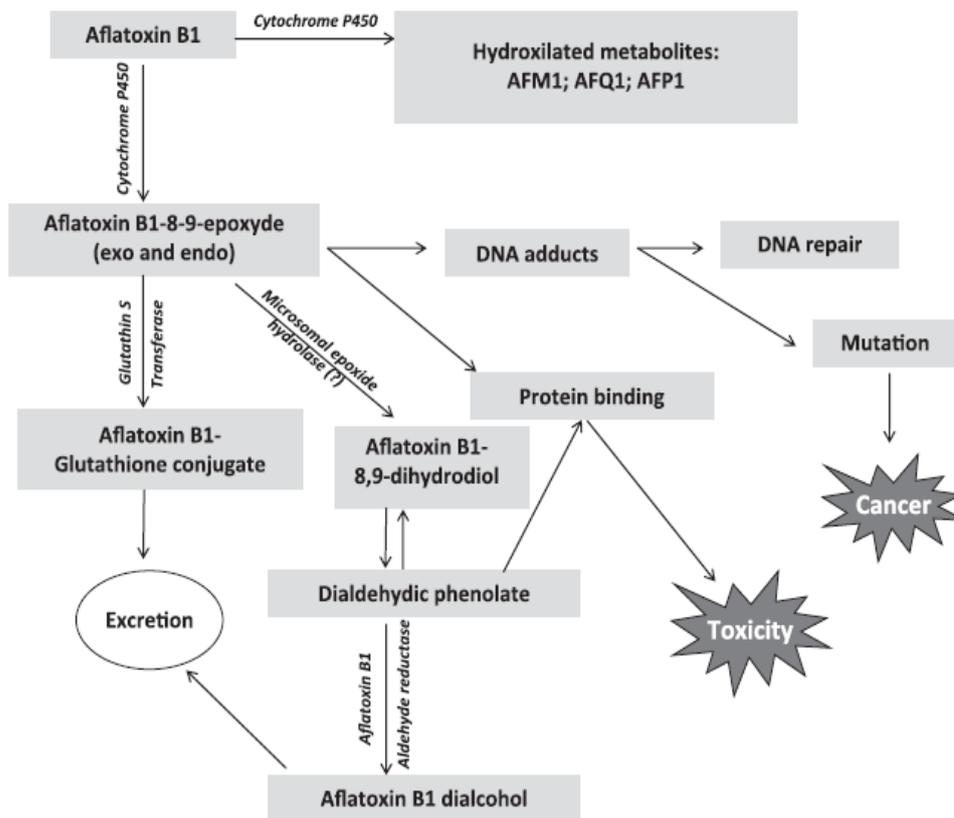
Las aflatoxinas son intensamente fluorescentes bajo la luz ultravioleta, emiten fluorescencia azul (aflatoxinas B1 y B2) o verde (aflatoxina G1) y verde-azul (aflatoxina G2), de las cuales se derivan las designaciones B (*blue*) y G (*green*), o fluorescencia azul-violeta (aflatoxina M1). La numeración 1 y 2 dentro de cada grupo hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa. Son muy ligeramente solubles en agua (10–30 µg/mL), insolubles en solventes no polares (por ejemplo, hexano) y libremente solubles en disolventes orgánicos moderadamente polares (por ejemplo, metanol, acetonitrilo y cloroformo) (IARC, 2012). Las aflatoxinas son resistentes a las altas temperaturas (Jiménez et al., 2007), por lo que son generalmente estables durante el procesamiento (Cotty y Jaime, 2007; Gnonlonfin et al., 2013; Medina et al., 2014). La AFM1 es térmicamente resistente y no se inactiva completamente por la pasteurización, la esterilización u otros procesos de tratamiento de la leche, por lo que puede aparecer en productos lácteos (Assem et al., 2011).

### 3.3. Toxicidad y metabolismo de las aflatoxinas

Las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1 son potentes agentes mutagénicos, genotóxicos y carcinogénicos en animales y humanos, clasificadas en el Grupo 1 (carcinógeno para seres humanos) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012).

La AFB1, que es la más peligrosa, requiere de una bioactivación enzimática para alcanzar su actividad carcinógena (ver Figura 4). Esta toxina tiene varias rutas de metabolización:

- 1) puede ser metabolizada por el citocromo P450 en las células microsomales hepáticas, dando lugar a un compuesto reactivo electrofílico, el exo-aflatoxin B1-8,9-epoxide (AFBO), el cual es altamente inestable, y reacciona con el DNA para formar aductos N7 guanina por interacción del AFBO entre los pares de bases (Kuilman et al., 2000; Rawal y Coulombe, 2011). El citocromo P450 pertenece a la familia de hemoproteínas y enzimas implicadas en el metabolismo de compuestos xenobióticos y, es el responsable del metabolismo de las aflatoxinas, incrementando su efecto perjudicial (Van Vleet et al., 2002).
- 2) Una vez formado el AFBO, puede ser conjugado con el glutatión (GSH) para su eliminación, con la ayuda de la enzima GST, que es el paso de detoxificación más importante para la protección contra la genotoxicidad de la AFB1 (Yarru et al., 2009). Por lo tanto, la actividad de la GTS es un factor crucial en la determinación de la resistencia de una especie animal al efecto tóxico de las aflatoxinas.
- 3) En caso de no ser eliminada por la GST, la AFB1 puede ser hidrolizada, catalizada o espontáneamente formar el compuesto AFB1-8,9-dihydrodiol (AFB1dhd) (Lozano y Díaz, 2006).



**Figura 4.** Vías de biotransformación de AFB1.

**Fuente:** Marin y Taranu (2012) y (Soriano, 2007).

Las aflatoxinas ejercen su principal toxicidad uniéndose al ADN. El mecanismo de acción de las aflatoxinas en animales y personas solo se ha descrito con detalle para AFB1. La AFB1 es absorbida en el intestino delgado y transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayoritariamente por vía portal (Soriano 2007). Como se aprecia en la Figura 4, esta aflatoxina se activa mediante el citocromo P450, a AFB1-8,9-exo-epóxido y AFB1-8,9-endo-epóxido. El primero se une al ADN para formar el aducto 8,9-dihidro-8-(N7-guanil) 9-hidroxi-AFB1 (AFB1-N7-Gua) (Iyer et al., 1994). Estos aductos, generalmente, se eliminan mediante la ruta de reparación por escisión de nucleótido (NER); sin embargo, si no se reparan, pueden causar mutaciones puntuales, en las que una purina

se sustituye por una pirimidina, o viceversa, y cambios celulares posteriores que pueden conducir a la transformación celular (Bennett y Klich, 2003).

Otras aflatoxinas como B2, G1, G2 y M1 son sustratos más pobres para la epoxidación y, en consecuencia, son menos mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas en comparación con AFB1.

La absorción de aflatoxinas en el intestino delgado de rata es un proceso rápido que sigue una cinética de primer orden (Chanda et al., 2009). La excreción de AFB1 y sus metabolitos ocurre, principalmente, a través de la bilis, seguido de la vía urinaria, pero en animales lecheros un porcentaje de AFB1 es excretada en la leche como su metabolito hidroxilado AFM1, y cantidades menores como aflatoxinas M2, P1, Q1, G2a y B2a (Kuilman et al., 2000; Trucksess et al., 2006; Abdel-Wahhab y Kholif, 2008). Asimismo, una pequeña parte de la AFB1 es degradada en el rumen, resultando la formación del metabolito aflatoxicol que es 18 veces menos tóxico que la M1, aunque la reacción es reversible por lo que puede volver a transformarse en AFB1 (Völkel et al., 2011).

Se ha investigado el paso de aflatoxinas y sus metabolitos a otros tejidos. Así, Wood (1992) menciona no haber detectado residuos de AF en hígado de vacas ni ovejas, usando métodos capaces de detectar niveles de 0,05 mg/kg de AFB1. Esto coincide con los resultados obtenidos por Wong et al. (1993), quienes mencionan que las AF difícilmente son transmitidas a los tejidos animales, sin embargo, reconocen que la exposición repetida o prolongada a las AF, puede producir daños permanentes en los órganos de los animales.

Debido a su gran toxicidad, las aflatoxinas son un grupo de toxinas de gran importancia en salud pública. Suponen un riesgo importante ya que pueden contaminar productos básicos de la agricultura (como cereales, semillas oleaginosas y frutos secos), los cuales entran directamente a la cadena alimentaria (Joseph et al., 2005), o productos de

origen animal como la leche (Díaz et al., 2004), carne o huevos (Wolzak et al., 1985; Wolzak et al., 1986). Adicionalmente, los grandes riesgos para la salud recaen sobre países en desarrollo localizados en regiones tropicales y subtropicales, donde además de las condiciones climáticas favorables, existen inadecuadas prácticas agrícolas, de manipulación y de almacenamiento (Bennett y Klich, 2003). Finalmente, la susceptibilidad a los efectos tóxicos de las aflatoxinas, aumenta en grupos de población vulnerables (lactantes, jóvenes, madres gestantes), así como en personas malnutridas y alimentadas con dietas poco variadas (WHO, 2015).

#### **3.4. Efectos tóxicos de las aflatoxinas en rumiantes**

En los rumiantes, una parte considerable de la aflatoxina B1 ingerida se degrada en el rumen y no alcanza la circulación sistémica. La fracción absorbida de la aflatoxina B1 se metaboliza ampliamente en el hígado, resultando predominantemente en la aflatoxina M1. La aflatoxina M1 circulante puede excretarse a través de los riñones o aparecer en la leche (EFSA, 2004).

A pesar de que los rumiantes como vacas, ovejas y cabras se consideran menos sensibles a los efectos tóxicos de las aflatoxinas que otras especies, la producción (leche y carne), la reproducción y el crecimiento, pueden verse alterados cuando consumen raciones contaminadas con estas micotoxinas (Ramos, 2011). Asimismo, el consumo de productos contaminados por aflatoxinas, puede causar daños hepáticos, reducción de las defensas inmunológicas, mayor susceptibilidad a enfermedades metabólicas e infecciosas, tumores y teratogenicidad (Streit et al., 2012; Gallo y Trevisi, 2018).

La toxicidad crónica es la forma más común de aflatoxicosis y es causada por el consumo de cantidades relativamente pequeñas de estos compuestos tóxicos durante un período prolongado. El principal órgano afectado por la toxicidad de AFB1 es el hígado,

donde puede transformarse en diferentes metabolitos (Di Gregorio et al., 2014). En rumiantes, los efectos adversos se observan a partir de niveles de 1–2 mg AFB1/kg de alimento, como una menor ingesta de alimento y un descenso en la producción de leche. Es importante resaltar que la AFB1, como reduce el índice de crecimiento del ganado e incrementa los requerimientos de proteína en la dieta, afecta a la calidad de la leche.

Los efectos de las aflatoxinas en los rumiantes dependen de múltiples factores que incluyen: concentración de la toxina, cantidad ingerida, duración de la exposición, el tipo de dieta (ingredientes muy diversos), el estado del animal (edad, sexo, raza, estado general de salud, estado inmunitario) y los parámetros ambientales (manejo de granjas, higiene y bioseguridad) (Jouany y Díaz, 2005; Gallo et al., 2015).

Normalmente, los rumiantes se consideran más resistentes a las AF debido a la complejidad de su tracto gastrointestinal que está poblada por una amplia variedad de microorganismos diferentes, algunos de los cuales son capaces de biotransformar estas toxinas (Fink-Gremmels, 2008; Gallo et al., 2015), Sin embargo, los productos destinados a la alimentación animal generalmente están contaminados por más de una micotoxina, y debido a la composición de la dieta, los rumiantes están más expuestos a la mezcla de toxinas que se producen en el campo y durante el almacenamiento, lo que puede tener efectos sinérgicos (Kovalsky et al., 2016).

Las vacas y las cabras, por ser las principales productoras de leche, son muy susceptibles a presentar daños hepáticos (Tabla 3) y producir leche contaminada con aflatoxina M1 (Perusia y Rodríguez, 2001).

**Tabla 3.** Efectos y sintomatología producidos por AFB1 en rumiantes.

<b>Efecto</b>	<b>Sintomatología</b>
<b>Cancerígeno</b>	Mayor incidencia de cáncer en animales expuestos
<b>Inmunosupresión</b>	Disminución de la resistencia a factores de estrés ambiental y microbiano Aumento de la susceptibilidad a las enfermedades
<b>Bajo rendimiento en la producción</b>	Disminución del consumo de alimento. Disminución de la producción de leche (productos lácteos) Pérdida de peso y reducción del aumento de peso
<b>Efecto hepatotóxico</b>	Daños hepáticos
<b>Cambios patológicos</b>	Aumento del peso del hígado y riñón Mastitis aguda con mamas más pequeñas y menos saludables
<b>Efectos gastrointestinales</b>	Alteración de la función del rumen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución de la digestión de la celulosa.</li> <li>- Formación de ácidos grasos volátiles y proteólisis</li> <li>- Cambios en la motilidad del rumen.</li> </ul> Diarrea
<b>Residuos</b>	Residuos (aflatoxina M1) presentes en la leche
<b>Efectos reproductivos</b>	Disminución de la eficiencia reproductiva al nacer

**Fuente:** ELIKA Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (2013).

El primer caso de intoxicación por aflatoxinas en el ganado se informó en 1961. Terneros de 3 a 9 meses de edad, habían consumido durante al menos seis semanas un pienso con harina de cacahuets contaminada con aflatoxinas. Sus hígados presentaron áreas de fibrosis con proliferación biliar y enfermedad veno-oclusiva. En otros casos, también se encontró un aumento del tejido conectivo y se describió la degeneración de las células hepáticas centrilobulares, así como pérdida de peso y casos de muerte (Newbern y Butler, 1969). Keyl y Booth (1971) describieron lesiones en los riñones e hígado de ganado bovino cuya dieta contenía aflatoxinas, siendo el hígado el más afectado, presentando una textura fibrosa. Se observó un incremento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y málico deshidrogenasa, mientras que disminuyó la actividad de la lactato deshidrogenasa. Se ha descrito también un incremento en los niveles totales de bilirrubina y bilirrubina directa (Lynch et al., 1972).

Como la AFM1 se elimina por la leche, puede provocar efectos tóxicos en los terneros lactantes. También se han observado lesiones características de cirrosis hepática en terneros recién nacidos, debida al paso de las aflatoxinas a través de la placenta.

#### **3.5. Impacto de las aflatoxinas en la salud humana**

Como se ha mencionado, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1 en el Grupo 1 como carcinogénicas para los humanos (<https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/>). La aflatoxina B1, que es la más peligrosa por su gran capacidad mutagénica y genotóxica, está considerada un factor de riesgo del carcinoma hepático en personas (IARC, 2002). Su metabolito aflatoxina M1 estuvo previamente clasificada por IARC en el Grupo 2B (posiblemente carcinogénica para los humanos), pero actualmente se le incluye junto al resto de aflatoxinas citadas en el

Grupo 1 (IARC, 2012). Por tanto, para caracterizar el peligro de las aflatoxinas, la carcinogenicidad es el efecto crítico en el que se basa la evaluación de riesgos (EFSA, 2007).

En los países en desarrollo, muchas personas no sólo están en inseguridad alimentaria, sino que también están expuestos crónicamente a altos niveles de micotoxinas en su dieta. Algunos de los niveles más altos y más persistentes de exposición humana a las aflatoxinas, se producen en el África occidental, donde casi el 99% de los niños fueron positivos para un biomarcador de aflatoxina (Gong et al., 2004). El consumo de maíz es una fuente importante de exposición a las aflatoxinas para estos niños (Egal et al., 2005).

Las personas se exponen a las aflatoxinas por dos rutas principales. En primer lugar, por la ingestión directa de alimentos de origen vegetal contaminados, y en segundo lugar por la ingestión de aflatoxinas metabolizadas presentes en la leche y productos lácteos, como queso y leche en polvo, así como, en mucha menor medida, en huevos y tejidos de animales contaminados a través de su alimentación.

Después de ingresar en el organismo humano, las aflatoxinas son absorbidas en el intestino donde alcanzan la circulación sanguínea. Se distribuyen por sangre a diferentes tejidos y al hígado, el órgano principal donde se metabolizan. La aflatoxicosis humana se presenta generalmente en brotes asociados con la ingesta de productos alimenticios específicos (Marin et al., 2013), sin embargo no se conoce suficiente sobre los posibles efectos sinérgicos de las aflatoxinas, además de la dificultad que conlleva un diagnóstico preciso sobre aflatoxicosis, ya que otras enfermedades presentan una sintomatología similar (Drejer et al., 2014).

Uno de los primeros informes importantes documentados, sobre el efecto de las aflatoxinas en las personas, se obtuvo de una intoxicación producida en el oeste de la India en 1974. Murieron 108 personas, de las 397 personas afectadas por la intoxicación debida a

las aflatoxinas (Krishnamachari et al., 1975). Otro incidente de intoxicación por aflatoxina tuvo lugar en Kenia, en julio de 2004, que provocó la muerte de 125 personas de las 317 afectadas, debido al consumo de maíz contaminado (Lewis et al., 2005; Probst, 2011). La intoxicación aguda no es la única preocupación. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en varias zonas de África y Asia, indican una correlación entre la exposición a las aflatoxinas y el cáncer primario de hígado. Los riesgos asociados con la exposición a las aflatoxinas, se ven reforzados por la exposición simultánea al virus de la hepatitis B y, posiblemente, al de la hepatitis C (Ngindu et al., 1982).

No en vano, las autoridades sanitarias mundiales advierten que la exposición a dosis bajas de aflatoxinas, mediante el consumo de alimentos, constituye un riesgo importante a largo plazo, ya que puede conducir a un carcinoma hepatocelular (Wogan, 1992; Fung y Clark, 2004).

Las aflatoxinas actúan en las personas igual que en los animales, ligándose al ADN, ARN y proteínas, alterando sus síntesis. Cuando se ingieren en grandes cantidades producen vómitos, diarrea, hemorragias, abortos y muerte. Cuando son ingeridas en bajas concentraciones por tiempo prolongado ocasionan inmunosupresión, mutagénesis, teratogénesis y diferentes carcinomas siendo el hepático el más común (Carvajal, 2013).

La aflatoxicosis es la intoxicación que deriva de la ingesta de aflatoxinas. En esta intoxicación se han identificado dos formas: una intoxicación aguda grave (daño al hígado y posterior muerte) y una intoxicación crónica (exposición asintomática). Los síntomas más graves de la aflatoxicosis aguda incluyen necrosis hemorrágica del hígado, proliferación de conductos biliares y edema. Los adultos tienen mayor tolerancia, pero en niños, por lo general, una intoxicación aguda es letal. La dosis letal 50 (DL 50) para la AFB1, es de 0,3

mg/kg para patos y conejos, mientras que los pollos y ratones tienen una mayor tolerancia, con una DL 50 de 18 mg/kg (Williams et al., 2015).

La exposición de los fetos humanos a la aflatoxina consumida por las madres (Wild y Turner, 2002) y la presencia de la aflatoxina en la leche materna humana (Zarba et al., 1992; Saad et al., 1995), son factores de riesgo a considerar para la salud de los lactantes y niños en edad infantil. Se ha detectado la presencia de trazas de aflatoxina en el suero, sangre intravenosa materna, leche materna y los cordones umbilicales de los pacientes de salas de maternidad en Gambia (Miele et al., 1996). Se ha demostrado en animales que la exposición del feto y la exposición a través de la leche, tienen efectos significativos sobre la competencia inmune de la prole (Silvotti et al., 1997). La leche y sus derivados son un importante vehículo de AFM1. En las poblaciones humanas los niños son los más afectados por ser grandes consumidores de leche (Shundo et al., 2009).

Se ha descrito también que las aflatoxinas interfieren la nutrición y el crecimiento de lactantes y niños (Gong et al., 2004). También se ha evidenciado que las AF pueden causar efectos relacionados con el sistema digestivo como diarrea, vómitos y hemorragia intestinal. También puede producir necrosis hepática y fibrosis (Ammann, 2003). La contaminación de los alimentos y piensos con aflatoxinas puede causar graves consecuencias en la salud humana y animal.

Las aflatoxinas también se han relacionado con kwashiorkor y marasmo en los niños, en la mayoría de los países del África subsahariana. En un estudio realizado por Williams et al. (2011) se detectó que, en Gambia y Ghana, donde existe una elevada presencia de biomarcadores de aflatoxinas, la gente era muy propensa a la malaria activa.

El contenido máximo de micotoxinas en productos alimenticios debe establecerse a un nivel estricto que pueda conseguirse razonablemente si se aplican buenas prácticas

agrícolas, de fabricación y de almacenamiento, teniendo en cuenta el riesgo relacionado con el consumo del alimento. En el caso de los contaminantes que se consideran cancerígenos genotóxicos, deben establecerse contenidos máximos tan bajos como sea razonablemente posible (*As Low As Reasonably Achievable*, ALARA). Este principio se utilizó por el Reglamento (CE) nº 1881/2006 para establecer los contenidos máximos de aflatoxinas en productos alimenticios al nivel más bajo posible.

Como las aflatoxinas son carcinógenas para los humanos, se supone que no hay un umbral seguro de exposición, por lo que no se puede establecer una ingesta diaria tolerable (IDT). En estos casos, el "riesgo cero" podría lograrse solo eliminando toda la posible exposición humana. Sin embargo, esto es prácticamente imposible con las aflatoxinas, porque están generalizadas en muchos productos alimenticios.

Varios estudios epidemiológicos han mostrado claras asociaciones entre la exposición a las aflatoxinas y la incidencia de carcinoma hepatocelular en áreas con alta prevalencia de hepatitis B crónica, que es en sí misma un factor de riesgo para el cáncer de hígado. La EFSA concluyó que incluso niveles muy bajos de exposición a las aflatoxinas, del orden de 1 ng/kg pc/día, todavía contribuyen al riesgo de cáncer de hígado (EFSA, 2007).

Por ello, para caracterizar el riesgo de exposición a la aflatoxina B1 en personas se utiliza el margen de exposición (MOE), que se calcula como la relación entre la dosis a la que se observa el efecto tóxico (dosis de referencia, BMD) y el nivel de exposición a la sustancia considerada (JECFA, 2005). La EFSA ha sugerido para la aflatoxina B1 un valor de BMDL10 de 170 ng/kg de peso corporal/día; dicho valor representa la dosis diaria de referencia que produce un incremento del 10% en la aparición de un determinado efecto tóxico, que en el caso de aflatoxina B1 deriva de estudios de carcinogenicidad en ratas (EFSA, 2007).

La potencia carcinogénica de la AFM1 es significativamente inferior a la de la AFB1; así pues, la AFM1 y la AFB1 tienen una dosis tumoral TD50 (dosis de micotoxina que causa cáncer en el 50% de los animales) de 10,38 y 1,15 microgramos/kg peso corporal/día, respectivamente, lo que hace suponer que la AFM1 es aproximadamente nueve veces menos carcinogénica que la AFB1 (IARC, 1993). Si dividimos el valor de TD50 correspondiente a la AFM1 por el factor de seguridad 5000, podríamos atribuir hipotéticamente, un valor de ingesta diaria admisible (IDA) para la AFM1 de 2 ng/kg de peso corporal/día (Gimeno y Martins, 2003). Por comparación, en estudios de dieta total se ha considerado un valor de seguridad para aflatoxina M1 de 1 ng/kg peso corporal/día, en relación al riesgo de cáncer de hígado (Leblanc et al., 2005; Cano-Sancho et al., 2010).

#### **3.6. Incidencia de micotoxinas en alimentación animal**

Los grupos más relevantes de micotoxinas que se encuentran en la alimentación animal son producidos por tres géneros de hongos: *Aspergillus* (aflatoxinas y ocratoxina A), *Penicillium* (ocratoxina A) y *Fusarium* (tricotecenos, fumonisinas y zearalenona). Estas toxinas aparecen en la cadena alimentaria debido a la infección por hongos de los cultivos, así como por la utilización de granos y forrajes enmohecidos como componentes de la alimentación animal (Vila-Donat et al., 2018).

Los hongos pueden invadir y producir micotoxinas en las plantas en crecimiento antes de la cosecha (micotoxinas precosecha), o producir toxinas después de la cosecha y durante el almacenamiento y transporte de los productos agrícolas (micotoxinas postcosecha). Las condiciones ambientales como las altas temperaturas, los altos niveles de humedad y el daño por insectos, causan estrés y predisponen a las plantas en el campo al crecimiento de hongos y la contaminación por micotoxinas (Medina et al., 2015). Además,

las malas prácticas de cosecha, el secado inadecuado, la manipulación, el almacenado y las condiciones de transporte contribuyen a aumentar el riesgo de producción de micotoxinas

Unos de los productos agrícolas más susceptibles a la contaminación con micotoxinas son los cereales como maíz, trigo y cebada. Estos cereales constituyen una parte importante de la dieta diaria de los animales tanto en forma de concentrados (harinas) como forrajes (ensilados) y son ingredientes importantes en la fabricación de piensos (Pinotti et al., 2016).

La contaminación con aflatoxina B1 de los productos destinados a la alimentación animal, puede constituir un problema muy grave, cuyo origen puede estar en la fase anterior a la cosecha y agravarse a causa de condiciones inadecuadas de almacenamiento. Las buenas prácticas de cultivo y el empleo de variedades de semillas resistentes a la infestación fúngica y las plagas de insectos, representan medidas preventivas razonables para luchar contra la contaminación en el campo. Pero incluso aplicando esas prácticas, las condiciones creadas por el medio ambiente y/o las prácticas agrícolas, pueden hacer fracasar cualquier medida preventiva. En la fase de postcosecha, los medios más prácticos para evitar la infestación fúngica y la producción de aflatoxina B1 consisten en secar y almacenar los productos agrícolas de forma apropiada. Los problemas que se crean por la excesiva humedad se multiplican enormemente cuando las técnicas de manipulación y transporte de los productos después de la cosecha son deficientes (CAC/RCP 45-1997 del Codex Alimentarius, 1997).

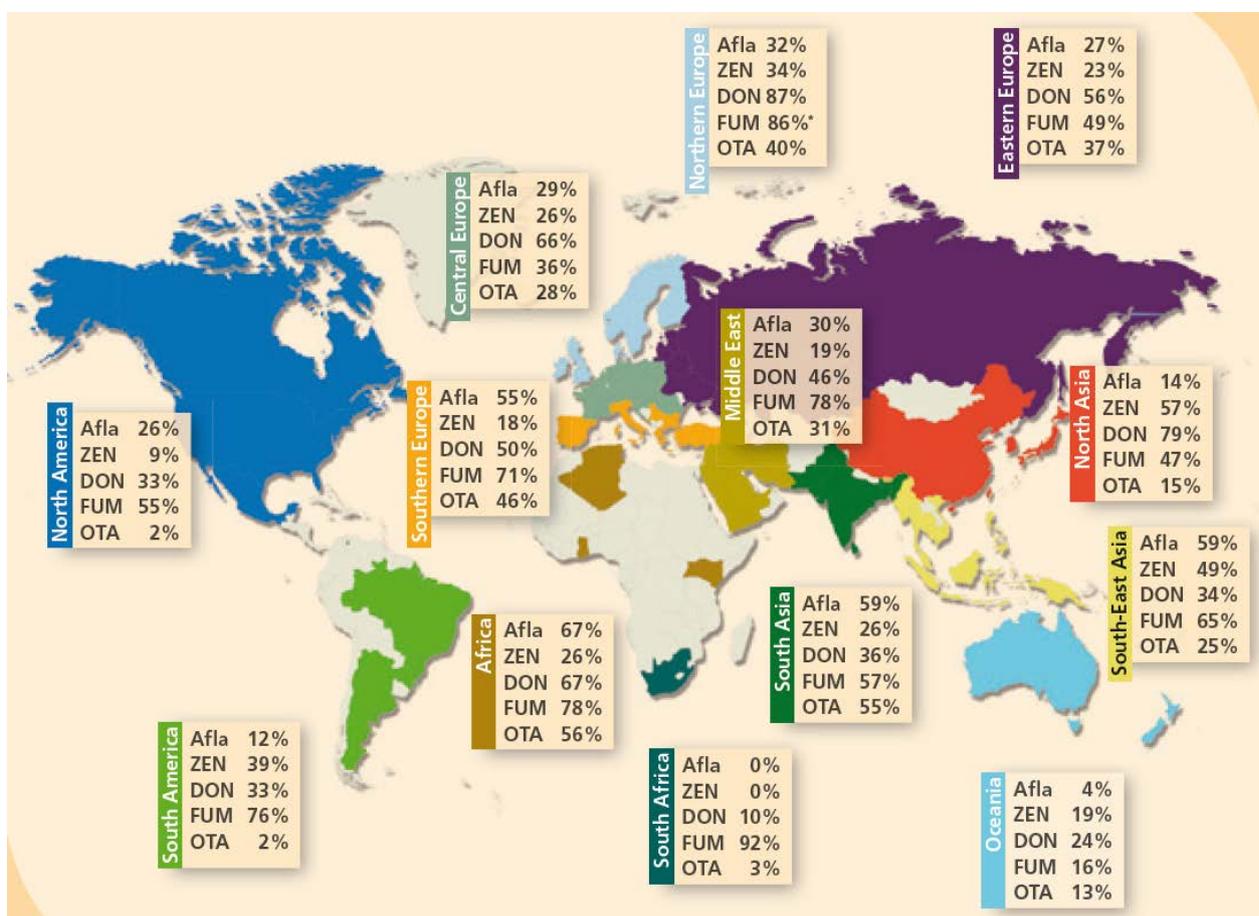
Como se ha dicho, los principales mohos que causan la contaminación por aflatoxinas son *A. flavus* y *A. parasiticus*, que pueden presentarse aislados o coexistir en comunidades complejas de microbiota y micobiota (Cotty y Jaime-García, 2007). Estos hongos colonizan plantas estresadas durante la precosecha, por lo que las aflatoxinas pueden aparecer ya en el momento de la cosecha (Miller, 2008). La infección por mohos aflatoxigénicos y la

subsiguiente síntesis de aflatoxinas se ven favorecidas por climas cálidos y condiciones de sequía que debilitan las defensas de las plantas. Asimismo, los mohos pueden persistir durante el proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios, por lo que son un riesgo cuando las condiciones de transporte y almacenamiento no son adecuadas (Shephard, 2008). En la fase de almacenamiento, las aflatoxinas se incrementan en condiciones favorables de temperatura y humedad.

El proceso de contaminación con AF es complejo y la primera fase comienza en el campo, donde los cultivos se infectan por esporas de *Aspergillus* que se encuentran en el suelo, agua y material vegetal en descomposición. La infección es promovida por el estrés o daño en el cultivo debido a la sequía, infestación por insectos, mala sincronización de cosechas, lluvias fuertes en cosecha o posteriores a ésta (Hell et al., 2000; Vieira, 2003; Turner et al., 2005).

La incidencia de micotoxinas alrededor del mundo varía de año en año, dependiendo de las condiciones ambientales. A nivel mundial, del 30% al 100% de las muestras de materias primas y piensos están contaminadas por micotoxinas (Pinotti et al., 2016). Según datos mundiales de la empresa de alimentación animal Biomin, en el año 2014 se estimó que hasta el 81% de todas las muestras de productos destinados a la alimentación animal estaban contaminadas con al menos una micotoxina y en el 45% se encontró más de una micotoxina (Figura 5). La incidencia global de aflatoxinas fue del 32%. Por comparación, en la encuesta de 2018 el porcentaje global de positividad ha sido del 67% y el 47% de las muestras presentó más de una micotoxina. De todas las muestras analizadas se encontró que las de maíz grano contenían las concentraciones más altas de aflatoxinas (Biomin World Mycotoxin Survey, 2014 y 2018, disponibles en <https://www.biomin.net>).

Además, el informe Biomin del año 2014, señala una alta incidencia de aflatoxinas en muestras recogidas en Europa, del 32% en el norte de Europa y del 55% en el sur de Europa. Esta alta incidencia podría estar relacionada con el cambio climático, caracterizado por el incremento de la temperatura y los cambios en el régimen hídrico (ciclos de lluvia y sequía). Esto supone un motivo de preocupación por la amenaza global de las micotoxinas, debido al cambio en los patrones y en las condiciones del clima.



**Figura 5.** Prevalencia de micotoxinas en productos para alimentación animal.

**Fuente:** <https://www.biomin.net/en/biomin-mycotoxin-survey/>

La última encuesta mundial disponible (Biomin World Mycotoxin Survey, 2018), aporta datos de prevalencia de aflatoxinas en materias primas analizadas en Europa (16% positividad, n = 2470), Asia (38% positividad, n = 2838), América de Norte (6% positividad, n = 1496), América del Sur (23% positividad, n = 6943), Oriente Medio (15% positividad, n = 168) y África (11% positividad, n = 469).

Como se ha indicado anteriormente, la producción de aflatoxinas depende de múltiples factores ambientales, tales como la temperatura y la humedad. Estos factores afectan directamente a la infección y el crecimiento de los mohos (Nazari et al., 2014). El actual cambio climático está provocando que muchas regiones estén experimentando un aumento de la temperatura media y cambios en el régimen hídrico, con épocas de sequía en alternancia con lluvias moderadas durante las estaciones secas, e incluso fenómenos meteorológicos extremos (olas de calor e inundaciones) (Qi et al., 2013).

Battilani et al. (2016) han realizado un estudio de modelización, predicción y mapeo de la aparición de aflatoxinas en los cereales en la UE debido al cambio climático. Utilizando las predicciones del Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC), trabajaron con tres escenarios de aumento de temperatura atmosférica: actual, + 2 °C y + 5 °C. Se utilizaron los datos meteorológicos de temperatura, humedad relativa y lluvia para un período de 100 años (de 2000 a 2100), en una cuadrícula de 50 × 50 km en Europa. Como resultado, se vaticina que el riesgo de contaminación por *A. flavus* aumentara en el maíz, tanto en los escenarios de + 2°C como de + 5°C del cambio climático en Europa. De acuerdo con los resultados de dicho estudio, se espera que el aumento del riesgo de contaminación por aflatoxinas en el maíz, principalmente en el escenario de + 2 °C. En este escenario, se mostró un claro aumento en el riesgo de aflatoxinas en áreas agrícolas del centro y sur de España, el sur de Italia y los Balcanes.

Los países con más proximidad a los polos están experimentando un clima inusual que favorece la aparición de aflatoxinas en dichas latitudes. Por ejemplo, en un interesante estudio llevado a cabo en el sur de Noruega, los autores encontraron metabolitos de *Aspergillus* (por ejemplo, esterigmatocistina) en concentraciones de hasta 20 µg/kg en muestras recolectadas durante las estaciones húmedas de verano (Uhlig et al., 2013; Medina et al., 2014).

No en vano, en los últimos años se han notificado en la UE algunos episodios de contaminación por aflatoxinas en cultivos (maíz) y leche de vaca que han sido relacionados con el cambio climático. En 2003 y en 2008, los brotes fueron informados en Italia, y en 2013 sucedió un gran brote de contaminación de maíz por AF en los Balcanes (De Rijk et al., 2015). También en 2015 se informaron de varios incumplimientos con los límites legales vigentes en Europa para las aflatoxinas en el norte de Italia. Sin embargo, el verano de 2014 fue más suave y lluvioso, y se informó sobre una reducción importante sobre los niveles de contaminación por AF en las mismas áreas geográficas, en contraste con los datos reportados para el período 2009-2011 (Camardo et al., 2015). En España, se han notificado episodios de contaminación por aflatoxina M1 en leche procedente de varias regiones, destacando las crisis de los años 2013 y 2015 que afectaron al sector de vacuno lechero en zonas del sur de España (<https://andaluciainformacion.es/andalucia/562812/el-fantasma-de-la-aflatoxina-en-la-leche-sobrevuela-de-nuevo-a-covap/>)

La incidencia de aflatoxinas en materias primas, piensos y alimentos, aparte de su importancia para la seguridad alimentaria, plantea graves consecuencias económicas en el comercio internacional, sobre todo para los países productores (Vasanthi y Bhat, 1998; Otsuki, 2001). La UE está decidida a reducir la importación de productos alimenticios con alto riesgo de aflatoxinas, especialmente cacahuetes y maíz, de los países africanos (Chad,

Egipto, Gambia, Mali, Nigeria, Senegal, Sudáfrica, Sudán y Zimbabue). Esto supone unas pérdidas en el comercio, de alrededor de 750 millones de dólares por año (Keith, 2007)

Se estima que sólo en Estados Unidos las pérdidas económicas determinadas por las micotoxinas son de alrededor de 1.000 millones de dólares al año (Bhatnagar et al., 2003). Las pérdidas económicas asociadas con la contaminación de aflatoxinas no sólo se limitan al rechazo de los alimentos o piensos, sino que también suponen un deterioro de las relaciones comerciales, la pérdida de ingresos, de medios de vida, las pérdidas por los costes de salud, gastos veterinarios, el coste por la pérdida de alimentos y piensos y el gasto en los sistemas de vigilancia y control (WHO, 2015).

#### **3.6.1. Aflatoxinas y productos para alimentación animal**

En primer lugar, vamos a describir los productos destinados a la alimentación animal, especialmente aquellos utilizados en ganado lechero. En la alimentación de la vaca lechera, las materias primas y forrajes para piensos, así como los piensos compuestos son los productos más utilizados por los ganaderos (INFOCARNE, 2015). La mayoría de explotaciones de vacuno lechero, basan la alimentación de las vacas en la ración unifeed o ración completa mezclada, también denominada TMR por sus siglas en inglés (*Total Mixed Ration*). La ración unifeed consiste en una mezcla completa y equilibrada de productos concentrados y de forrajes, que suministra a la vaca (o grupo de vacas) todos los nutrientes necesarios en 24 horas (Callejo, 2015). La producción de leche en España ha sufrido una importante reestructuración en los últimos años, motivada por la necesidad de mejorar la competitividad. El resultado ha sido la reducción del número de ganaderos, el aumento del tamaño medio de explotaciones y de la producción media por animal, y la intensificación de los sistemas productivos. En la actualidad, la mayor parte de la leche de vaca producida en

España procede de explotaciones de vacas Frisonas estabuladas, alimentadas por lotes con sistemas de raciones completas (Calsamiglia et al., 2009).

Las materias primas para piensos, se utilizan para satisfacer las necesidades de energía, nutrientes, minerales y fibras dietéticas de los animales, así como para mantener la productividad. Por lo general, no están químicamente bien definidas, excepto para los componentes nutricionales básicos. Las materias primas son productos agrícolas muy diversos, de origen vegetal o animal, incluyendo forrajes, granos de cereal y de leguminosas, semillas, frutos, tubérculos y raíces, así como una gran variedad de productos derivados de su transformación industrial. Los forrajes consisten en partes vegetativas de plantas gramíneas, leguminosas u otras, que contienen una alta proporción de fibra, como ensilados de maíz, raigrás y alfalfa, paja de cereales, heno, hierba, etc.

Dentro de los grupos de materias primas para alimentación animal en España, los cereales y productos derivados son los más importantes en volumen, con casi 68% del total, seguidos del grupo de las oleaginosas y productos derivados, que alcanza un 18,2% (MAPA, 2018). De entre los granos de cereales destacan maíz y trigo, con 7 millones de Tm cada uno, seguido de la cebada con 6,7 millones de Tm; los derivados de cereales alcanzan 2,8 millones de Tm. Las oleaginosas más utilizadas son soja, girasol y algodón (MAPA, 2018).

Los piensos compuestos son mezclas de al menos dos materias primas para piensos (Reglamento (CE) nº 767/2009), a los que se suelen añadir aminoácidos, vitaminas, minerales y aditivos autorizados. Los piensos compuestos se pueden comercializar en forma de pienso completo o pienso complementario; la diferencia es que el pienso completo, debido a su composición, es suficiente para una ración completa diaria. El pienso complementario, aunque puede tener un contenido elevado de determinadas sustancias, debe unirse a otro/s para constituir la ración completa destinada a un animal. En

explotaciones pequeñas o medianas de vacuno lechero, es relativamente frecuente mezclar un pienso compuesto comercial con la ración de forrajes.

Debido a su composición y condiciones de conservación, tanto las materias primas como los piensos destinados a la alimentación animal son susceptibles de contaminación fúngica y posterior producción de micotoxinas. El grano de cereales y leguminosas se utiliza para obtener harinas, que constituyen un ingrediente concentrado utilizado habitualmente en la elaboración de dietas para animales. En el caso de los cereales, durante el cultivo y periodo de floración, pueden infectarse por mohos aflatoxigénicos que en condiciones adecuadas pueden sintetizar aflatoxinas en precosecha. Además, durante su procesado posterior los granos de cereales (especialmente de maíz) deben desecarse hasta alcanzar un grado de humedad del 14% y almacenarse en condiciones adecuadas. Un fallo en el desecado o un abuso de temperatura y humedad durante el almacenamiento, puede conducir también a la síntesis de aflatoxinas.

Asimismo, los forrajes que se suministran a los animales pueden proceder directamente de pastos verdes (forrajes húmedos) o ser suministrados tras un proceso de conservación como el ensilado o henificado. El ensilado es un alimento para el ganado, muy utilizado para alimentar a las vacas en producción de leche, que se obtiene de los forrajes húmedos (i.e. planta entera de maíz, pastoreo de mazorcas), conservados en silos y transformados por fermentación láctica. El henificado es el proceso de conservación del forraje una vez segado, secado y empacado. El heno en seco no posee tantos elementos nutritivos como el ensilado, sin embargo, al estar libre de fermentaciones en el proceso, puede usarse en la alimentación tanto de animales adultos como en crías. En cuanto a los cultivos o pastos verdes, las semillas de alfalfa, gramíneas verdes y otras plantas pueden

contener mohos aflatoxigénicos que pueden desarrollarse y producir aflatoxinas y otras micotoxinas (Ramos, 2011).

La cosecha en verde de varios productos agrícolas se puede conservar mediante el ensilado. El producto se compacta, a veces, con la adición de fungistáticos (i.e. ácido fórmico, propiónico), melaza y cultivos bacterianos para facilitar el proceso de fermentación del ensilado y descenso del pH. De esta forma se obtiene un producto relativamente seco y ácido, que se conserva anaeróbicamente para evitar la proliferación de los mohos. En el momento que se abre el silo y se empieza a cortar para alimentar al ganado, se puede enmohecer y contaminar con aflatoxinas y otras micotoxinas. Además, fallos durante el ensilado, como un compactado insuficiente, pueden dejar zonas con aire en la que se desarrollan los mohos (Ramos, 2011). Por todo ello, los ensilados, muy utilizados en la alimentación de ganado lechero, pueden contener aflatoxinas.

El henificado, como se ha dicho, es el proceso de conservación del forraje una vez segado, secado y empacado. Es una técnica muy utilizada en España debido a su bajo coste. El heno consiste en secar al sol o en deshidratadoras y prensar en balas la cosecha del pasto en verde. Durante el secado en el campo, puede contaminarse fácilmente con tierra y lluvia, lo que conduce al desarrollo de mohos (Ramos, 2011).

Otro tipo de producto utilizado en la ración del ganado lechero, son los productos derivados de oleaginosas como soja, colza, girasol y cacahuete. Estas plantas son muy susceptibles a la contaminación por mohos *Aspergillus* aflatoxigénicos, especialmente en países tropicales o subtropicales, y, consecuentemente, pueden contener aflatoxinas. Esto ha provocado que al utilizarse como ingredientes en alimentación animal, hayan sido responsables, con frecuencia, de la presencia de M1 en la leche (Gizachew et al., 2016).

Como dijimos al inicio, un tipo de alimentación muy utilizada en los últimos años para la alimentación de ganado lechero, es la ración unifeed o ración completa mezclada TMR. Este sistema consiste en mezclar conjuntamente varias materias primas, forrajes y concentrados de cualquier naturaleza, en cantidades calculadas formando una mezcla homogénea (raciones completas mezcladas). El mezclado se suele realizar en la propia granja con carros mezcladores, aunque también hay fábricas que lo comercializan. El sistema de dieta unifeed permite aportar una ración nutricionalmente balanceada todo el tiempo, posibilitando a la vaca consumir la cantidad más aproximada posible a sus necesidades de energía y mantener las características físicas necesarias para la función apropiada del rumen (Vinatea, 1996). Habitualmente, el contenido en materia seca del unifeed está en torno al 50% (NRC, 2001).

Se han publicado varios estudios sobre la contaminación por aflatoxinas en productos destinados a la alimentación animal. En un trabajo clásico de Sanchis et al. (1986), se analizaron 338 muestras de alimentos y piensos en España. Las muestras de maíz ( $n = 34$ ) fueron las más frecuentemente contaminadas con *Aspergillus flavus* toxigénicos. La aflatoxina B1 se detectó en una muestra de harina integral de maíz, con una tasa de  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ , así como en 4 de las 27 muestras (14,8%) de productos para alimentación animal, a niveles por debajo de  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

En países de clima tropical y subtropical, la contaminación por aflatoxinas es un problema sumamente importante. Gizachew et al. (2016), analizaron 156 muestras de pienso de ganado lechero en Etiopía, en las que el 100% de las muestras superaban los límites permitidos por la legislación de la UE ( $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Sólo el 10% de éstas, presentaban una tasa por debajo de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Finalmente, el 26,2% de las muestras presentaba una tasa de contaminación superior a  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Respecto a la Unión Europea, una revisión de las alertas publicadas por la Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), en el periodo de cinco años 2014-2018, revela que hubo 135 notificaciones por aflatoxina B1 en la categoría “feed materials” (RASFF Portal, 2019). El 86% de notificaciones procedía de cuatro países (Reino Unido, Bélgica, Holanda y Alemania) y mayoritariamente se debían a cacahuetes. España realizó sólo 3 notificaciones relativas a aflatoxina B1, dos fueron en maíz (1 procedente de Brasil, 1 procedente de India) y una en semilla de algodón (procedente de Ghana).

#### **3.6.2. Aflatoxinas y leche**

Como ya se ha tratado anteriormente, las diferentes raciones utilizadas para la alimentación del ganado pueden estar contaminadas con aflatoxinas. En el ganado bovino la transferencia de aflatoxinas del alimento del ganado a la leche es de gran importancia, debido a las importantes pérdidas económicas que ocasiona en el sector y a las alertas notificadas en los últimos años en la Unión Europea.

Cuando se consumen piensos contaminados con aflatoxina B1, una parte se degrada en el rumen, y la porción restante se absorbe a través del tracto intestinal y pasa a plasma, para ser metabolizada rápidamente en el hígado a su metabolito hidroxilado aflatoxina M1 (Nuryono et al., 2009). Este metabolito puede encontrarse en grandes cantidades en la leche y es estable ante el procesado térmico, por lo tanto, es necesario realizar un adecuado control para detectar aflatoxinas en la producción láctea, tanto en la materia prima como en el producto terminado (Oliveira et al., 2002).

La AFM1 se detecta en leche entre 12 y 24 horas después de la ingestión de las raciones contaminadas con AFB1 (JECFA, 2001). Diaz et al. (2004) estudiaron la dinámica de transferencia de aflatoxinas en vacas lecheras durante un periodo de 16 días. Cuando las vacas consumieron raciones contaminadas con aflatoxina B1, la aflatoxina M1 apareció en

leche a las 12-24 h y fue incrementando su concentración hasta alcanzar un máximo al tercer día. Cuando se mantuvo la contaminación de las raciones, las tasas de aflatoxina M1 permanecieron elevadas. Cuando se retiró la fuente de contaminación, o se añadió un adsorbente de micotoxinas a las raciones, la leche quedaba libre de aflatoxina M1 en un plazo de 3-4 días.

Se han llevado a cabo varios estudios para establecer la tasa de transferencia de la AFB1 ingerida, con la concentración de AFM1 excretada en leche. Sin embargo, ninguno de ellos ha podido asentar una fórmula exacta que determine esta relación. Esto es debido a que la concentración de AFM1 en la leche varía según la raza de la vaca, la concentración de AFB1 en la ración, la cantidad y el tiempo de exposición al alimento contaminado y el estado de salud del animal (Gimeno, 2004). A todos estos factores debemos añadir el sistema metabólico del animal, lo que provoca que las concentraciones de AFM1 en la leche varíen entre animales, de un día para otro y de una producción de leche a la siguiente (Gimeno, 2004). Por otro lado, algunos estudios señalan que la incidencia de aflatoxinas podría estar relacionada con la variación estacional. En varios estudios, la presencia de AFM1 en muestras de leche de vaca fue significativamente mayor en otoño que en otras estaciones del año (Mahmoudi et al., 2013; Fallah et al., 2015, 2016; Guo et al., 2016; Hashemi et al., 2016; Iqbal et al., 2017; De Roma et al., 2017).

La tasa de biotransformación de la AFB1 a AFM1, en animales productores de leche, depende de la concentración de micotoxina y de los ingredientes (maíz, semillas de algodón o cacahuete) y su proporción en los piensos (Ramos, 2011). En los últimos años, son varios los trabajos que han intentado evaluar el porcentaje de esta biotransformación, mediante el análisis de muestras de productos destinados a alimentación animal y el análisis de la leche que éstos producen. Gracias a estas investigaciones, diversos autores han desarrollado

modelos matemáticos para poder predecir la tasa de contaminación de AFM1 en función del consumo de AFB1 (Peterson et al., 2001).

El Codex Alimentarius estimó en 1997 que la tasa de transferencia de aflatoxina B1 del alimento a la leche en forma de aflatoxina M1 es del orden de 0,17 a 3,3% (CAC/RCP 45-1997 del Codex Alimentarius, 1997). En la Opinión del Panel de Expertos en Contaminantes de la EFSA sobre la AFB1, se estiman porcentajes de biotransformación de aflatoxina en el rango entre 1 y 6%, basándose en estudios realizados en vacas con alta producción de leche (EFSA, 2004). Un factor a tener en cuenta, es que las vacas afectadas por mastitis presentan una alta eliminación de AFM1, debido a la gran permeabilidad de la barrera epitelial durante la inflamación de la ubre (Battacone et al., 2009; Johnson et al., 2010).

La leche y sus derivados son productos con un alto nivel de consumo, que representan una parte esencial en la dieta de forma directa o en la elaboración de alimentos infantiles por lo que la presencia de aflatoxina M1 supone una amenaza a la seguridad alimentaria (Di Natale et al., 2009). Hay que considerar que la leche es consumida principalmente por niños que se encuentran en la etapa de desarrollo, cuando el sistema inmune es más susceptible a los efectos supresores de la aflatoxina. No en vano, el Reglamento (CE) nº 1831/2003 de la Comisión Europea (CE) estableció un nivel máximo para AFM1 en leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos de 0,050 µg/kg. Asimismo, el contenido máximo de AFM1 en preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación, así como los alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, es de 0,025 µg/kg. Por contraste, tanto los EE. UU. como varios países asiáticos, han establecido un límite de 0,5 µg/kg (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, 2004; Omar, 2016).

La aflatoxina M1 está actualmente incluida, junto con las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en el Grupo 1 de IARC (carcinogénico para los humanos). Por estos motivos, surge la necesidad de establecer estrategias para controlar los productos destinados a la alimentación animal, como medida de prevención de este peligro en la cadena agroalimentaria.

Se ha evidenciado la contaminación de leche bovina por AFM1 en prácticamente todos los países del mundo. La incidencia es más elevada en países asiáticos como Irán (Bahrami et al., 2016), Pakistán (Iqbal et al., 2011; Asi et al., 2012), Tailandia (Ruangwises y Ruangwises, 2010) e India (Siddappa et al., 2012).

Al igual que sucede con los piensos, la incidencia de aflatoxinas en la leche en algunos países africanos es un problema de primera magnitud. Gizachew et al. (2016) realizaron un estudio sobre leche de vaca en Etiopía, en los que el 93% de las muestras superaban el límite máximo establecido por la UE, con un valor máximo de aflatoxina M1 de 4980 ng/kg (prácticamente 100 veces por encima del límite legal). También en este país, se realizó una investigación sobre las tasas de aflatoxina M1 (AFM1) en leche de vaca (n=45), encontrando una positividad del 71%, con un valor medio de 54 ng/kg y máximo de 146 ng/kg (Mesfin et al., 2018).

Respecto a la Unión Europea, una revisión de las alertas publicadas por la Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), en el periodo de cinco años 2014-2018, revela que hubo 15 notificaciones por aflatoxina M1 en la categoría “milk and milk products” (RASFF Portal, 2019). Trece notificaciones procedían de Italia, 1 de Holanda y 1 de Eslovenia. Las concentraciones más elevadas de aflatoxina M1 fueron notificadas en quesos (0,83 y 0,87 µg/kg), seguido de leche (0,45 µg/kg).

Asimismo, se ha informado sobre la contaminación por AFM1 en leche humana en varios países, como Brasil (Navas et al., 2005), Italia (Galvano et al., 2008) y Turquía (Gürbay et al., 2010).

### **3.7. Prevención y detoxificación de aflatoxinas**

#### ***3.7.1. Estrategias para la prevención y control de aflatoxinas***

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, el 25% de los productos agrícolas del mundo están contaminados con micotoxinas, lo que conduce a pérdidas económicas significativas (Aziz et al., 2002). Por ello, la prevención y reducción de la presencia de micotoxinas en materias primas, piensos y alimentos es fundamental y puede conseguirse mediante la aplicación de determinadas medidas preventivas y de control a lo largo de toda la cadena agroalimentaria.

La aplicación de un Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos, podría contribuir a reducir la presencia de micotoxinas en los alimentos. De esta manera, se introducirían medidas preventivas en todas aquellas fases donde se sabe que existe una mayor probabilidad de que se produzca esta contaminación, o que ésta se incremente hasta niveles inaceptables (Kabak et al., 2006).

Las buenas prácticas agrícolas incluyen la plantación de variedades de cereales más resistentes, evitando las altas densidades de las plantas, el manejo preventivo de las infestaciones de insectos, así como el manejo adecuado de residuos de cultivos que a menudo son el inóculo primario de los hongos micotoxigénicos. Se sabe que las prácticas de manejo de campo apropiadas, tales como la rotación de cultivos, el laboreo del suelo, el riego y la fertilización pueden reducir la formación de micotoxinas en el campo (Ariño et al., 2009; Kabak et al., 2006). La selección cuidadosa de la fecha de cosecha y de los procedimientos de cosecha, reducen el riesgo de micotoxinas y minimizan el daño a los cultivos (Murphy et al.,

2006). En este sentido, se están desarrollando modelos de predicción que integran algunos de estos parámetros de campo e información meteorológica para evaluar el riesgo de contaminación por micotoxinas de los cereales antes de la cosecha (Jouany, 2007; Nesic, 2018).

Durante la postcosecha, el almacenamiento y la distribución, el control de los niveles de humedad de los granos almacenados (menos del 15%,  $a_w < 0,70$ ), el mantenimiento a bajas temperaturas, el control de insectos y la preservación de la integridad de los granos son fundamentales para prevenir la producción de micotoxinas (Kabak et al., 2006).

A raíz de los incidentes con aflatoxinas ocurridos en el sur de España, la Junta de Andalucía ha elaborado un Plan integral de vigilancia y control de aflatoxinas a lo largo de toda la cadena alimentaria (Junta de Andalucía, 2017), con recomendaciones de prevención y control para el sector agrícola, el sector de la alimentación animal y el sector ganadero.

Junto con las estrategias de prevención de mohos y micotoxinas basadas en las buenas prácticas agrícolas y de almacenamiento, se han ensayado otras tecnologías como el biocontrol por agentes competitivos. En lo relativo a las aflatoxinas, destaca el uso del producto AFLASAFE en productos agrícolas susceptibles como leguminosas y cereales (Bandyopadhyay et al., 2016). El producto Aflasafe se basa en la utilización de cepas no toxigénicas de *Aspergillus flavus*, vehiculadas en semillas de sorgo, que se esparcen por la tierra de cultivo. El hongo se desarrolla y coloniza el suelo y las plantas cultivadas (cacahuete, maíz), de manera que compite frente a cepas naturales toxigénicas impidiendo que se establezcan en los cultivos y que produzcan aflatoxinas (AFLASAFE, 2019).

El uso de conservantes naturales como aditivos en alimentación animal para prevenir el crecimiento fúngico, ha sido ampliamente estudiado, enfocado principalmente a los ácidos orgánicos (y sus sales), como ácido fórmico, acético, propiónico, sórbico y láctico

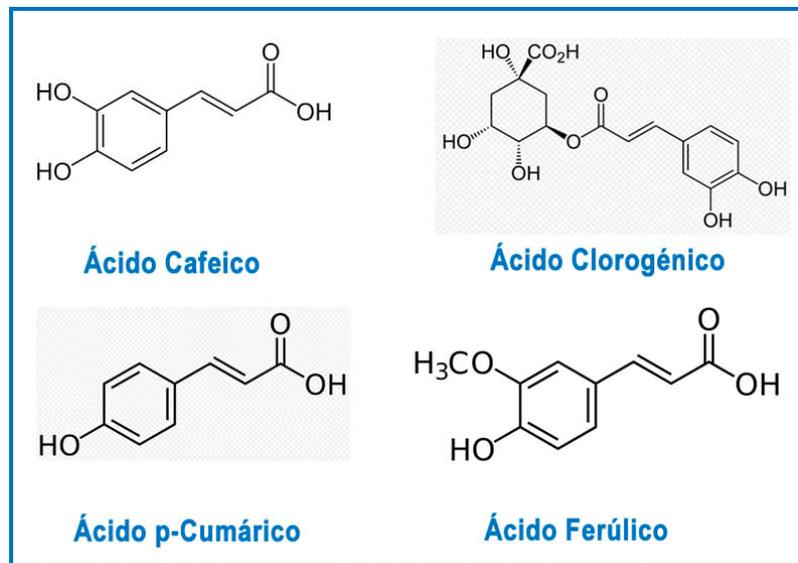
(Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para Animales - CESFAC, 2016). Los conservantes utilizados como aditivos tecnológicos en alimentación animal, se definen como sustancias o, en su caso, los microorganismos que protegen los piensos contra el deterioro causado por microorganismos o sus metabolitos. También se ha planteado la utilización de otros antifúngicos naturales, como aceites esenciales y compuestos bioactivos procedentes de plantas (Cruz et al., 2013; Friedman y Rasooly, 2013; Prakash et al., 2015). En algunos estudios, la producción de aflatoxinas se ve inhibida por la utilización de aceites esenciales naturales (Passone et al., 2005; Ferrochio et al., 2013), el inconveniente radica en que, en ocasiones, pueden alterar las propiedades organolépticas del producto. Los agentes antifúngicos ideales deben ser capaces de inhibir completamente el crecimiento y la producción de micotoxinas en niveles que no alteren la aceptabilidad sensorial del producto tratado (Samapundo et al., 2007).

#### **3.7.2. Ácidos fenólicos como antifúngicos naturales**

Durante los últimos años, ha habido un considerable interés de las industrias agroalimentarias por encontrar nuevos métodos que garanticen la seguridad alimentaria, debido al aumento en la incidencia de toxiinfecciones alimentarias, junto con la creciente demanda del consumo de alimentos con bajos niveles de aditivos químicos de síntesis.

Los compuestos fenólicos son un grupo de fitoquímicos presentes en cereales, frutas y vegetales que ha sido ampliamente estudiado y ha recibido un creciente interés por sus propiedades antioxidantes y por sus efectos beneficiosos para la salud, entre ellos la protección frente a enfermedades cardiovasculares y cáncer (Ou y Kwok, 2004; Acosta-Estrada et al., 2014). Son uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios encontrados en plantas comestibles. En la naturaleza están involucrados en el crecimiento de las plantas y en la reproducción, en proporcionar resistencia a patógenos y depredadores,

proteger los cultivos de enfermedades y evitar la germinación de las semillas antes de la cosecha (Ross y Kasum, 2002). Un tipo importante de compuestos fenólicos son los ácidos fenólicos, cuyos principales representantes se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Ejemplos de algunos ácidos fenólicos presentes en alimentos.

**Fuente:** Peñarrieta et al. (2014).

Los ácidos fenólicos se pueden subdividir en dos grupos principales, los derivados del ácido hidroxibenzoico y los derivados del ácido hidroxicinámico. Los derivados del ácido hidroxibenzoico incluyen componentes como el ácido *p*-hidroxibenzoico, el ácido protocatecuico, el ácido vanílico, el ácido sirínico y el ácido gálico (Erdogan et al., 2014). En su forma ligada, son componentes típicos de estructuras complejas como las ligninas y taninos hidrolizables. Los derivados de ácido hidroxicinámico incluyen sustancias como los ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumárico y sinápico. De igual modo, en su forma ligada, se encuentran unidos a los componentes estructurales de la pared celular tales como la celulosa, lignina, y proteínas, a través de enlaces éster.

La principal cantidad de ácido ferúlico se encuentra, principalmente, en las semillas y las hojas de las plantas, conjugado covalentemente a mono y disacáridos, polisacáridos de la

pared celular vegetal, glicoproteínas, poliaminas, lignina, y biopolímeros de hidratos de carbono insolubles. El ácido clorogénico y la curcumina también son derivados del ácido hidroxicinámico. El ácido clorogénico es un éster del ácido cafeico, mientras que la curcumina está formada por dos moléculas de ácido ferúlico (Wu et al., 2010).

El interés por los ácidos fenólicos se ha incrementado asimismo porque podrían ser una alternativa como aditivos conservantes en alimentación animal, puesto que varios estudios *in vitro* han mostrado que estos compuestos tienen propiedades inhibitorias del crecimiento fúngico de mohos toxigénicos, así como efectos inhibitorios en la producción de micotoxinas (Zabka y Pavela, 2013; Ferruz et al., 2016). Los ácidos fenólicos han mostrado ser inhibidores *in vitro* del crecimiento de algunas especies de mohos *Aspergillus* (Nesci et al., 2009; Romero et al., 2009).

Además, existe evidencia acerca de la capacidad de los compuestos fenólicos para inhibir la producción de varias micotoxinas de *Fusarium* incluyendo las fumonisinas y los tricotecenos (Sampietro et al., 2013; Atanasova-Penichon et al., 2016).

#### **3.7.3. Detoxificación de aflatoxinas**

La detoxificación consiste en eliminar o reducir los efectos tóxicos de las micotoxinas, lo que se puede realizar por métodos químicos, físicos o (micro)biológicos. La efectividad de un método de detoxificación depende de varios factores como la naturaleza del producto contaminado, las condiciones del propio tratamiento y el tipo de micotoxina. Los tratamientos de detoxificación tienen limitaciones, como que ninguno de los métodos actualmente disponibles es adecuado para todos los alimentos y todas las micotoxinas, a lo que se une que pueden afectar negativamente al valor nutricional de los productos tratados (Kabak et al., 2006). No obstante, en lo atinente a la detoxificación de micotoxinas, hay que

distinguir muy claramente entre los procesos aplicables a productos alimenticios y a productos destinados a la alimentación animal.

En el propio Reglamento (CE) nº 1881/2006, se recogen las prohibiciones relativas al uso, la mezcla y la detoxificación de micotoxinas en productos alimenticios, que se resumen en:

1. Los productos alimenticios que incumplan los contenidos máximos legalmente establecidos no se utilizarán como ingredientes alimentarios.

2. Los productos alimenticios que superen los contenidos máximos legalmente establecidos no se mezclarán con productos alimenticios que cumplan los contenidos máximos establecidos.

3. Los productos alimenticios que contengan micotoxinas no serán detoxificados deliberadamente con tratamientos químicos.

En la práctica significa que los productos alimenticios que contengan micotoxinas no se pueden detoxificar con tratamientos químicos. No obstante, cuando se trata de productos destinados a la alimentación animal, incluso cuando son no conformes, se permiten los procesos de detoxificación autorizados bajo ciertas condiciones.

El Reglamento (UE) nº 2015/786 define los criterios de aceptabilidad de los procesos de detoxificación aplicados a los productos destinados a la alimentación animal. Dicho Reglamento se aplica al proceso de detoxificación por el que una sustancia indeseable, como las micotoxinas, se elimina intencionalmente de los piensos contaminados no conformes mediante procesos físicos, se descompone o destruye mediante una sustancia química en compuestos inofensivos, o se metaboliza, destruye o desactiva mediante un proceso (micro)biológico en compuestos inofensivos.

Durante varias décadas, se han llevado a cabo investigaciones sobre la detoxificación de micotoxinas en productos agrícolas con la finalidad de encontrar métodos apropiados que puedan aplicarse en condiciones prácticas. Dos tratamientos químicos que han recibido atención considerable son la amoniación y la reacción con bisulfito del sodio, utilizados en alimentación animal con productos contaminado con aflatoxinas. En particular, la amoniación es un procedimiento aprobado para la detoxificación de maíz y cacahuets contaminados con aflatoxinas en varios países, siempre que el destino sea la alimentación animal (Boudergue et al., 2009). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), está realizando actualmente una evaluación científica del proceso de amoniación para la detoxificación de aflatoxina B1 en harina de cacahuete (EFSA-Q-2016-00799).

#### ***3.7.4. Reductores de la contaminación de los piensos por aflatoxinas***

Las dos estrategias más utilizadas en alimentación animal para reducir la contaminación de los piensos por micotoxinas, son los agentes adsorbentes y los agentes de biotransformación. Los agentes de absorción de micotoxinas son compuestos de gran peso molecular que se unen a las micotoxinas presentes en los productos contaminados sin disociarse en el tracto gastrointestinal del animal, lo que limita su biodisponibilidad después de la ingestión y disminuye la exposición de los animales a las micotoxinas (Vila-Donat et al., 2018). Las micotoxinas se pueden unir a los agentes adsorbentes por diferentes tipos de interacciones, como la unión hidrofóbica, los enlaces de hidrógeno, la atracción electrostática o los enlaces de repulsión y coordinación (Di Gregorio et al., 2014). De esta manera, el complejo de agentes de absorción de micotoxinas pasa a través del tracto digestivo del animal y se elimina a través de las heces. Este complejo debe ser estable a lo largo de toda la vía digestiva, por lo que hay que conocer su estabilidad a los cambios de pH, que está influenciado por las propiedades físicas de los agentes de adsorción (carga total y

distribución de la carga, el tamaño de los poros y el área de superficie accesible) y por las propiedades fisicoquímicas de las micotoxinas (polaridad, solubilidad y forma) (Avantaggiato et al., 2005; Kabak et al., 2006).

Los agentes de adsorción también se conocen como aglutinantes de micotoxinas, agentes de unión a micotoxinas, agentes secuestrantes o adsorbentes. Estos agentes se pueden dividir en tres subgrupos: compuestos inorgánicos, orgánicos o sintéticos (Di Gregorio et al., 2014).

Otra estrategia es la degradación de las micotoxinas en metabolitos no tóxicos mediante el uso de agentes de biotransformación. La biotransformación se puede lograr mediante enzimas que degradan las micotoxinas o por microorganismos que producen dichas enzimas. Varias especies microbianas, incluyendo bacterias, levaduras y hongos, han sido reconocidas por su capacidad para biotransformar las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos a través de diversas rutas bioquímicas (Wielogórska et al., 2016). Sin embargo, la aplicación en la práctica de los agentes de biotransformación es limitada debido a la falta de información sobre los mecanismos de transformación, la toxicidad de los productos derivados de la biotransformación, el efecto de las reacciones de transformación en los valores nutricionales de los alimentos y la seguridad para los animales.

En el anexo I del Reglamento (CE) nº 1831/2003 sobre aditivos en la alimentación animal, se añadió en la categoría de los aditivos tecnológicos un nuevo grupo funcional de aditivos reductores de la contaminación de los piensos por micotoxinas, definido como sustancias que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción o modificar el modo de acción de las micotoxinas. La denominación abreviada para dicho grupo funcional es “reductores de micotoxinas”. Como dichos aditivos no modifican el nivel de la sustancia indeseable en los piensos, éstos no se detoxifican con su uso y, por lo tanto, el uso de dichos

aditivos no se considera un proceso de detoxificación según el Reglamento (UE) nº 2015/786. Además, como tales productos no están destinados al uso en piensos no conformes, quedan fuera de dicho ámbito de aplicación.

En los últimos años, ha despertado interés el uso de aditivos alimentarios para adsorber micotoxinas y reducir los efectos tóxicos en animales de granja, debido a que es fácil de realizar en la práctica. Estos aditivos tienen la capacidad de adsorber micotoxinas en el tracto intestinal y excretarlas a través de las heces. En 2009, la EFSA encargó una revisión de los agentes adsorbentes de micotoxinas utilizados como aditivos para piensos (Boudergue et al., 2009). El documento contenía el modo de acción, la eficacia y la seguridad alimentaria. Se destacaron varias áreas de preocupación, incluyendo posibles efectos antinutricionales, reversibilidad de la adsorción, posible excreción de componentes tóxicos, particularmente en productos comestibles (leche, huevos), y contaminación con otros agentes como bacterias patógenas. Se reconoció que cada situación es diferente y se recomendó revisar las pautas establecidas para evaluar el riesgo del uso de los productos (Boudergue et al., 2009).

Se han realizado una cantidad considerable de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar la eficacia de los diferentes agentes adsorbentes de micotoxinas. Los estudios *in vitro*, incluyen generalmente experimentos de concentración única en soluciones tampón (buffer) a distintos valores de pH o en jugos gastrointestinales artificiales, mientras que los estudios *in vivo* emplean modelos animales para evaluar el rendimiento de los agentes en condiciones fisiológicas más realistas (Ramos y Hernández, 1996; Díaz, 2002; Tomašević-Čanović et al., 2003; Avantiaggiato et al., 2005; Di Gregorio et al., 2014).

Los ensayos *in vitro* son una importante herramienta de preselección para la evaluación inicial del modo de acción y el rendimiento de los materiales secuestrantes antes

de pasar a costosas y exigentes pruebas *in vivo*. Sin embargo, se han publicado numerosas discrepancias entre los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* (Kolossova y Stroka, 2011).

Smith et al. (2006) seleccionaron una gama de arcillas para adsorber AFB1 en solución tampón, y los resultados mostraron un alto grado de adsorción por parte de algunas, tales como bentonita y montmorillonita. También se ha demostrado que otros adsorbentes como el carbón activado y los polímeros, como la colestiramina y la polivinilpirrolidona, son capaces de unirse *in vitro* a las AF y otras micotoxinas. Sin embargo, algunos adsorbentes son relativamente inespecíficos y, por lo tanto, los nutrientes esenciales también son adsorbidos, como sucede en el caso del carbón activo (Aravind et al., 2003; Yiannikouris et al., 2004).

La adsorción puede describirse como un fenómeno por el cual un sólido o un líquido atrae y retiene en su superficie gases, vapores, líquidos o cuerpos disueltos. Los adsorbentes adicionados a los piensos, actúan atrapando las micotoxinas en el tracto gastrointestinal, impidiendo que estén disponibles para actuar sobre los órganos diana (Phillips et al., 1991). Las características más importantes del adsorbente, incluyen su estructura física, carga, tamaño de poro y área de superficie de contacto (Kolossova y Stroka, 2011). Las principales ventajas de los adsorbentes son su bajo precio, que son, generalmente, reconocidos como seguros (GRAS) y que se pueden agregar fácilmente a los alimentos para animales. Mayoritariamente, los adsorbentes son de naturaleza inorgánica (carbón, minerales de arcilla) u orgánica, como los que derivan de diversas fibras vegetales, algas y pared celular de levaduras y microorganismos (Whitlow, 2006; Smith et al., 2007; Sabater-Vilar et al., 2007; Denli et al., 2008), aunque también existen adsorbentes sintéticos como las arcillas modificadas y los polímeros.

#### 3.7.4.1. **Adsorbentes inorgánicos**

Dentro del grupo de los aluminosilicatos, hay dos subclases principales: filosilicatos y tectosilicatos. Los filosilicatos incluyen bentonitas, montmorillonitas, esmectitas, caolinitas e illitas. Pueden adsorber sustancias en su superficie o dentro de su espacio interlamilar. Los tectosilicatos incluyen zeolitas, que proporcionan una superficie de unión grande y específica, pero también una selectividad de tamaño, forma y carga a modo de tamices moleculares (Vila-Donat et al., 2018). En general, todos los aluminosilicatos son eficaces en la fijación de aflatoxina B1. A continuación, se describen algunos de los más utilizados:

**Bentonita:** la bentonita es una roca altamente coloidal que contiene principalmente montmorillonita, y también puede contener feldespato, cristobalita y cuarzo cristalino. Tiene una estructura cristalina constituida, principalmente, por alúmina y tetraedros de sílice, y posee una capacidad de intercambio de cationes muy alta (Kolossova y Stroka, 2011). La bentonita es un adsorbente mineral con una gran capacidad para fijar aflatoxinas, que oscila entre el 90 y el 99% (Huwig et al., 2001; Kong et al., 2014).

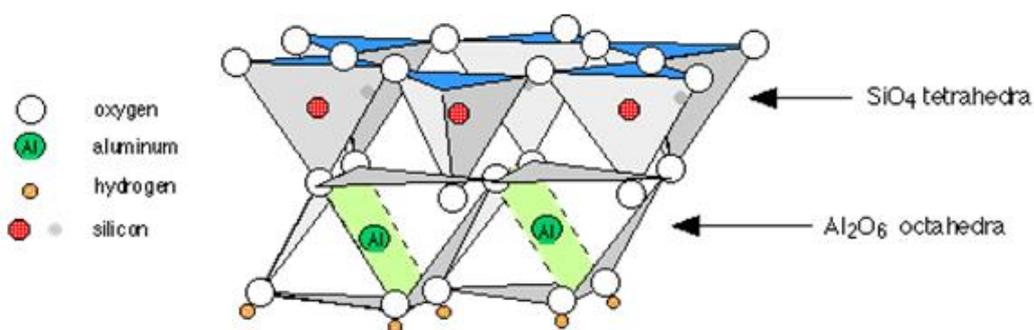
Se ha demostrado la capacidad *in vitro* de la bentonita para adsorber aflatoxinas en medios acuosos, a diferentes valores de pH y, en menor grado, en el jugo gástrico (Vila-Donat et al., 2017; Vila-Donat et al., 2018). La EFSA también ha evaluado la seguridad y eficacia de la bentonita como aditivo para piensos. Se ha observado que la bentonita no es genotóxica y no se absorbe después de ser aplicada como aditivo para piensos, por lo que no proporciona ningún riesgo toxicológico directo para el animal (EFSA, 2011).

El primer producto adsorbente de micotoxina autorizado por la UE ha sido una bentonita/montmorillonita dioctaédrica (Mycofix, Biomin, Austria). La UE permite su incorporación en el pienso hasta un máximo del 2% en todas las especies animales. La

capacidad de fijación de aflatoxina B1 de esta bentonita es superior al 90% (Reglamento de Ejecución UE nº 1060/2013)

**Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado (HSCAS):** este aglutinante se considera uno de los productos más eficaces para la adsorción de aflatoxinas. Como la mayoría de los otros adsorbentes, HSCAS ya se había vendido como un agente antiaglomerante para alimentos para animales. Ha sido bien estudiado y se ha encontrado que es capaz de formar un complejo estable con las aflatoxinas a temperaturas entre 25 °C y 37 °C. La adición de HSCAS en los piensos, en un porcentaje de entre 0,5-2%, es capaz de adsorber hasta 7,5 mg de AFB1/kg de pienso. Sin embargo, aunque tiene gran afinidad por las aflatoxinas, puede no ser efectivo frente a otras micotoxinas en los alimentos (Phillips, 1999; Harper et al., 2010; Neeff et al., 2013).

**Montmorillonita (MMT):** El nombre deriva de la Ciudad francesa Montmorillon, donde fue descubierta por Damour y Salvétat en 1847. Es una arcilla (silicato laminar) del grupo de las esmectitas. Su estructura consiste en dos láminas tetraédricas de sílice que intercalan una capa constituida por aluminio coordinado octaédricamente con átomos de oxígeno o grupos hidroxilo. La estructura de la Montmorillonita en capas 2:1 le confiere la propiedad de ser expandible y tener varios puntos de unión (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura tridimensional de las montmorillonitas.

**Fuente:** [www.nutricionanimal.info](http://www.nutricionanimal.info)

Se encuentra con frecuencia como producto de alteración de rocas eruptivas de tipo ácido (pegmatitas, granulitas, dioritas), aunque también se pueden encontrar montmorillonitas de origen sedimentario. Los mayores depósitos se encuentran en Wyoming (EE.UU.), Camp Berteaux (Marruecos) y Marnia (Argelia) (Selim et al., 2014; Vekiru et al., 2015).

La montmorillonita tiene la capacidad de absorber ciertos cationes y retenerlos en un estado intercambiable que hace que los cationes intercalados sean intercambiados por otros cationes en una solución de agua. El  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son los cationes intercambiables más comunes, su capacidad de intercambio catiónico es constante. Se pueden clasificar en dos partes principales como sodio MMT ( $\text{Na}^+$  - MMT) y calcio MMT ( $\text{Ca}^{2+}$  - MMT) (Zhou, 2016).

**Zeolita:** las zeolitas son minerales microporosos con una estructura cristalina bien definida. Pertenecen a un grupo de aluminosilicatos naturales. En general, contienen silicio, aluminio y oxígeno en su estructura, y cationes, agua y/u otras moléculas dentro de sus poros. Hay tres propiedades relacionadas con su estructura y composición química: adsorción, intercambio iónico y actividad catalítica. La propiedad de adsorción es la que le permite unirse a las micotoxinas. La adición de aluminosilicato de calcio y sodio hidratado (HSCAS), obtenido a partir de zeolita natural, y utilizado en alimentos contaminados con aflatoxina, ha demostrado tener un efecto protector contra el desarrollo de aflatoxicosis en animales de granja (Ramos y Hernández, 1997).

#### **3.7.4.2. Adsorbentes orgánicos**

Frente a la relativa ineficacia de los aluminosilicatos con respecto a las micotoxinas distintas de las aflatoxinas, se han propuesto adsorbentes orgánicos naturales. Los más utilizados son paredes de levadura, bacterias ácido lácticas, fibras micronizadas y bioadsorbentes y carbón activado. Incluso, la mezcla de adsorbentes orgánicos e inorgánicos

podría hacer que se adapten mejor a los casos más frecuentes de alimentos multicontaminados (Vila-Donat et al., 2018).

Los microorganismos, como las bacterias del suelo o el agua, los hongos y los protozoos y enzimas específicas aisladas de sistemas microbianos, pueden degradar las aflatoxinas con una eficacia variable a productos menos tóxicos. Algunos hongos *Aspergillus* productores de aflatoxinas, tienen la capacidad de degradar sus propias micotoxinas sintetizadas. Las levaduras y las bacterias del ácido láctico funcionan como adsorbentes biológicos que impiden la transferencia de las aflatoxinas al tracto intestinal de humanos y animales (Wu et al., 2009).

Las levaduras y las bacterias ácido lácticas (BAL) funcionan como aglutinantes biológicos que adsorben aflatoxinas e impiden su disponibilidad en el tracto gastrointestinal de personas y animales esto puede ser debido a la capacidad de las BAL de unirse de forma no covalente a compuestos químicos como las AF (Haskard et al., 2001; Aliabadi et al., 2013).

Los polímeros orgánicos también se han usado como aglutinantes de micotoxinas. Estos pueden incluir carbohidratos no digeribles complejos y polímeros sintéticos, como la colestiramina y la polivinilpirrolidona.

El carbón activado es simplemente madera quemada (u otros materiales), excluyendo el oxígeno mediante oxidación controlada y/o el procesado con vapor. Los materiales, a partir de los cuales se puede obtener el carbón activado, incluyen árboles de madera dura o cáscaras de coco. El carbón activado se considera el adsorbente más potente de la medicina y, como tal, funciona fácilmente para adsorber muchas toxinas, venenos y metales pesados presentes en el organismo, convirtiéndolos en inocuos. Kana et al. (2010) y Kana et al. (2011) informaron que el carbón activado sintetizado a partir de semilla de mazorca de maíz, fue

capaz de favorecer el crecimiento de pollos de cebo, alimentados con pienso contaminado con aflatoxina B1.

### **3.8. Legislación sobre aflatoxinas en alimentos y piensos**

Debido a que las aflatoxinas son muy tóxicas por sus efectos inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y carcinógenos, se han establecido contenidos máximos en alimentos y piensos en alrededor de 100 países, para proporcionar un adecuado margen de seguridad para proteger la salud humana (FAO, 2004; Van Egmond et al., 2007).

El Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión Europea, establece límites máximos para la AFB1 y para el total de AF (B1, B2, G1 y G2) en productos alimenticios y en la UE se aplica un nivel máximo de 0,05 µg de AFM1/kg de leche y 0,025 µg/kg para los alimentos infantiles (Tabla 4). En cuanto a la alimentación animal, la UE ha determinado que el límite máximo para piensos destinados a vacas lecheras y terneros, ovejas lecheras y corderos, cabras lecheras y cabritos, lechones y aves de corral jóvenes no supere los 5 µg/kg de AFB1 calculado en función de un contenido de humedad del 12% (Directiva 2002/32/CE y Reglamento (UE) nº 574/2011). Asimismo, establece también que las materias primas para piensos tienen que cumplir con un nivel máximo de 20 µg/kg y los piensos complementarios y completos con 10 µg/kg (Tabla 5).

**Tabla 4.** Contenidos máximos de aflatoxinas en productos alimenticios según el Reglamento (CE) n.º 1881/2006 (versión consolidada).

Productos alimenticios	Contenidos máximos (µg/kg)		
	AFB1	Suma de AFB1, B2, G1 y G2	AFM1
<b>2.1.1.</b> Cacahuets y otras semillas oleaginosas que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios, con la excepción de: — los cacahuets y otras semillas oleaginosas que vayan a molerse para la producción de aceite vegetal refinado	8,0	15,0	-
<b>2.1.2.</b> Almendras, pistachos y huesos de albaricoque que vayan a someterse a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	12,0	15,0	-
<b>2.1.3.</b> Avellanas y nueces del Brasil que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	8,0	15,0	-
<b>2.1.4.</b> Frutos de cáscara arbóreos, salvo los indicados en los puntos 2.1.2. y 2.1.3. que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	-
<b>2.1.5.</b> Cacahuets y otras semillas oleaginosas y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes en los productos alimenticios, con la excepción de: — aceites vegetales crudos destinados a ser refinados — aceites vegetales refinados	2,0	4,0	-
<b>2.1.6.</b> Almendras, pistachos y huesos de albaricoque destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	8,0	10,0	-
<b>2.1.7.</b> Avellanas y nueces del Brasil destinadas al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	-
<b>2.1.8.</b> Frutos de cáscara arbóreos, distintos de los indicados en los puntos 2.1.6. y 2.1.7. y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	2,0	4,0	-
<b>2.1.9.</b> Frutas desecadas, distintas de los higos secos, destinadas a ser sometidas a un proceso de selección u otro tratamiento físico, antes del consumo humano o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	-
<b>2.1.10.</b> Frutas desecadas, distintas de los higos secos, y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes en los productos alimenticios	2,0	4,0	-
<b>2.1.11.</b> Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos de cereales transformados, salvo los productos alimenticios indicados en los puntos 2.1.12, 2.1.15 y 2.1.17.	2,0	4,0	-
<b>2.1.12.</b> Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5,0	10,0	-
<b>2.1.13.</b> Leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos	-	-	0,050

(continúa)

Productos alimenticios	Contenidos máximos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	AFB1	Suma de AFB1, B2, G1 y G2	AFM1
<b>2.1.14.</b> Los siguientes tipos de especias: <i>Capsicum</i> spp, (frutas pasas de dicho género, enteras o molidas, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón) <i>Piper</i> spp, (frutos de dicho género, con inclusión de la pimienta blanca y negra) <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada) <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma) Mezclas de especias que contengan una o varias de estas especias	5,0	10,0	-
<b>2.1.15.</b> Alimentos a base de cereales transformados y alimentos para lactantes y niños de corta edad	0,10	-	-
<b>2.1.16.</b> Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	-	-	0,025
<b>2.1.17.</b> Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0,10	-	0,025
<b>2.1.18.</b> Higos secos	6,0	10,0	-

**Fuente:** Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (DO L 364 de 20/12/2006, p. 5).

**Tabla 5.** Contenidos máximos de aflatoxina B1 en productos destinados a la alimentación animal.

Micotoxina	Productos destinados a la alimentación animal	Contenido máximo en mg/kg (ppm) en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12%
<b>1. Aflatoxina B1</b>	Materias primas para piensos	0,02
	Piensos complementarios y completos	0,01
	excepto:	
	— piensos compuestos para vacas lecheras y terneros, ovejas lecheras y corderos, cabras lecheras y cabritos, lechones y aves de corral jóvenes	0,005
	— piensos compuestos para bovinos (excepto vacas lecheras y terneros), ovinos (excepto ovejas lecheras y corderos), caprinos (excepto cabras lecheras y cabritos), porcinos (excepto lechones) y aves de corral (excepto animales jóvenes).	0,02

**Fuente:** Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 7 de mayo de 2002 sobre sustancias indeseables en la alimentación animal (DO L 140 de 30/05/2002, p. 10).

En EEUU, la Food and Drug Administration (FDA) establece que la concentración máxima permitida de AFM1 en leche entera, semidesnatada y desnatada es de 0,5 µg/kg (FDA, 2005). Esta norma ha sido también adoptada por algunos países de América Latina. De modo que el nivel de contaminación máximo permitido en EE.UU. y otros países del continente americano es 10 veces superior al permitido por la UE. En lo referente a los alimentos para animales, la FDA establece un contenido máximo de aflatoxina B1 de 20 µg/kg (FDA, 2005).

Actualmente, las regulaciones de micotoxinas se refieren principalmente a las AF y el número de países, con este tipo de normas, se han incrementado significativamente en los últimos años. La regulación para las AF es, a menudo, detallada y específica para varios productos alimenticios, productos lácteos y alimentos para animales (Tabla 6).

**Tabla 6.** Media y rango de niveles máximos tolerables (µg/kg) para las aflatoxinas y número de países en los cuales está regulado.

<b>Toxinas</b>	<b>Media</b>	<b>Rango</b>	<b>Países</b>
AFB1 en productos alimenticios	5	1 - 20	61
AFB1+B2+G1+G2 en productos alimenticios	10	0-35	76
AFM1 en leche	0,05	0,05-15	60
AFB1 en alimentos para animales	5	5 - 50	39
AFB1+B2+G1+G2 en alimentos para animales	20	0-50	21

**Fuente:** FAO (2004).

### **3.9. Métodos de análisis de aflatoxinas**

Las aflatoxinas pueden estar distribuidas de forma muy heterogénea dentro de un lote de productos, en particular en productos con un tamaño de partícula grande, como higos secos, pistachos o cacahuetes. Por lo tanto, el muestreo y el análisis desempeñan un papel crucial en la determinación de aflatoxinas en los productos alimenticios. Como consecuencia, en la Unión Europea se han establecido métodos armonizados de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de aflatoxinas y otras micotoxinas en los productos alimenticios, en el Reglamento (CE) nº 401/2006.

Debido a los límites bajos permisibles para las aflatoxinas en piensos y alimentos, y la alta toxicidad asociada, los métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas deben ser sensibles, específicos y capaces de cuantificar a nivel de trazas. Los sectores académicos, industriales y las autoridades de control están en constante búsqueda de métodos rápidos y fiables para la detección y cuantificación de aflatoxinas, con el objetivo de lograr la seguridad y protección de los alimentos para las personas y animales y prevenir las pérdidas comerciales asociadas.

Existen diversos métodos de análisis recomendados para la determinación de aflatoxinas en alimentos. La precisión y la sensibilidad de estos métodos, se han convertido en requisitos importantes para cumplir con las exigencias de inocuidad alimentaria y las estrictas regulaciones legislativas (Shephard, 2008). En este sentido, es importante destacar que para la detección y cuantificación de aflatoxinas existen métodos de referencia estandarizados y validados por organismos reconocidos internacionalmente como la Organización Internacional de Normalización (ISO), cuyos métodos están aprobados por el Comité Europeo de Normalización (CEN). En la Tabla 7, se listan los métodos de análisis de aflatoxinas aprobados por la ISO.

**Tabla 7.** Métodos vigentes de análisis de aflatoxinas adoptados por la Organización Internacional de Normalización.

<b>Norma</b>	<b>Título</b>
UNE-EN ISO 14501:2008	Leche y leche en polvo. Determinación del contenido de aflatoxina M1. Purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad y determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución.
UNE-EN ISO 14675:2003	Leche y productos lácteos. Guía para la descripción normalizada de inmunoanálisis enzimáticos competitivos. Determinación del contenido de aflatoxina M1.
UNE-EN ISO 16050:2011	Productos alimenticios. Determinación de aflatoxina B1, y contenido total de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución.
UNE-EN ISO 17375:2007	Alimentos para animales. Determinación de aflatoxina B1.
UNE-EN 14123:2008	Productos alimenticios. Determinación de aflatoxina B1 y de la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en avellanas, cacahuetes, pistachos, higos y pimentón molido. Método por cromatografía líquida de alta resolución con transformación química postcolumna y purificación en columna de inmunoafinidad.
UNE-EN 15851:2010	Productos alimenticios. Determinación de aflatoxina B1 en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método por HPLC con purificación en columna de inmunoafinidad y detección por fluorescencia.

Para la determinación de aflatoxinas en piensos y alimentos, se han utilizado ampliamente durante décadas los métodos analíticos convencionales, como la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida (LC), demostrando una alta sensibilidad para la determinación de aflatoxinas (EFSA, 2007).

La TLC fue uno de los métodos pioneros, pero a menudo, se utilizó como un método cualitativo de detección de aflatoxinas, debido a que ha presentado problemas para cuantificar (Yao et al., 2006). Sin embargo, los métodos de cromatografía líquida como *high performance liquid chromatography* (HPLC) acoplada a detectores apropiados se consideran

idóneos para la cuantificación y confirmación de aflatoxinas en todo tipo de muestras (Dragacci y Grosso, 2001; Pascale, 2009).

Desde mediados de la década de 1970, se han desarrollado métodos inmunoquímicos basados en anticuerpos altamente específicos contra las aflatoxinas, como los muchos tipos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), en formato de pocillos o de tiras de flujo lateral (Yao et al., 2006). Estos métodos inmunoquímicos son fáciles de realizar y permiten obtener resultados muy rápidos, aunque siempre precisan de un método instrumental para confirmar los resultados. Otras opciones emergentes son los inmunosensores, que ofrecen una alternativa rentable a los inmunoensayos clásicos (Krska et al., 2008). Se ha desarrollado un conjunto de biosensores tanto para el análisis de aflatoxinas, como de los niveles de expresión de los genes más importantes implicados en su biosíntesis (Schmidt-Heydt et al., 2009).

El método analítico más exitoso utilizado para aflatoxinas en alimentos que cumple con los criterios de rendimiento requeridos, se basa en la purificación mediante columna de inmunoafinidad seguida de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con derivatización post- columna y detección de fluorescencia (EFSA, 2007). Debido a la limpieza y concentración altamente selectivas de las aflatoxinas por cromatografía de inmunoafinidad en combinación con la derivatización post-columna y la detección de fluorescencia, se pueden lograr bajos límites de detección aplicando este método, tanto para aflatoxina B1 en piensos y alimentos, como aflatoxina M1 en leche. Cuando hay consecuencias legales, la combinación de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS) se convertirá en el método de elección para la confirmación de aflatoxinas (Rodríguez-Carrasco et al., 2018).

La mayoría de métodos analíticos para la detección y cuantificación de aflatoxinas en piensos y alimentos, constan de varias etapas: toma de muestras, homogenización de cada muestra antes de tomar la porción para el análisis, extracción de las aflatoxinas, purificación para eliminar restos de matriz que puedan interferir en el análisis, e identificación y cuantificación de los analitos mediante técnicas instrumentales.

La distribución de las aflatoxinas, en la mayoría de casos, no es homogénea en los productos afectados, ya que deriva del crecimiento del hongo en zonas localizadas (Whitaker, 2006). Por tanto, el muestreo y la preparación de la muestra se consideran una fuente importante de error, que contribuye a la variabilidad total en cualquier método analítico. Por lo tanto, para obtener resultados analíticos válidos, se deben seguir métodos de muestreo adecuados. El Reglamento (CE) nº 401/2006 establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

En el caso de aflatoxinas, dicho Reglamento establece los métodos de muestreo en los siguientes productos alimenticios:

- cereales y productos a base de cereales
- frutos secos, incluidas las uvas pasas y los productos derivados
- higos secos, cacahuets y frutos de cáscara
- especias
- leche y los productos lácteos; preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación
- alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad
- aceites vegetales

Dicho Reglamento (CE) nº 401/2006 describe el personal, el material objeto de muestreo, las precauciones, las muestras elementales, la preparación de la muestra global, las muestras idénticas, y el acondicionamiento, envío, precintado y etiquetado de las muestras.

Para la etapa de extracción de las aflatoxinas se utilizan solventes o mezclas de solventes relativamente polares como metanol, acetonitrilo y acetato de etilo. En el caso de productos grasos, como las oleaginosas, es preciso desgrasar la muestra con disolventes apolares tipo hexano.

Después de la extracción con disolventes debe llevarse a cabo el proceso de purificación (clean up) para eliminar sustancias interferentes; este paso es bastante importante ya que la pureza del extracto de la muestra afecta a la calidad de los cromatogramas, así como a la sensibilidad del método analítico. La purificación de aflatoxinas se realiza mediante fases sólidas, que pueden ser convencionales (adsorbentes) o dispersivas (Quechers), inmunoafinidad (con anticuerpos específicos) u otras técnicas basadas en polímeros (MIPs, Molecularly Imprinted Polymers). A fecha de hoy, la purificación por inmunoafinidad se considera el método de elección.

A pesar del desarrollo rápido de métodos analíticos e instrumentación sofisticada, la clave básica para el rendimiento de los laboratorios en el análisis de aflatoxinas radica en garantizar la calidad de los resultados, en términos de especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión de los resultados analíticos (Shephard, 2008). El propio Reglamento (CE) nº 401/2006 establece los métodos de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Se recomienda la utilización de métodos de confirmación plenamente validados (es decir, validados por ensayos interlaboratorio para las matrices correspondientes). También pueden utilizarse otros métodos de confirmación

validados adecuados (como métodos validados internamente con las matrices correspondientes), siempre que cumplan los criterios de funcionamiento establecidos en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Criterios de funcionamiento para las aflatoxinas.

Criterio	Intervalo de concentración	Valor recomendado	Valor máximo autorizado
Blancos	Todos	Desdeñable	—
Recuperación Aflatoxina M1	0,01-0,05 µg/kg	de 60 a 120 %	
	> 0,05 µg/kg	de 70 a 110 %	
Recuperación Aflatoxinas B1 , B2 , G1 , G2	< 1,0 µg/kg	de 50 a 120 %	
	1-10 µg/kg	de 70 a 110 %	
	> 10 µg/kg	de 80 a 110 %	
Reproducibilidad (RSD <sub>R</sub> )	Todos	Derivada de la ecuación de Horwitz*	Dos veces el valor derivado de la ecuación de Horwitz
La precisión puede calcularse como 0,66 veces la reproducibilidad RSD <sub>R</sub> a la concentración que interese			

\* Los valores de precisión se calculan a partir de la ecuación de Horwitz: la original para concentraciones  $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$  (\*) y la modificada para concentraciones  $C < (1,2 \times 10^{-7})$  (\*\*).

(\*) Ecuación de Horwitz para concentraciones  $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$ :

$$RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$$

(ref.: W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1980, 63, 1344)

(\*\*) Ecuación de Horwitz modificada para concentraciones  $C < 1,2 \times 10^{-7}$ :

$$RSD_R = 22 \%$$

(ref.: M. Thompson, Analyst, 2000, 125, pp. 385-386)

donde:

—  $RSD_R$  es la desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad  $[(sR) \times 100]$ ;

—  $C$  es el cociente de concentración (a saber,  $1 = 100 \text{ g}/100 \text{ g}$ ,  $0,001 = 1000 \text{ mg}/\text{kg}$ ).



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

✓ Materiales estándar de laboratorio:

○ Material de vidrio: viales de color ámbar de 4 mL, embudos, vasos de precipitados, matraces Erlenmeyer, matraces aforados, probetas.

○ Material de plástico: tubos Falcon de 50 mL, puntas de micropipetas, pipetas Pasteur, contenedores de toma de muestras de 250 y 500 mL (duquesas) con tapa y obturador, jeringas desechables de 10 mL y 50 mL.

○ Papel de filtro Whatman N<sup>o</sup> 1 y N<sup>o</sup> 4 de 125 mm de diámetro (Symta, Madrid, España).

○ Papel de filtro de microfibras de vidrio Whatman GF/A de 1,6 µm (Symta).

○ Tijeras, pinzas, cucharas, espátulas.

○ Micropipetas de volumen variable 10-100 µL y 100-1000 µL (BIOHIT Proline Pipette, Helsinki, Finlandia), de 0,5-10 µL y 100-1000 µL (LabMate Soft, Varsovia, Polonia).

✓ Micropipetas de volumen variable Finnpipette (10-100 µL, 100-100 µL y 1 mL a 10 mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

✓ Material para análisis microbiológico:

○ Asas y pinchos de siembras metálicos y de plásticos desechables.

○ Asas de Drigalski de plástico desechables.

○ Crioviales Vibakstore (Nirco Diagnostico y Investigación, S.L., Madrid, España).

○ Gradillas de tubos.

○ Placas de Petri de 9 mm de diámetro desechables.

○ Portaobjetos y cubreobjetos.

○ Puntas de micropipetas estériles.

○ Tubos de 10 mL de rosca estéril (16 mm x 100 mm).

- Pipeteador manual.
- ✓ Microjeringa de vidrio de 250  $\mu$ L SGE para HPLC (Symta).
- ✓ Gasas de algodón hidrófilo estéril en compresas. 400  $\text{cm}^2$ , 20 hilos/ $\text{cm}^2$ , 8 capas (Acofarma, Madrid, España).

#### 4.2 Equipos e instrumentos de trabajo

- ✓ Balanza analítica monoplato Sartorius CP 224 S con 0,0001 g de precisión (Sartorius, Goettingen, Alemania).
- ✓ Baño de ultrasonidos Branson 3510 (Fisher Scientific, Barcelona, España).
- ✓ Bomba de vacío XX5522050 Millipore de 0 a 100 kPa (Millipore, Danvers, MA, EEUU).
- ✓ Cámara de refrigeración (Frigoríficos Catalán, Zaragoza, España).
- ✓ pH metro Crison GLP 21 (Crison Instruments S.A, Barcelona, España).
- ✓ Agitador Vortex Reax 2000 (Heidolph, Schwabach, Alemania)
- ✓ Autoclave (P-Selecta, Barcelona, España).
- ✓ Concentrador de muestras con placa calefactora para evaporación por corriente de  $\text{N}_2$  (Biocote, Coventry, Reino Unido).
- ✓ Congelador Templow -20  $^{\circ}\text{C}$  (P-Selecta).
- ✓ Molino de laboratorio K-6 Platino (Ascaso Factory, Barcelona, España).
- ✓ Campana de extracción de gases.
- ✓ Cabina de siembra de flujo laminar BIO-II-A (Telstar, Barcelona, España).
- ✓ Cámara de contaje de Neubauer 0,0025  $\text{mm}^2$ , 0,100 mm profundidad (Laboroptik Ltd., Lancing, Reino Unido).
- ✓ Analizador electrónico de humedad de Kern DBS (Kern y Sohn GmbH, Balingen, Alemania).

- ✓ Rota-Tubos MS2 Minishaker IKA (IKA, Staufen, Alemania).
- ✓ Sistema de filtración a vacío compuesto por bomba de vacío, matraz Erlenmeyer de 1 L, portafiltros con pinza, matraz kitasato de 1 L (Áfora, Barcelona, España).
- ✓ Centrifuga Rotofix 32 (Hettich, Guipúzcoa, España).
- ✓ Baño térmico Water Bath SWB (Stuart Scientific, Staffordshire, Reino Unido).
- ✓ Extractor de leche Vicam, Two Position Pump Stand w/Air Pump (Vicam).
- ✓ Estufa de desecación Conterm de 80 L (P-Selecta).
- ✓ Estufa de incubación a 25 °C (Heraeus, Hanau, Alemania).
- ✓ Microscopio óptico EC3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).
- ✓ Hornillo para calentamiento/disolución de medios de cultivos (P- Selecta).
- ✓ Mechero Bunsen con llave BUNS-B-01-001 (Labbox, Barcelona, España).
- ✓ Cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent HP 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con:
  - Columna cromatográfica de fase inversa octadecil RP C<sub>18</sub> de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, ACE 5 C<sub>18</sub> (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Escocia).
  - Precolumna de fase inversa RP C<sub>18</sub> pK5 (Symta).
  - Inyector manual.
  - Módulo de bombeo binario para la fase móvil.
    - Fase móvil aflatoxina B1: agua/acetonitrilo/metanol (50:40:10, v/v)
    - Fase móvil aflatoxina M1: agua/acetonitrilo (75:25, v/v)

- Detector de fluorescencia (FLD).
- Detector ultravioleta de red de diodos (DAD).
- Detector de derivatización fotoquímica PHRED (LCTech UVE, Dorfen, Alemania).
- Unidad de control del equipo y tratamiento de datos con el software OpenLAB CDS 2013 (Agilent). Los equipos utilizados en los ensayos de esta tesis doctoral están sometidos a controles de calidad periódicos llevados a cabo por sus respectivos servicios de mantenimiento.

#### 4.3. Reactivos, medios de cultivo y productos de referencia

- ✓ Metanol (CH<sub>3</sub>OH) grado HPLC (Fisher Scientific, Madrid, España).
- ✓ Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) grado HPLC (Fisher Scientific).
- ✓ Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) grado HPLC (Fisher Scientific)
- ✓ Agua desionizada calidad mili-Q. Resistividad 18,2 mΩ/cm (Millipore).
- ✓ Solución patrón mix de aflatoxinas de 1 µg/mL para B1 y G1 y de 0,3 µg/mL de aflatoxinas para B2 y G2 en metanol (99,5% de pureza) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania), mantenida en congelación a -20°C.
- ✓ Soluciones de calibración de aflatoxinas: a partir de la solución patrón se prepara una solución intermedia de AFB1 en metanol (100 µg/L) y de ésta las soluciones de calibración 0,25; 0,5; 1; 2,5 y 5 µg/L, en viales ámbar.
- ✓ Solución patrón de aflatoxina M1 con concentración de 500 µg/L en metanol (Sigma Aldrich), mantenida en congelación a -20°C.
- ✓ Soluciones de calibración de aflatoxina M1: a partir de la solución patrón se prepara una solución intermedia de AFM1 en acetonitrilo (5 µg/L) y de ésta las soluciones de calibración 50; 75; 100; 200 y 300 pg/mL. Estas soluciones se evaporaron a sequedad por

corriente de N<sub>2</sub> a 50 °C y fueron reconstituidos en la fase móvil agua/acetonitrilo (75:25), en viales ámbar.

- ✓ Material certificado de referencia ERM-BD284: leche con nivel alto de aflatoxina M1 (0,44 µg/kg) (Sigma Aldrich)
- ✓ Material certificado de referencia ERM-BD283: leche con nivel bajo de aflatoxina M1 (0,11 µg/kg) (Sigma Aldrich)
- ✓ Columnas de inmunoafinidad (IAC) AflaTest WB SR y AflaM1 (Vicam, Milford, MA, EE.UU.) para la purificación de aflatoxinas en piensos y leche.
- ✓ Columnas de purificación Mycosep 224 AflaZon Multifunctional columns (Romer Labs Inc., Newark, DE, EE.UU.) para la purificación de aflatoxinas en el estudio in vitro.
- ✓ Disolvente de extracción para columnas IAC: metanol/agua, 80:20 (v/v).
- ✓ Disolventes de elución para AFB1 por IAC: 1 mL de metanol (una o dos gotas cada segundo), seguido de 1 mL de agua milli-Q.
- ✓ Disolventes de elución para AFM1 por IAC: 1,25 mL de metanol/acetonitrilo (2:3, v/v) (una o dos gotas cada segundo), seguido de 1,25 mL de agua milli-Q.
- ✓ Disolvente de extracción para columnas Mycosep: acetonitrilo/agua (84:16, v/v).
- ✓ Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma Aldrich).
- ✓ Sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania).
- ✓ Gas Nitrógeno N<sub>2</sub> C55 (Carbueros Metálicos, Zaragoza, España).
- ✓ Ácidos fenólicos calidad HPLC (Sigma- Aldrich): ferúlico (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>) pureza ≥ 99%, cafeico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) pureza ≥ 98%, p-cumárico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) pureza ≥ 98% y clorogénico (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>) pureza ≥ 95%, mantenidos en congelación a -20°C.
- ✓ Soluciones individuales de trabajo de ácidos fenólicos: se prepararon soluciones madre en etanol/agua (50:50, v/v) a 400 mM (Norma UNE 84769:2016), pesando 3,883 g

(ferúlico), 3,603 g (cafeico), 3,283 g (p-cumárico) y 7,086 g (clorogénico) y añadiendo 50 mL de etanol/agua (50:50, v/v), calentando ligeramente para facilitar la disolución.

- ✓ Caldo Sabouraud-dextrosa al 2% (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino unido).
- ✓ Caldo extracto de levadura (2%) y sacarosa (15%) (YES) con pH ajustado a 5,5 mediante solución estéril de ácido clorhídrico 1N
- ✓ Agar Patata Dextrosa (PDA) (Oxoid Ltd.).
- ✓ Tween 80 (C<sub>64</sub>H<sub>124</sub>O<sub>26</sub>) polisorbato 80 (Merck) al 0,05% en agua para suspensión de esporas, esterilizar y mantener refrigerado a 4°C.
- ✓ Bacto™ Peptone (BD Biosciences, Madrid, España) al 0,1% en agua para suspensión de esporas, esterilizar y mantener refrigerado a 4°C.
- ✓ Glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) (Panreac, Barcelona, España).
- ✓ Cepas fúngicas de referencia (Colección Española de Cultivos Tipo):  
*Aspergillus parasiticus* (CECT 2682; NRRL 3145) productor de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, utilizada para el estudio *in vitro* de los ácidos fenólicos en caldo YES.  
*Aspergillus flavus* (CECT 2687) productor de aflatoxinas B1 y B2, utilizada para el estudio *in vitro* del ácido ferúlico en grano de maíz.
- ✓ Adsorbentes: bentonita (Sigma-Aldrich), arcilla sepiolítica E-563 (MYTA, Zaragoza, España), zeolita-clinoptilolita 1g568 (OMYA, Zúrich, Suiza), secuestrante orgánico natural (AVITASA, Tarragona, España).

#### 4.4. Puesta a punto y optimización de los métodos analíticos

Uno de los objetivos de este estudio, ha sido la puesta a punto y optimización de los métodos analíticos para la extracción, purificación y determinación de aflatoxinas en distintas matrices.

El método desarrollado para **productos destinados a la alimentación animal** (pienso completo, ración unifeed, maíz grano, harina de maíz y ensilado de maíz), se basa en las normas UNE-EN ISO 17375:2007 y UNE-EN ISO 16050:2011 (véase Tabla 7). Ambas normas son muy similares, cuyos métodos tienen como principio extraer una porción de la muestra con una mezcla de disolventes. El extracto de la muestra se filtra y se diluye con agua. La porción para análisis se añade a una columna de inmunoafinidad (IAC) con anticuerpos específicos para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Las aflatoxinas se eluyen de la IAC con metanol puro, recogándose el eluido. La cantidad de aflatoxinas presentes en el eluido se cuantifica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa, con detección por fluorescencia y transformación química post-columna. Este método de análisis de aflatoxinas se designa como **MÉTODO #1**.

El método desarrollado para **leche cruda de vaca**, se basa en la norma UNE-EN ISO 14501:2008. El principio de este método es extraer la aflatoxina M1 haciendo pasar la muestra de leche, previamente tratada, a través de una columna de inmunoafinidad (IAC), que contiene anticuerpos específicos para la aflatoxina M1. A continuación la aflatoxina M1 se eluye de la columna, recogándose el eluido. La cantidad de aflatoxina M1 presente en el eluido se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorimétrica. Este método de análisis de aflatoxinas se designa como **MÉTODO #2**.

El método desarrollado para **caldo YES** (estudios in vitro), ha sido desarrollado específicamente para esta tesis doctoral. Dicho método se basa en extraer una alícuota de muestra con una mezcla de disolventes. El extracto de la muestra se filtra y se purifica mediante columnas multifuncionales Mycosep, de acuerdo con el método AOAC 994:08 (AOAC, 2016). La cantidad de aflatoxinas presentes en el eluido se cuantifica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa, con detección por

fluorescencia y transformación química post-columna. Este método de análisis de aflatoxinas se designa como **MÉTODO #3**.

La detección de las aflatoxinas se realizó en todos los casos con el detector de fluorescencia (FLD), dado que son analitos con una buena señal fluorimétrica. No obstante, en el caso de las aflatoxina B1 y G1, fue preciso realizar, de acuerdo con la norma, una derivatización postcolumna. En nuestro trabajo hemos realizado una derivatización fotoquímica con el detector PHRED a 254 nm, que incrementa la respuesta fluorimétrica de ambas aflatoxinas unas 30 veces.

#### **4.5. Validación de los métodos analíticos**

Tras la puesta a punto y optimización, fue necesario validar nuestros métodos analíticos para garantizar una mayor calidad en los resultados. Además, es necesario que el método de análisis esté debidamente optimizado y validado como paso previo para proponer el método analítico en un estudio interlaboratorial.

Según la Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 (2002/657/CE), por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados, la validación, es la confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas del cumplimiento de los requisitos particulares de un uso específico previsto.

Los estudios de validación realizados en el presente estudio se han realizado siguiendo como referencia el Reglamento (CE) nº401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Los parámetros estudiados fueron especificidad, linealidad (rango dinámico y lineal), sensibilidad (límites de detección - LOD y de cuantificación - LOQ),

exactitud (recuperación) y precisión (precisión de la inyección, repetibilidad y reproducibilidad).

#### **4.5.1. Especificidad**

La especificidad es la capacidad de un método para distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias interferentes (Decisión 2002/567/CE). Para evaluar este parámetro, se analizaron:

- Disolventes de inyección.
- Blancos analíticos (sin muestra).
- Muestras blanco (sin aflatoxinas) de raciones alimenticias, leche y caldo YES.
- Soluciones patrón de 5 µg/L de AFB1 y de 50 ng/L de AFM1
- Muestras de maíz y leche enriquecidas (suplementadas) con aflatoxinas
- Materiales de referencia certificados (leche y maíz)

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de comprobar que no existen solapamientos de picos cromatográficos y que éstos están formados por un único componente, lo que permite una cuantificación correcta.

El blanco analítico sirve para evaluar la magnitud de la señal medida, atribuida a los reactivos empleados y a todo el sistema en su conjunto. Se realiza todo el procedimiento analítico, extracción, purificación y determinación cromatográfica, pero se omite la muestra y se verifica que no hay ningún componente que coincida con el tiempo de retención de los analitos de interés (AFB1 y AFM1).

Las muestras enriquecidas con aflatoxinas nos permiten confirmar la señal cromatográfica de los analitos (AFB1 y AFM1), y nos permiten realizar estudios de exactitud (porcentajes de recuperación). Además, nos sirven también para estudiar el efecto matriz,

comparando la señal producida por una muestra enriquecida con la de una solución patrón. Se comprobó que no existía efecto matriz para ninguna de las aflatoxinas en las matrices estudiadas.

El material de referencia certificado, son controles que se utilizan para comprobar la validez tanto de los métodos como de los resultados analíticos, ya que este material nos ofrece un valor de referencia para la calibración de los métodos analíticos.

### ***4.5.2. Linealidad y calibración***

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta en el detector. El rango lineal de un detector cromatográfico es el intervalo de concentración de una sustancia en la fase móvil, dentro del cual la sensibilidad del detector es constante, con una variación determinada, normalmente  $\pm 5$  por ciento. Se suele representar por el gráfico de linealidad, en el que se representa la sensibilidad del detector frente a la cantidad inyectada.

El rango dinámico de un detector es el intervalo de concentración de una sustancia, dentro del cual un incremento en la concentración, produce un incremento en la señal del detector. Una vez determinado el rango dinámico y lineal, se preparan las rectas de calibración a partir de las concentraciones obtenidas en el rango lineal. Por definición, el rango dinámico es mayor que el lineal (SECyTA, 2014).

La calibración viene representada a través de una recta de regresión, que se utiliza para calcular por interpolación las concentraciones de aflatoxinas en las distintas muestras. Al no existir efecto matriz relevante en el análisis de las muestras, la calibración se realizó por el método del patrón externo. Las concentraciones elegidas para la recta de calibrado de AFB1 fueron de 0,25 a 10  $\mu\text{g/L}$ , mientras que para AFM1 oscilaron de 25 a 200  $\text{ng/L}$  (Tabla

9). Estas concentraciones de calibrado, reflejan las cantidades de aflatoxinas concebiblemente presentes en las muestras. Para evaluar la linealidad se calculó el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 10 rectas de calibración obtenidas para cada compuesto.

**Tabla 9.** Concentraciones de las soluciones de AFB1 y AFM1 para determinar las rectas de calibración.

AFB1 $\mu\text{g/L}$	AFM1 ng/L
0,25	25
0,5	50
1	75
2,5	100
5	150
10	200

#### 4.5.3. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico, se evalúa por medio de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), que se expresan en unidades de concentración del analito.

##### A) Límite de detección (LOD):

El límite de detección, expresado como concentración del analito, proviene de la señal más pequeña que puede detectarse con razonable certeza en un determinado procedimiento analítico. Según esto, se trata de la cantidad asociada a la mínima señal que pueda atribuirse al analito, es decir, que sea distinguible de la señal del blanco analítico. El LOD se suele definir

como la concentración del analito que producirá un cociente de la señal/ruido (S/R) de 3 (IUPAC, 1995). Así, el límite de detección considera la amplitud de la señal y el ruido de la línea de fondo de un blanco analítico.

**B) Límite de Cuantificación(LOQ).**

El límite de cuantificación, es la concentración mínima de analito que puede cuantificarse con una certeza estadística razonable, con una adecuada precisión y exactitud. El LOQ se define como la concentración del analito que producirá un cociente de la señal/ruido (S/R) de 10 (IUPAC, 1995). Así, el  $LOQ = LOD \times 3,3$ .

**4.5.4. Exactitud (Recuperación)**

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado (Decisión de la Comisión 2002/657/CE). Generalmente se calcula como el porcentaje de analito recuperado, evaluado estadísticamente. Lo ideal es evaluar la exactitud con material de referencia certificado, aunque de no estar disponible, se pueden preparar muestras enriquecidas con el analito de interés.

En el caso de las muestras de piensos, al no disponer de material de referencia certificado, se llevó a cabo un estudio de recuperación enriqueciendo muestras blanco de pienso a tres niveles de concentración de AFB1 (2,5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Dichas concentraciones suponen 0,5, 1 y 2 veces el contenido máximo establecidos en 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por la Directiva 2002/32/CE.

Para el caso de la leche, la recuperación de AFM1 se realizó con material de referencia certificado (ERMBD284 leche entera en polvo con  $0,44 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{kg}$  aflatoxina M1), así como utilizando muestras blanco de leche enriquecidas a tres niveles de concentración (25, 50 y 100  $\text{ng}/\text{L}$ ). El intervalo de la concentración se seleccionó con la finalidad de determinar

niveles de AFM1 en valores equivalentes a 0,5, 1 y 2 veces el valor del límite máximo establecido en 50 ng/L por la legislación (Reglamento (CE) nº 1881/2006).

Para el caldo YES de los estudios in vitro, el estudio de recuperación se llevó a cabo enriqueciendo muestras blanco de caldo YES con una concentración de AFB1 de 10 µg/L

Para todos los ensayos, el enriquecimiento de las muestras se realizó por sextuplicado antes de la etapa de extracción, para determinar el porcentaje de recuperación global del método (Tabla 10).

**Tabla 10.** Niveles de enriquecimiento de AFB1 y AFM1 en las matrices pienso, leche cruda de vaca y caldo YES.

<b>Matrices</b>	<b>Concentración</b>
<b>Pienso</b>	Aflatoxina B1: 2,5 - 5 - 10 µg/L
<b>Leche cruda de vaca</b>	Aflatoxina M1: 25 - 50 - 100 ng/L
<b>Caldo YES</b>	Aflatoxina B1: 10 µg/L

Los resultados obtenidos de cada muestra se extrapolaron con la recta de calibrado de los patrones y se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Recuperacion} = \frac{\text{Contenido medido}}{\text{Nivel de enriquecimiento}} * 100$$

El porcentaje de recuperación se comparó con los valores recomendados (Tabla 8).

#### 4.5.5. Precisión, repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes, obtenidos de una serie de medidas repetidas del mismo analito, realizadas en condiciones estipuladas (Giménez, 2012). La precisión suele expresarse como desviación estándar relativa (RSD%) de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es el valor RSD, menor es la precisión del método (Decisión de la Comisión 2002/657/CE). La precisión de un método puede variar según el laboratorio, los reactivos utilizados, el analista, el equipo instrumental o el día en que se realizaron los ensayos.

Para determinar la precisión de la inyección manual, se inyectaron patrones de 5 µg/L (AFB1) y 50 ng/L (AFM1), diez veces consecutivas el mismo día, y se calcularon las desviaciones estándar relativas de los tiempos de retención y de las áreas cromatográficas correspondientes a cada aflatoxina.

Para determinar la repetibilidad ( $RSD_r\%$ ), se analizaron en el mismo día seis muestras individuales de una misma muestra homogénea de pienso, leche y caldo YES, todas ellas enriquecidas a las concentraciones de aflatoxinas que figuran en la Tabla 10. Las muestras eran idénticas, analizadas por el mismo operador y con el mismo equipo. Se calculó el RSD (%) de las áreas de los picos. La repetibilidad se expresa mediante la desviación estándar relativa según la fórmula:

$$RSD_r = \left( \frac{DS}{\bar{x}} \right) * 100 \rightarrow \text{para } n = 6$$

Para determinar la reproducibilidad ( $RSD_R\%$ ), se analizaron en dos días distintos, seis muestras individuales de una misma muestra homogénea de cada una de las matrices, enriquecidas a las concentraciones de aflatoxinas que figuran en la Tabla 10. Las muestras

eran idénticas, analizadas por el mismo operador y con el mismo equipo, pero en días diferentes. Se calculó el RSD (%) del tiempo de retención y del área de los picos. La reproducibilidad se expresa mediante la desviación estándar relativa según la fórmula:

$$RSD_R = \left( \frac{DS}{\bar{x}} \right) * 100 \rightarrow \text{para } n = 6 (3 + 3)$$

La reproducibilidad  $RSD_R$  se comparó con los valores recomendados (Tabla 8).

#### **4.5.6. Participación en estudios interlaboratorios**

Para obtener una validación externa de nuestros métodos de análisis se participó en el ensayo de intercomparación Romer Labs Check Sample Survey. En este estudio participaron 396 laboratorios de 45 países diferentes. La Decisión 2002/657/CE define los estudios de intercomparación como la organización, realización y evaluación de ensayos de una misma muestra por dos o más laboratorios según condiciones preestablecidas, para determinar el funcionamiento de los ensayos. De igual manera la norma ISO 5725-2 (1994), indica que los laboratorios deben participar en estudios colaborativos para verificar la reproducibilidad de sus métodos. Los ejercicios de intercomparación son unas herramientas de control de calidad para los laboratorios y permite comparar sus resultados y determinar la eficacia de los métodos de análisis.

El ejercicio de intercomparación consistió en el análisis de aflatoxinas totales en una muestra de maíz de concentración desconocida, que se analizó por el método cromatográfico instrumental (HPLC-PHRED-FLD), validado en esta tesis doctoral (MÉTODO #1).

La muestra problema fue recibida en el laboratorio y, posteriormente, fue analizada por duplicado por el método de análisis y determinación de aflatoxinas en productos destinados a la alimentación animal, que es el utilizado en esta tesis doctoral. Los resultados se evaluaron en términos de Z o Z-score, según el siguiente criterio (Visser, 2006):

Si  $|Z| \leq 2$  = El resultado es satisfactorio

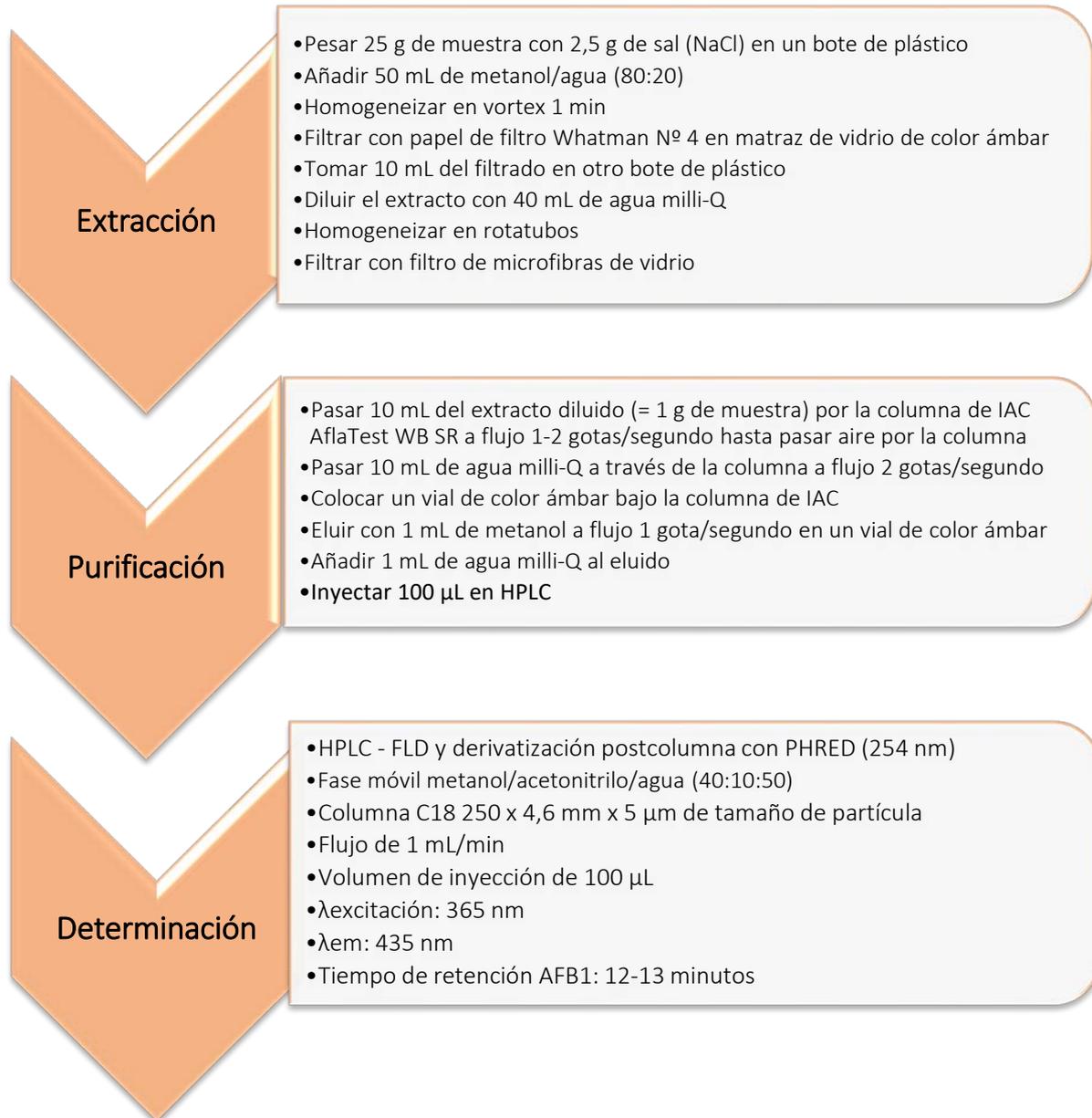
Si  $2 < |Z| \leq 3$  = El resultado es cuestionable

Si  $|Z| > 3$  = El resultado es insatisfactorio

#### **4.6. Métodos de análisis optimizados y validados**

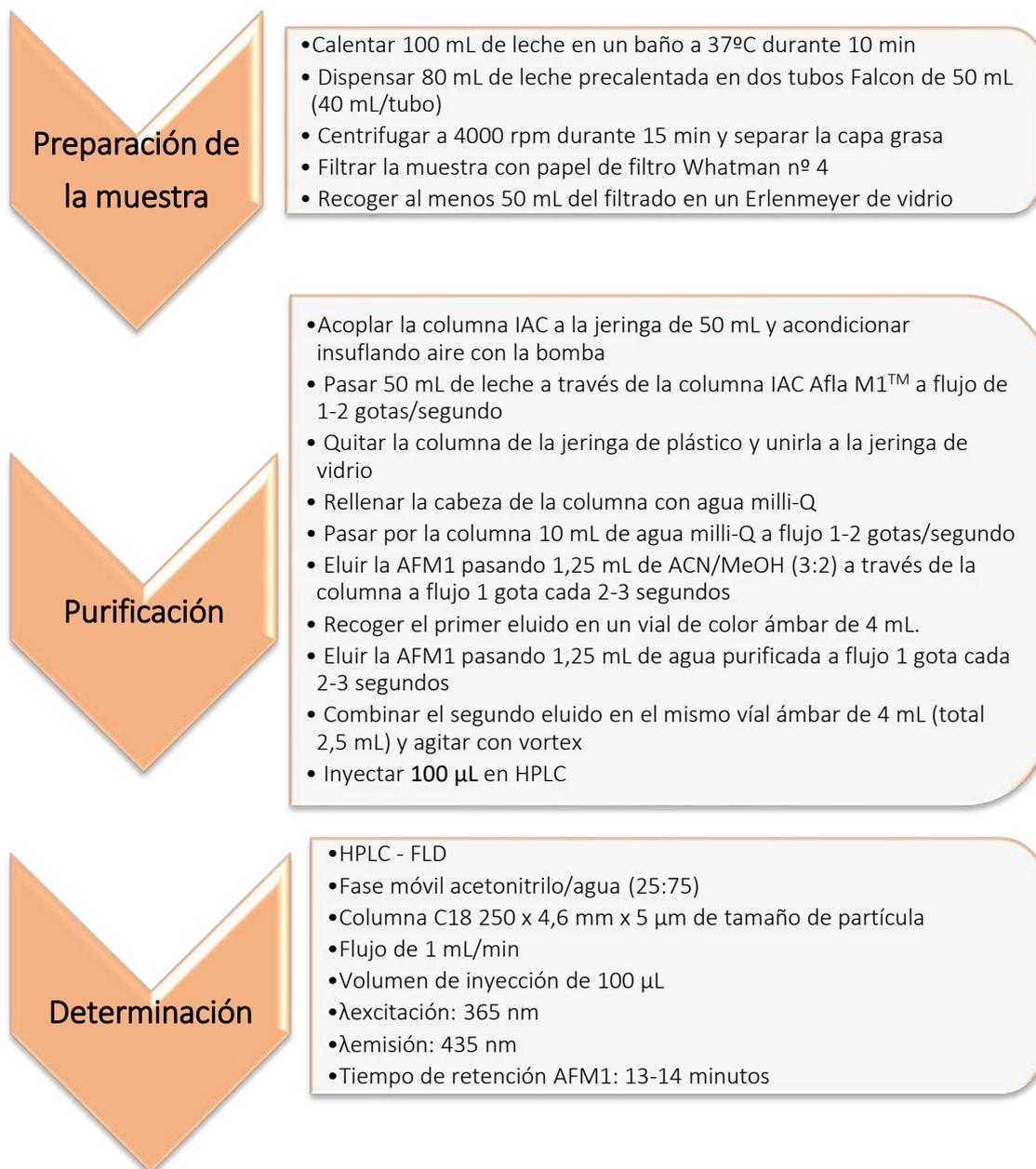
A continuación, en las Figuras 8, 9 y 10, se presenta la versión final de los métodos de análisis optimizados y validados satisfactoriamente en esta tesis doctoral. Con dichos métodos se han analizado las muestras.

**MÉTODO #1 - Método de análisis para la extracción, purificación y determinación de AFB1 en productos destinados a la alimentación animal (unifeed, piensos, materias primas)**



**Figura 8.** Procedimiento de análisis de AFB1 en muestras de alimentación animal.

## MÉTODO #2 - Método de análisis para la extracción, purificación y determinación de AFM1 en leche cruda de vaca



**Figura 9.** Procedimiento de análisis de AFM1 en leche cruda de vaca.

### MÉTODO #3 - Método de análisis para la extracción, purificación y determinación de aflatoxinas totales en caldo YES



**Figura 10.** Procedimiento de análisis de aflatoxinas totales en caldo YES.

#### 4.7. Muestreo y procedencia de las muestras

En la Figura 11 se señala un esquema de trabajo de los muestreos realizados para la detección de aflatoxinas en productos destinados a la alimentación animal (ración unifeed, y pienso completo), leche de vaca, y materias primas (maíz grano en cosecha y post-cosecha, harina de maíz y ensilado de maíz).

			
<p><b>60 lotes de raciones alimenticias</b></p> <p>Investigar la tasa de contaminación por AFB1 en raciones unifeed y pienso completo para vacuno lechero</p>	<p><b>60 lotes de leche cruda de vaca</b></p> <p>Investigar la tasa de contaminación por AFM1 en leche cruda, para evaluar la tasa de transferencia</p>	<p><b>60 muestras de maíz cosecha y postcosecha</b></p> <p>Investigar la tasa de contaminación por AFB1, en el contexto del cambio climático</p>	<p><b>20 muestras de harina y ensilado de maíz + 20 muestras de leche</b></p> <p>Investigar las tasas de aflatoxinas en materias primas y en leche, a nivel de granja lechera</p>

**Figura 11.** Esquema de trabajo de los ensayos realizados para la detección de aflatoxinas en diferentes matrices.

##### 4.7.1. Muestras de raciones alimenticias completas y de leche cruda de vaca

Para el estudio de la incidencia de aflatoxinas en productos de alimentación animal y en leche, así como la evaluación de la tasa de transferencia, se muestrearon 18 explotaciones de vacuno lechero de las provincias de Burgos (n=1), León (n=2), Huesca (n=4) y Zaragoza (n=11). Las muestras fueron recogidas durante los años 2015 y 2016, en distintas épocas del año (primavera e invierno). Las explotaciones muestreadas tenían vacas lecheras estabuladas de alta producción, de raza Holstein, con aproximadamente 700 kg de peso vivo. Como promedio, cada animal consumía 25 kg/día de materia seca (~ 50 kg día peso fresco) y producía 40 litros de leche al día.

El listado completo de muestras con la tipología y el origen se señala en la Tabla 11. Se han analizado 60 lotes de raciones completas destinadas a la alimentación de ganado vacuno lechero (38 lotes de ración unifeed y 22 lotes de pienso completo), así como las 60 muestras correspondientes de leche cruda de vaca. Las muestras de ración unifeed y pienso completo, se tomaron de forma representativa de los propios pesebres de las vacas en producción, muestreando 2 kg en una bolsa de nylon tipo ziplock. Ninguna de las muestras analizadas contenía adsorbentes de micotoxinas.

Las muestras de leche se tomaron del tanque de la sala de ordeño, en botes de plástico de 1 litros. Los técnicos de explotación se encargaron de la toma de muestras, garantizando la trazabilidad entre cada lote de alimentos para el ganado y la leche correspondiente.

Asimismo, en varias de las explotaciones de vacuno lechero, se tomaron adicionalmente 20 muestras de leche cruda de vaca directamente del tanque de la sala de ordeño, para completar el estudio de incidencia de aflatoxina M1 en leche. Estas muestras de leche cruda fueron tomadas de explotaciones de vacuno lechero de Burgos (n=1), León (n=1), Huesca (n=5) y Zaragoza (n=13), en las estaciones de primavera (n=12) e invierno (n=8).

Para la toma de muestras contamos, además de con la colaboración de las explotaciones, con una empresa láctea de ámbito nacional, el Gabinete Técnico Veterinario (GTV) y el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

Todas las muestras fueron identificadas y mantenidas en refrigeración a 4°C hasta el traslado al laboratorio. Las muestras de productos destinados a la alimentación animal fueron desecadas en estufa a 60°C hasta un valor de humedad del 12%. Luego, todas las muestras fueron mantenidas en congelación a -20°C hasta el momento de su preparación para el análisis. La preparación consistió en la trituración en un molino de laboratorio.

**Tabla 11.** Codificación de las muestras de raciones completas para el ganado.

Lote	Tipo de muestra	Origen
1	Ración unifeed	Burgos
2	Ración unifeed	Burgos
3	Ración unifeed	Burgos
4	Ración unifeed	Burgos
5	Ración unifeed	Burgos
6	Ración unifeed	León
7	Ración unifeed	León
8	Ración unifeed	León
9	Ración unifeed	León
10	Ración unifeed	León
11	Ración unifeed	Huesca
12	Ración unifeed	Huesca
13	Ración unifeed	Huesca
14	Ración unifeed	Huesca
15	Ración unifeed	Zaragoza
16	Ración unifeed	Zaragoza
17	Ración unifeed	Zaragoza
18	Ración unifeed	Zaragoza
19	Ración unifeed	Zaragoza
20	Ración unifeed	Zaragoza
21	Ración unifeed	Zaragoza
22	Ración unifeed	Zaragoza
23	Ración unifeed	Zaragoza
24	Ración unifeed	Zaragoza
25	Ración unifeed	Burgos
26	Ración unifeed	Burgos
27	Ración unifeed	Burgos
28	Ración unifeed	Burgos
29	Ración unifeed	Huesca
30	Ración unifeed	Zaragoza

Lote	Tipo de muestra	Origen
31	Ración unifeed	Zaragoza
32	Ración unifeed	Zaragoza
33	Ración unifeed	Zaragoza
34	Ración unifeed	Zaragoza
35	Ración unifeed	Zaragoza
36	Ración unifeed	Zaragoza
37	Ración unifeed	Zaragoza
38	Ración unifeed	Zaragoza
39	Pienso completo	León
40	Pienso completo	Zaragoza
41	Pienso completo	Zaragoza
42	Pienso completo	Zaragoza
43	Pienso completo	Zaragoza
44	Pienso completo	Zaragoza
45	Pienso completo	Zaragoza
46	Pienso completo	Zaragoza
47	Pienso completo	Zaragoza
48	Pienso completo	Zaragoza
49	Pienso completo	Zaragoza
50	Pienso completo	León
51	Pienso completo	León
52	Pienso completo	León
53	Pienso completo	Huesca
54	Pienso completo	Zaragoza
55	Pienso completo	Zaragoza
56	Pienso completo	Zaragoza
57	Pienso completo	Zaragoza
58	Pienso completo	Zaragoza
59	Pienso completo	Zaragoza
60	Pienso completo	Zaragoza

En todas las granjas lecheras investigadas las vacas se encontraban estabuladas y se alimentaban con dietas compuestas por forrajes y concentrados, de diversos orígenes y ofrecidos en distintas proporciones. Las raciones unifeed fueron elaboradas en las mismas explotaciones, a partir de las materias primas habituales para la alimentación de las vacas lecheras, con predominio del maíz y sus derivados (harina de maíz, maíz pastone y ensilado de maíz). En la Tabla 12 se indican los ingredientes y cantidades de las raciones unifeed para

vacuno lechero, que fueron analizadas para aflatoxinas en esta tesis doctoral. Como promedio, las raciones unifeed investigadas en este estudio contenían 52,5% de forrajes y 47,5% de concentrados.

**Tabla 12.** Composición típica de las raciones unifeed para vacuno lechero.

<b>INGREDIENTE</b>	<b>Materia seca (%)</b>	<b>Cantidad (kg)</b>	<b>Materia seca (Kg)</b>
<b>Ensilado de maíz</b>	34	25	8,5
<b>Ensilado de raigrás</b>	37	9,8	3,6
<b>Harina de maíz</b>	86	3,5	3,0
<b>Maíz pastone</b>	66	2,5	1,7
<b>Harina de soja</b>	93,5	2,5	2,3
<b>Torta de soja</b>	88,5	2	1,8
<b>Melaza de remolacha</b>	79	2,8	2,2
<b>Mix de minerales y vitaminas</b>	93,2	1,9	1,8
<b>Total (kg)</b>		<b>50,0</b>	<b>24,9</b>

Los piensos completos para vacuno lechero estaban constituidos por una mezcla de pienso compuesto comercial para vacas en lactación (aporta ~45-50% de la materia seca) y forrajes verdes y secos (~50-55% de la materia seca). La fórmula típica del pienso compuesto era la siguiente: maíz (30%), harina de soja (18%), cebada (13%), gluten de maíz (10%), harina de extracción de palma (6%), salvado de trigo (5%), sorgo (5%), sales minerales (5%), semilla de algodón (4,5%), aceite de colza (2%) y melaza y pulpa de

remolacha (1,5%). Estos piensos compuestos estaban presentados en forma de granulados (pellets). Para complementar dichos piensos compuestos en la propia granja, se utilizaron forrajes de ensilado de maíz, ensilado de raigrás, alfalfa y paja de cereales.

En la Figura 12 se muestran fotografías de ración unifeed, pienso completo y ensilado de maíz.



**Figura 12.** Muestras de ración unifeed (a); pienso completo (b); ensilado de maíz (c).

Las concentraciones de aflatoxina (AFB1) en productos destinados a la alimentación animal, se expresaron como microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de aflatoxina B1 por kilogramo (kg) de materia seca. La Directiva 2002/32/CE establece los contenidos máximos en piensos calculados sobre la base de un contenido de humedad del 12% (materia seca del 88%). Por consiguiente, para convertir la concentración de aflatoxina en **raciones completas** ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  con 12% de humedad), a concentración de aflatoxina en **materia seca** ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  MS), se aplicó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g AFB1 por kg de materia seca} = \frac{\mu\text{g AFB1 por kg de ración}}{(100 - \% \text{ humedad})} \times 100$$

En nuestro caso, como las muestras de productos destinados a la alimentación animal (ración unifeed, pienso completo, grano de maíz y ensilado de maíz) se desecaron hasta un contenido de humedad del 12%, podemos simplificar la fórmula:

$$\mu g \text{ AFB1 por kg de ración} = \mu g \text{ AFB1 por kg de materia seca} \times 0,88$$

#### **4.7.2. Muestras de materias primas a base de maíz**

Para el estudio de la incidencia de aflatoxina B1 en la cadena cerealista del maíz, en el contexto del cambio climático, se analizaron primeramente 30 lotes de maíz grano recién cosechado, procedentes de diferentes zonas agroclimáticas de Aragón (Altorricón, Biota, Fuentes de Ebro, Gallur, Mainar, Sariñena y Tauste) y Navarra (Artajona, Caparroso y Peralta). Este trabajo se hizo en colaboración con la empresa Monsanto (ahora Bayer), muestreando del remolque justo en el momento de la cosecha. Asimismo, se muestrearon 30 lotes de maíz grano en la fase de postcosecha (secaderos y almacenes de las mismas zonas de Aragón y Navarra), en colaboración con el Parque Científico Tecnológico Aula Dei (PCTAD) y cooperativas agrarias.

Finalmente, en varias de las explotaciones de vacuno lechero, se tomaron adicionalmente 20 muestras de productos a base de maíz destinados a la alimentación animal, tanto productos concentrados como forrajes. Éstas eran 7 muestras de harina de maíz, tomadas del silo de almacenamiento, y 13 muestras de ensilado de maíz, tomadas del ensilado horizontal. Estas muestras de productos a base de maíz fueron tomadas de explotaciones de vacuno lechero de Burgos (n=1), León (n=1), Huesca (n=5) y Zaragoza (n=13), en las estaciones de primavera (n=12) e invierno (n=8).

Las muestras de maíz grano de cosecha y postcosecha se tomaron de forma representativa en bolsas de malla de 2 kg de capacidad. Las muestras de harina de maíz y ensilado de maíz se tomaron como se indica en 4.7.1 para las raciones completas. Todas las muestras fueron identificadas y mantenidas en refrigeración a 4°C hasta el traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio, fueron desecadas en estufa a 60°C hasta un valor de humedad del 12%. Luego, las muestras fueron mantenidas en congelación a -20°C hasta el momento de su preparación para el análisis. La preparación consistió en la trituration en un molino de laboratorio.

#### **4.8. Estudios in vitro con antifúngicos naturales (ácidos fenólicos)**

##### **4.8.1. Estudio en caldo extracto de levadura y sacarosa**

Se estudió el efecto de cuatro ácidos fenólicos naturales, ferúlico, cafeico, p-cumárico y clorogénico, sobre el crecimiento y capacidad aflatoxigénica de la cepa de *A. parasiticus* CECT 2682 en caldo extracto de levadura y sacarosa (YES). La cepa *A. parasiticus* CECT 2682 tiene capacidad de producir las cuatro aflatoxinas principales, AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.

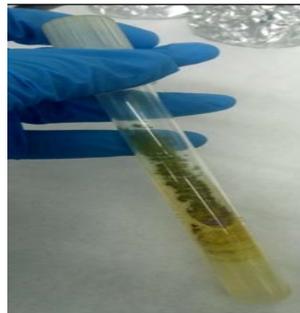
Para revivificar la cepa liofilizada, se añadió al vial un pequeño volumen de caldo Sabouraud-dextrosa al 2% hasta obtener una rehidratación completa. A partir de esta suspensión, con pipeta Pasteur de vidrio estéril, se repartió el líofilo en tres tubos de ensayo con 9 mL de caldo Sabouraud-dextrosa al 2%. Los tubos se incubaron durante 3 días a 25°C, para garantizar las condiciones óptimas de crecimiento. Tras el periodo de incubación se confirmó el crecimiento de la cepa por la presencia de turbidez en el medio. La cepa fue mantenida a -80°C en crioviales con un 15% de glicerol.

El inóculo para los ensayos in vitro consistió en una suspensión de esporas de *A. parasiticus*, que se preparó siguiendo las instrucciones descritas por Dalie et al. (2010). De los tubos crecidos en caldo Sabouraud-dextrosa al 2%, se realizó una siembra en agar patata

dextrosa (PDA), en tres puntos equidistantes de la placa. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 7 días para obtener un crecimiento abundante (Figura 13). Se recogió micelio del borde de la colonia con asa estéril, para ser sembrado superficialmente en estrías en tubos de agar inclinado PDA, que se incubó igualmente a 25°C durante 7 días (Figura 14).



**Figura 13.** *Aspergillus parasiticus*: aspecto de las colonias en PDA.



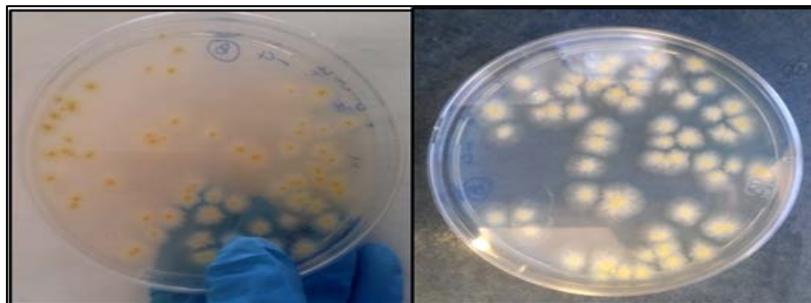
**Figura 14.** Crecimiento de *Aspergillus* en agar PDA inclinado incubado a 25°C durante 7 días.

Para recoger las esporas, se añadieron de manera aséptica 10 mL de Tween 80 al 0,01% a cada tubo crecido de PDA. Se frotó suavemente con asa de Drigalski estéril la superficie del agar, para favorecer la liberación de esporas y micelio de la superficie. La suspensión resultante, se filtró con embudo y gasa estéril de 4 capas para eliminar residuos de micelio en la suspensión. El filtrado con las esporas, se recogió en tubos de rosca estériles, que fueron almacenados a 4°C hasta su recuento en cámara de Neubauer.

Para el recuento de esporas en cámara de Neubauer, se utilizó un microscopio óptico de contraste de fases, que permite calcular el número de esporas por mL de suspensión, sin adición de colorantes. El recuento del número de esporas por mL de suspensión se realizó por triplicado y se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas por mL} = \frac{\text{Recuento medio}}{16} \times \frac{400}{0,1} \times 1000$$

La confirmación del recuento se realizó mediante siembra por extensión en superficie en placas de agar PDA, por duplicado. Se prepararon diluciones decimales seriadas en tubos de agua de peptona al 0,1%, se sembraron 0,1 mL por placa y se incubó a 25°C durante 3 días. Se seleccionaron las placas con un recuento entre 10-100 esporas por placa (Figura 15).



**Figura 15.** Confirmación de recuento de número de esporas por mL en PDA.

Se prepararon frascos de caldo YES a los que se agregaron ácidos fenólicos a varias concentraciones: 0 (control), 1 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM. Estas concentraciones equivalen aproximadamente al 0,02 – 0,4% (0,2 - 4 g/kg). Los caldos suplementados y los controles correspondientes fueron dispensados en tubos (9,9 mL) e inoculados con 0,1 mL de la

suspensión de esporas ( $10^6$  esporas/mL). Los tubos fueron incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  y muestreados en los días 4, 7, 10, 14 y 21.

En cada muestreo se determinó el valor de pH y el peso seco del micelio, así como la concentración de aflatoxinas en el filtrado de los tubos. Primero los tubos fueron autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos, para inactivar las esporas y el micelio vegetativo. Se separó el micelio filtrando el contenido del tubo con papel de filtro Whatman n<sup>o</sup>4 (Figura 16). Se lavó el micelio tres veces con 10 mL de agua destilada y se secó en estufa a  $130^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas (Ariño y Bullerman, 1993). Se enfriaron en desecador durante 30 minutos y se pesaron en balanza analítica. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento, respecto al control.

El filtrado de los tubos de caldo YES, se reservó para el posterior análisis de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 por HPLC-PHRED-FLD (MÉTODO #3).



**Figura 16.** Fotografías del proceso de evaluación del efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento del moho: peso del micelio seco.

#### **4.8.2. Estudio en granos de maíz**

Se estudió el efecto del ácido ferúlico sobre el crecimiento y capacidad aflatoxigénica de la cepa de *A. flavus* CECT 2687, en maíz grano. Utilizamos la especie *Aspergillus flavus* ya que está mejor adaptada al maíz que *Aspergillus parasiticus*. Para estos ensayos en grano de maíz, se seleccionó el ácido ferúlico porque es el ácido fenólico más abundante en los vegetales. Asimismo, utilizamos una única concentración del 0,4% (4 g/kg), que equivale aproximadamente a 20 mM, ya que fue la concentración inhibitoria de la síntesis de aflatoxinas en el estudio in vitro en caldo YES. Además, esta concentración se encuentra dentro del rango de aplicación de los ácidos orgánicos como aditivos tecnológicos conservantes en alimentación animal (CESFAC, 2016).

El maíz grano, libre de aflatoxinas, con un contenido de humedad del 14% y una actividad de agua  $a_w=0,70$ , se obtuvo de un lote procedente de la cosecha 2015 en Aragón. Para los ensayos, el maíz fue esterilizado y rehidratado siguiendo el método descrito por Ariño et al. (2007), con algunas modificaciones. El maíz fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos en un matraz de 1 L. Una vez enfriado, se le añadió agua destilada estéril, agitando de vez en cuando para una correcta rehidratación, hasta alcanzar un contenido de humedad del 40% ( $a_w=0,99$ ).

Los granos rehidratados se separaron asépticamente en matraces conteniendo 50 gramos, que fueron mezclados con una solución acuosa de ácido ferúlico (5 mL) en proporción de 4 gramos de ácido ferúlico por kg de maíz (equivalente al 0,4%), junto con los correspondientes controles sin ácido ferúlico (5 ml de etanol/agua, 50:50). Los matraces se agitaron vigorosamente para distribuir homogéneamente el ácido ferúlico por los granos de maíz. Se comprobó que la adición de ácido ferúlico no modificaba el pH, ya que el maíz

control presentó un pH de 5,73, mientras que el maíz suplementado mostró un valor de pH de 5,72.

La obtención y recuento de la suspensión de esporas de *A. flavus* CECT 2687, se realizó según viene descrito en el apartado anterior (4.8.1) de este capítulo. Se inocularon 100 µL de suspensión de esporas ( $10^6$  esporas/mL) en cada uno de los matraces suplementados y control. La boca de los matraces se cubrió formando un tapón con gasa estéril y papel aluminio agujereado, para permitir el intercambio de gases entre ambiente y matraz. Los matraces se incubaron a 25°C durante 21 días. Junto a los matraces, se incubaron frascos de solución glicerol-agua a la misma actividad de agua ( $a_w = 0,990$ ) del maíz. La aparición de crecimiento fúngico en los granos de maíz, se vigiló mediante observación visual cada 24 horas tras el inicio de la incubación, hasta que se observó un crecimiento visible del micelio en la superficie del grano.

Tras el periodo de incubación los matraces fueron esterilizados a 121°C durante 3 minutos para inactivar las esporas del moho. Los granos se secaron a 100°C durante 24 horas en estufa. El análisis de AFB1 se realizó mediante HPLC-PHRED-FLD (MÉTODO #1).

#### **4.9. Evaluación de adsorbentes de aflatoxinas**

Se estudió la capacidad *in vitro* de fijación de aflatoxina B1 de dos aditivos tecnológicos de piensos de la categoría antiaglomerantes, ambos de origen mineral: arcilla sepiolítica y zeolita-clinoptilolita. También se ensayó un nuevo secuestrante orgánico, basado en compuestos naturales de origen vegetal y con paredes de levaduras. Por comparación se utilizó como control positivo bentonita, que es un aditivo reductor de micotoxinas en piensos (código 1m558), cuya capacidad de fijación de aflatoxina B1 es superior al 90%.

En los experimentos de fijación de AFB1 se utilizó una dosis única de adsorbente del 1%, para simular la adición de estos aditivos a los piensos en niveles de inclusión de 10 kg por tonelada. Asimismo, se utilizó una sola concentración de AFB1 equivalente a 20 µg/kg, que es el contenido máximo autorizado en productos destinados a la alimentación animal. La capacidad de adsorción se investigó a diferentes pH (2, 5 y 7) para simular las condiciones del tubo digestivo.

Se preparó una solución de trabajo de aflatoxina B1 en metanol a una concentración de 5 µg/mL. Se prepararon las soluciones buffer a pH 2, pH 5 y pH 7,0 con un nivel de adición de adsorbente del 1%, y se dispensaron en tubos Falcon a razón de 25 mL/tubo. Por último, se adicionaron 100 µL de la solución de AFB1 para alcanzar una concentración en el propio tubo Falcon de 20 µg/kg. Paralelamente, se realizaron controles negativos de la misma manera, pero sin agregar aditivos para piensos, y los controles positivos se hicieron con bentonita como adsorbente mineral de referencia. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para el ensayo, los tubos se colocaron en agitador rotatorio en estufa a 37°C durante 60 minutos, seguido de centrifugación a 1500 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró con papel Whatman nº 1 y se tomaron 2 mL que se pasaron con una jeringa a través de un filtro de 0,45 micras. Finalmente, se inyectaron 100 µL en HPLC-PHRED-FLD.

La capacidad de fijación de aflatoxina B1 se definió como la diferencia en la concentración (calculada a partir de las áreas de los picos) entre los controles negativos y los ensayos con adsorbente, calculada como porcentaje de toxina eliminado del control negativo.

#### **4.10. Análisis estadístico**

Para la interpretación de resultados de los ensayos realizados en el presente estudio, se asignó un valor de cero a las muestras que presentaron valores de concentración de aflatoxinas inferiores al LOD (límite de detección). Para aquellas muestras que presentaron valores de concentración comprendidos entre LOD y LOQ, se utilizó su valor numérico. Las muestras que presentaron valores de concentración de aflatoxinas superiores al LOD, se utilizaron para calcular el porcentaje de positividad.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la aplicación del programa IBM SPSS Statistics Base, versión 22 (Armonk, NY, EE.UU.). Los datos se sometieron a estadística descriptiva y comparativa. Se calculó la media y la desviación estándar para cada aflatoxina y se determinó el porcentaje de positividad de las mismas. Para la estadística comparativa se utilizó el test ANOVA y los análisis de correlación y regresión.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Optimización de los métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral fue la puesta a punto de los métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas en las distintas matrices investigadas, adaptando cada procedimiento para optimizar su rendimiento y cumplir con los criterios establecidos en el Reglamento (CE) nº 401/2006, así como con la Decisión 2002/657/CE por la que se aplica la Directiva 96/23/CE sobre el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados.

El MÉTODO #1 para la determinación de aflatoxinas en productos destinados a la alimentación animal, comienza con un mezclado de la muestra (25 g) con cloruro sódico (2,5 g) para facilitar la extracción, la cual se realiza con 50 mL de metanol/agua. La purificación del extracto se realizó por inmunoafinidad con las columnas IAC AflaTest WB SR (Vicom). Esta técnica es rápida y fiable para muestras complejas como las materias primas y piensos. Con este método, la recuperación de aflatoxina B1 fue muy satisfactoria, fluctuando en el intervalo 89,2-96%. La recuperación para el resto de aflatoxinas (B2, G1 y G2) también fue muy apropiada, oscilando entre 87,5 y 98,3%. Estos resultados cumplen con los requisitos establecidos por el Reglamento (CE) nº 401/2006, que estipulan recuperaciones entre 50 y 120%, según el intervalo de concentración.

Para la determinación de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca (MÉTODO #2), es preciso acondicionar la muestra de leche para separar la grasa. Esta etapa se realizó calentando la muestra (100 mL de leche) a 37°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos y se separó la capa de grasa de la muestra de leche. La purificación del extracto se realizó por inmunoafinidad con las columnas IAC Afla M1 (Vicom). Con este método, la recuperación de aflatoxina M1 fue muy adecuada, fluctuando en el rango de 96,6

a 98,6%, No en vano, estos porcentajes de recuperación están dentro de los valores recomendados en el Reglamento (CE) nº 401/2006, que oscilan entre 60 y 120% según el intervalo de concentración de AFM1.

El MÉTODO #3 para la determinación de aflatoxinas en caldo YES (estudios in vitro), comienza con la extracción de una alícuota del caldo (2 mL), con 8 mL de una mezcla de acetonitrilo/agua (84:16). Tras el filtrado, se procedió a la purificación con una columna multifuncional Mycosep AflaZon (Romer Labs), contempladas en el método oficial AOAC 994:08 (AOAC, 2016). Las columnas Mycosep permiten una purificación rápida en un tiempo de 30 segundos, sin la necesidad de utilizar disolventes de elución, con alta calidad y rendimiento (Bao et al., 2010). Se prefirió utilizar este tipo de columnas, porque en los ensayos in vitro se producen muchas interferencias no específicas, que afectan el rendimiento de las columnas de inmovilización. Además, la suplementación con ácidos fenólicos a altas concentraciones también afecta negativamente a dichas columnas. Con este método, la recuperación de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 osciló entre 78,2 y 94,6%, en coherencia con lo indicado en el Reglamento (CE) nº 401/2006.

La fase de purificación de los extractos que contienen las aflatoxinas, es sumamente importante para el adecuado funcionamiento de los métodos analíticos, ya que se trata de eliminar los interferentes y recuperar los analitos de interés. En el MÉTODO #1 se utilizaron columnas de inmovilización AflaTest WB SR de Vicam. En el MÉTODO #2 se utilizaron columnas de inmovilización AflaM1 de Vicam. En el MÉTODO #3 se utilizaron columnas multifuncionales Mycosep 224 AflaZon de Romer Labs. En todos los casos, se han seguido las instrucciones de los fabricantes.

### **5.1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas**

El trabajo de puesta a punto de los métodos analíticos comenzó con la optimización de las condiciones cromatográficas: composición de la fase móvil, flujo y condiciones de los detectores. Para las condiciones HPLC-FLD de aflatoxina B1 (MÉTODO #1), primero se ensayó la fase móvil indicada por Ariño et al. (2009), que era una mezcla de metanol, acetonitrilo y agua (30:15:55). Los cromatogramas mostraron, que la resolución hasta la línea de base y la separación entre los picos no fueron adecuadas. En segundo lugar, se ensayó una fase móvil con una mayor proporción de metanol, compuesta también por metanol, acetonitrilo y agua (61,4:10,5:28,1) utilizada en el trabajo de Jager et al. (2013). En este caso, se mejoró la resolución de los picos, aunque todavía no era satisfactoria. Por esta razón se realizó un estudio bibliográfico y se seleccionaron diferentes composiciones de fases móviles, así como pequeñas modificaciones a partir de las anteriores, como aportaciones experimentales propias (Tabla 13).

De todos los ensayos, la composición de fase móvil que mostró mejor resolución hasta la línea de base y superior separación entre los picos, fue la mezcla metanol/acetonitrilo/agua (40:10:50). Los buenos resultados que se obtuvieron, podrían deberse a la alta polaridad de la fase móvil, ya que las aflatoxinas son compuestos polares (Cismileanu et al., 2008).

Según las recomendaciones de la casa comercial de la columna ACE y del trabajo de Copetti et al. (2011), la velocidad más adecuada del flujo de la columna es 1 mL/min, aunque en nuestro trabajo se ensayaron velocidades inferiores de 0,5 y 0,7 mL/min para determinar cuál de ellas conseguía resultados más óptimos. El tiempo de retención correspondiente a la AFB1, se comprobó con la inyección de tres réplicas de un patrón de 5 µg/L, obteniendo un

valor de 12-13 minutos. Para verificar la estabilidad del tiempo de retención, dicho patrón se inyectó durante veinte días seguidos.

**Tabla 13.** Composición de las fases móviles ensayadas para determinar aflatoxina B1.

Metanol%	Acetonitrilo%	Agua%	Flujo (mL/min)	Autores
20	20	60	1,0	AOAC Method 991.31
10	10	40	2,0	AOAC Method 994:08
30	20	60	1,0	UNE-EN ISO 17375:2007
30	20	60	1,0	UNE-EN 14123:2008
20	20	60	1,0	UNE-EN ISO 16050:2011
30	15	55	1,0	Ariño et al. (2009)
30	20	60	1,0	Copetti et al. (2011)
61,4	10,5	28,1	0,5	Jager et al. (2013)
40	10	50	1,0	Esta tesis doctoral

Asimismo, se ensayaron diferentes longitudes de ondas de excitación y emisión del detector de fluorescencia (FLD), para optimizar la determinación de aflatoxina B1. Para la elección de las longitudes de onda óptimas del detector de fluorescencia, se realizó una revisión bibliográfica. Respecto de la longitud de onda de excitación, la mayoría de autores, coinciden en 365 nm (Razzaghi et al., 2008; Gandomi et al., 2009; Copetti et al., 2011; Cano-Sancho et al., 2013). Sin embargo, para la longitud de onda de emisión se hicieron ensayos a 425, 445, 435 (B1 y B2) y 460 nm (G1 y G2), de los autores anteriormente citados. Como

resultado de los ensayos, se seleccionó la longitud de onda de emisión en 435 nm, que mostró la mejor respuesta para la aflatoxina B1.

El detector de fluorescencia (FLD), es muy selectivo para las aflatoxinas B, G y M, porque éstas emiten fluorescencia. No obstante, la señal fluorescente de las aflatoxinas B1 y G1 es relativamente baja, por lo que se precisa un proceso de derivatización post-columna para incrementar su respuesta al detector. En nuestro laboratorio disponemos de un detector fotoquímico (PHRED a 254 nm), conectado al sistema cromatográfico, que derivatiza las aflatoxinas produciendo un incremento de la señal de 30 veces.

Una vez optimizados todos los parámetros cromatográficos, y realizados todos los ensayos descritos anteriormente, las condiciones cromatográficas finales del MÉTODO #1 para el análisis de AFB1 se describen en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Condiciones cromatográficas para el análisis de AFB1 en productos destinados a la alimentación animal.

<b>Fase móvil isocrática</b>	Metanol/acetonitrilo/agua (40:10:50, v/v/v)
<b>Flujo</b>	1,0 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	100 µL
<b>Columna</b>	ACE 5 C <sub>18</sub> , 250 x4,6 mm, 5 µm tamaño de partícula
<b>T<sup>a</sup> de columna</b>	25°C
<b>Detector</b>	Fluorescencia (FLD) Derivatización fotoquímica (PHRED a 254 nm)
<b>Longitudes de onda</b>	Excitación: 365 nm    Emisión: 435 nm
<b>Tiempo de análisis</b>	15 minutos Tiempo de retención aflatoxina B1 = 12-13 minutos

Para las condiciones HPLC-FLD de la aflatoxina M1 (MÉTODO #2), se tomó como referencia la norma UNE-EN ISO 14501:2008. La composición de la fase móvil es una mezcla de agua/acetonitrilo (75:25, v/v), con velocidad de flujo de 1 mL/min. La comprobación del tiempo de retención correspondiente al pico de AFM1, se realizó con la inyección de tres réplicas de un patrón de 50 ng/L, obteniendo un valor de 13-14 minutos. La estabilidad del patrón se verificó inyectándolo durante veinte días seguidos, para comprobar si los tiempos de retención eran constantes. Igualmente, se ensayaron diferentes longitudes de ondas de excitación (365 y 370 nm) y de emisión (418, 435 y 460 nm).

Una vez optimizados todos los parámetros cromatográficos y realizados todos los ensayos descritos anteriormente para el análisis de AFM1, las condiciones cromatográficas finales se describen en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Condiciones cromatográficas para el análisis de AFM1 en leche de vaca.

<b>Fase móvil isocrática</b>	Acetonitrilo/agua (25:75, v/v)
<b>Flujo</b>	1,0 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	100 µL
<b>Columna</b>	ACE 5 C <sub>18</sub> , 250 x4,6 mm, 5 µm tamaño de partícula
<b>T<sup>a</sup> de columna</b>	30 °C
<b>Detector</b>	Fluorescencia (FLD). No se precisa derivatización
<b>Longitudes de onda</b>	Excitación: 365 nm Emisión: 435 nm
<b>Tiempo de análisis</b>	18 minutos Tiempo de retención aflatoxina M1 = 13-14 minutos

Las condiciones cromatográficas para la determinación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) en caldo YES (MÉTODO #3), fueron las mismas que las indicadas para el MÉTODO #1 (Tabla 14), salvo que el flujo se redujo a 0,7 mL/minuto y la longitud de onda de emisión fue de 465 nm.

## **5.2. Validación de los métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas**

Una vez optimizados nuestros métodos de análisis, se procedió a evaluar los parámetros comprendidos en el proceso de validación. La validación se ha realizado tomando como referencia el Reglamento (CE) nº 401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxina en productos alimenticios. También se ha tomado como modelo la Decisión 2002/657/CE, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE en lo atinente al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados.

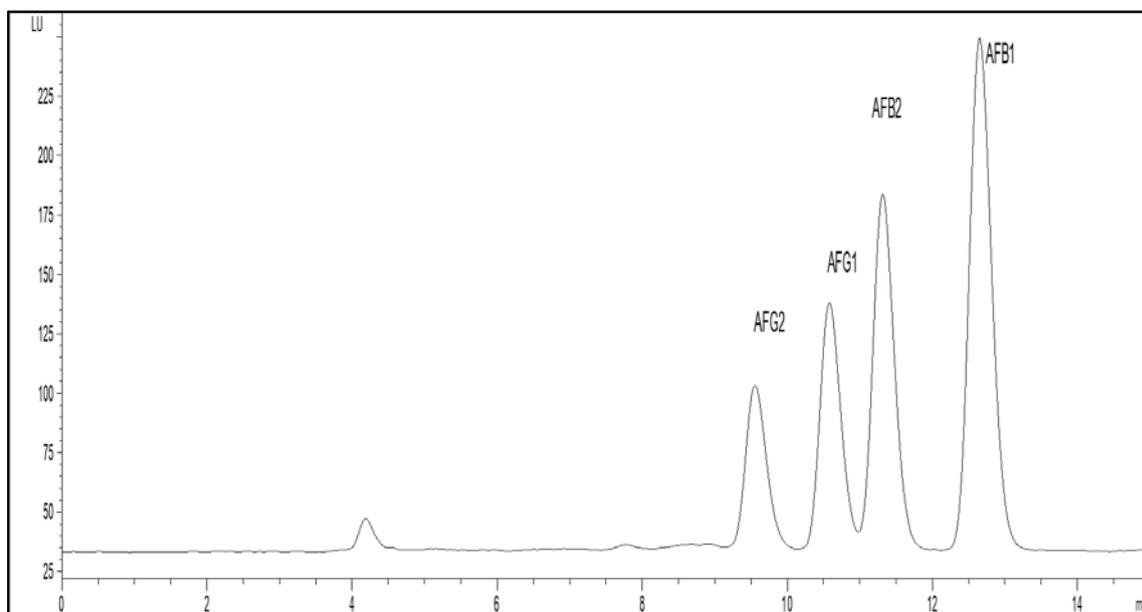
Los parámetros evaluados para la validación fueron: especificidad, linealidad, sensibilidad (LOD, LOQ), exactitud y precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

### **5.2.1. Especificidad de los métodos de análisis de aflatoxinas**

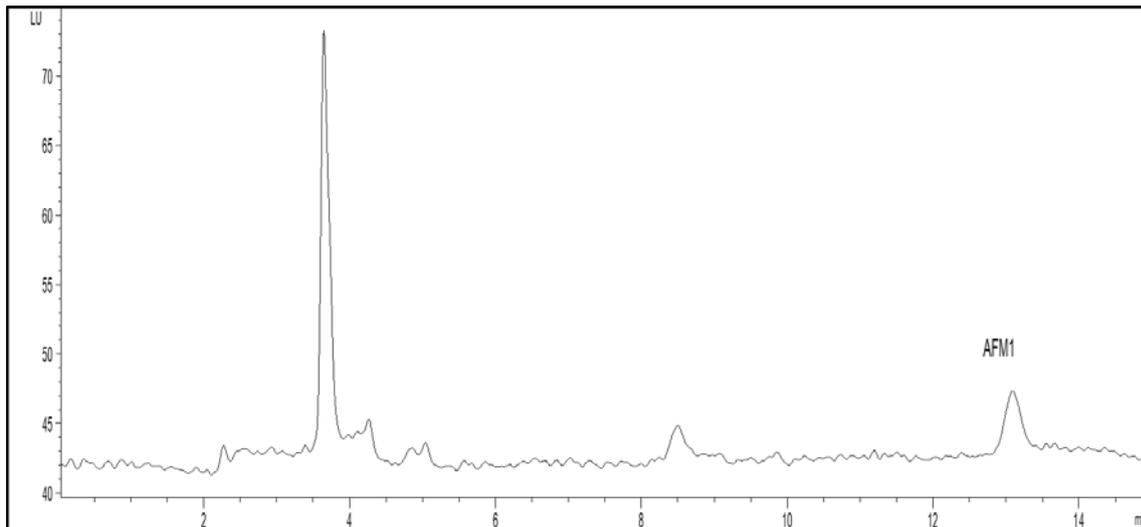
Este parámetro, como hemos descrito con anterioridad, nos permite evaluar la capacidad del método para distinguir y cuantificar los analitos en la matriz, en presencia de otras sustancias que puedan interferir en los resultados. Con el fin de garantizar una adecuada especificidad, todas las muestras fueron analizadas mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y reactor fotoquímico (PHRED), siguiendo los parámetros previamente optimizados y validados en el laboratorio.

Las distintas etapas consistieron en el análisis cromatográfico de soluciones patrón de cada aflatoxina, disolvente de inyección, blanco analítico, muestras blanco (pienso, leche y caldo YES, sin aflatoxinas) y muestras fortificadas.

Con las condiciones cromatográficas establecidas, el patrón de aflatoxina B1 mostró un tiempo de retención de 12-13 minutos (Figura 17), mientras que la aflatoxina M1 eluye a los 13-14 minutos (Figura 18).



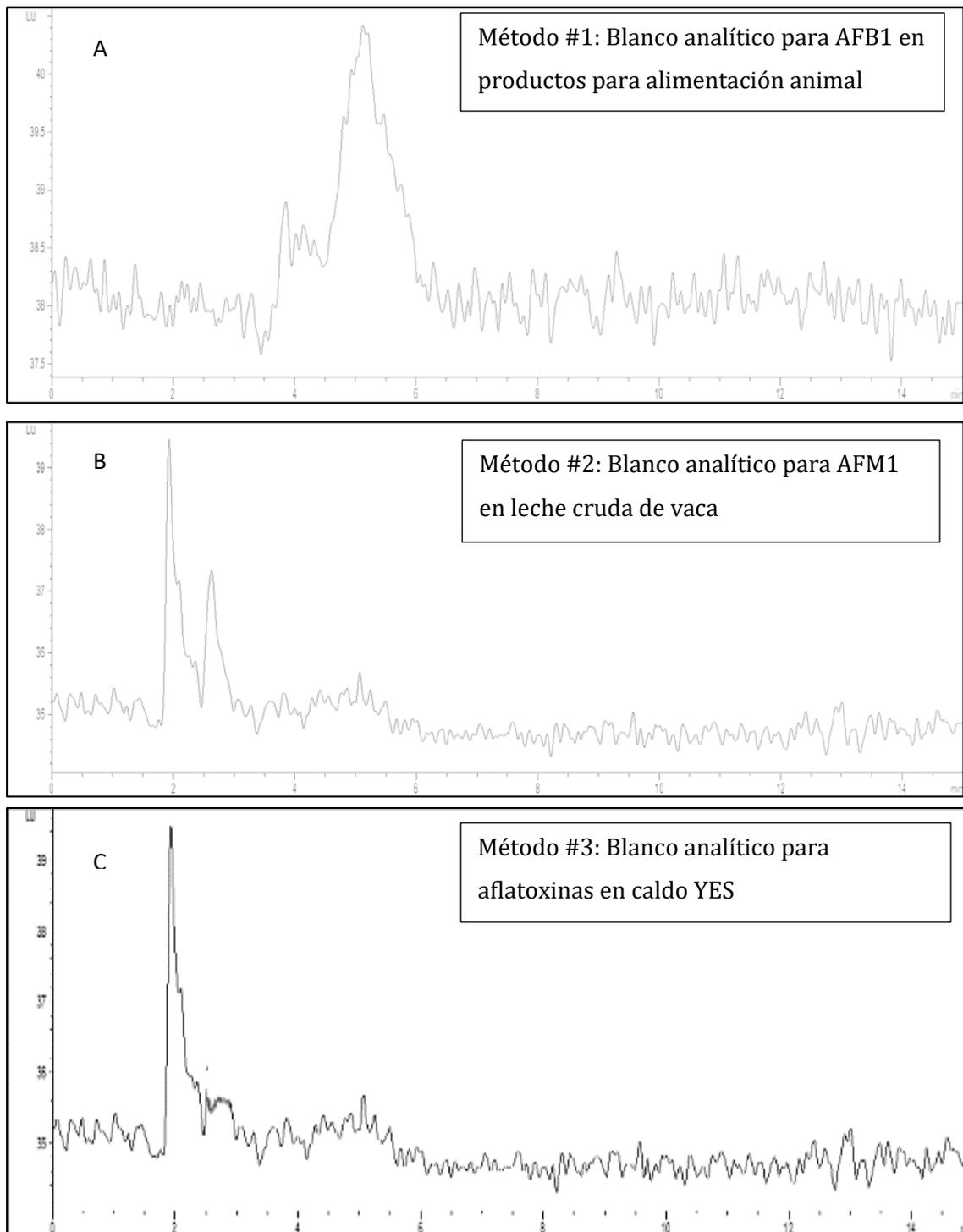
**Figura 17.** Cromatograma del patrón de aflatoxinas a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B1 y G1) y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B2 y G2).



**Figura 18.** Cromatograma del patrón de aflatoxina M1 a 200 ng/L.

Los **blancos analíticos** se obtuvieron realizando el procedimiento analítico completo, desde la extracción hasta la inyección en el HPLC, pero sin utilizar la muestra. Tras la inyección de estos blancos de reactivos, comprobamos que en los cromatogramas no hubiera picos interferentes con el tiempo de retención de las aflatoxinas.

En la Figura 19 se muestran los cromatogramas, con la señal del detector de fluorescencia (FLD), de los blancos analíticos para los MÉTODOS #1, #2 y #3.

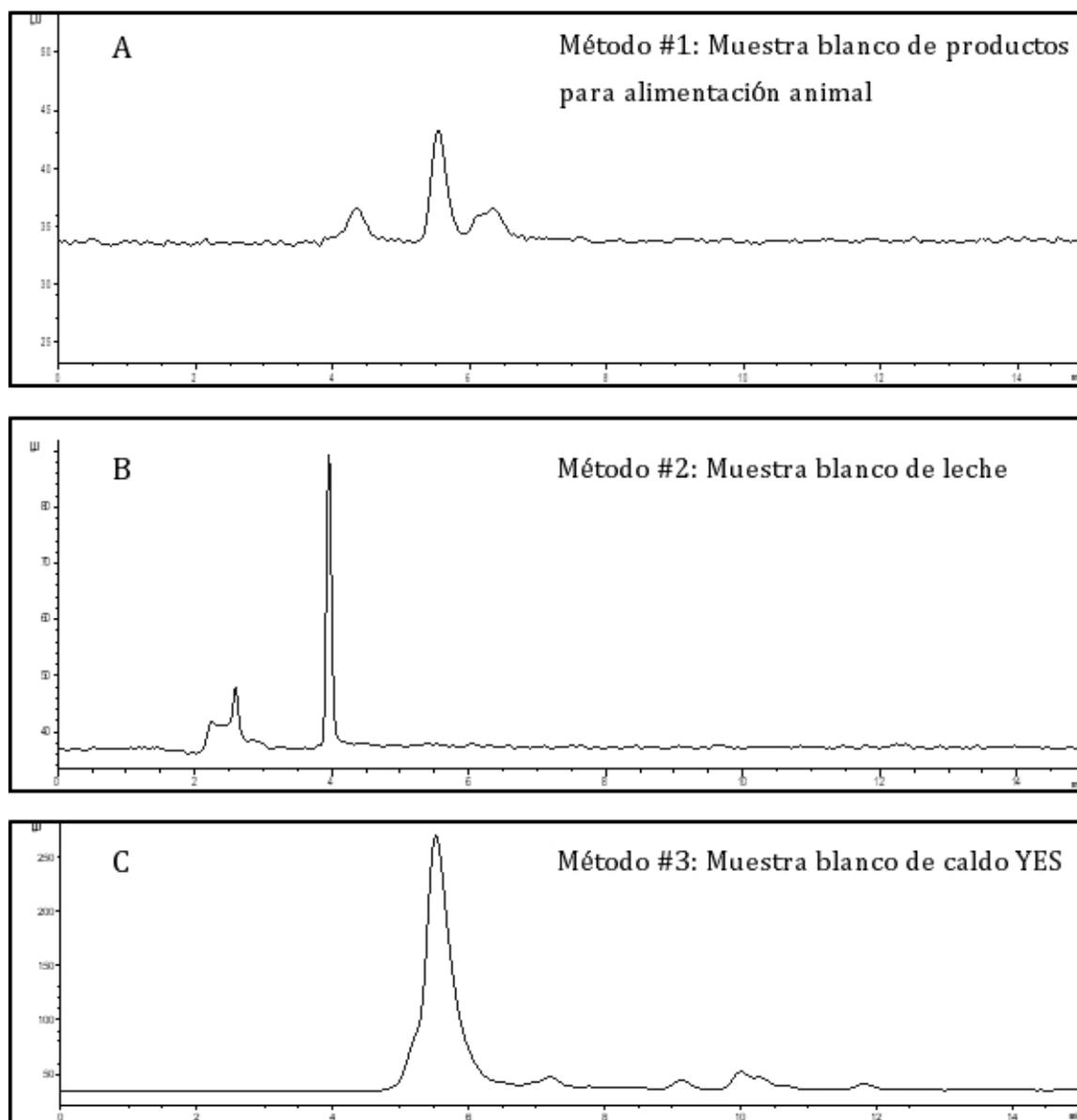


**Figura 19.** Cromatograma de los blancos analíticos de los tres métodos optimizados.

Como podemos ver, no se observaron interferencias analíticas que se pudieran solapar con el tiempo de retención de las aflatoxinas estudiadas.

Además, tras evaluar los cromatogramas obtenidos de las soluciones patrón de aflatoxinas y de los blancos analíticos, tratamos de identificar posibles interferencias relacionadas con la matriz a analizar, utilizando **muestras blanco** (sin aflatoxinas) y/o **materiales de referencia certificados** (con concentraciones conocidas).

A continuación, en la Figura 20 se muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras blanco de todas las matrices estudiadas.



**Figura 20.** Cromatogramas de muestras blanco: A) productos para alimentación animal para AFB1, B) leche para AFM1 y C) caldo YES para aflatoxinas

Como se puede observar no se detectaron picos interferentes con los tiempos de retención de AFG2 (9,1 minutos), AFG1 (10,8), AFB2 (10,1) y AFB1 (12,1), ni con el tiempo de retención de AFM1 (13,1 minutos), procedentes de las respectivas matrices alimentarias. Estos tiempos de retención son muy similares a los reportados Campos et al. (2017).

### ***5.2.2. Linealidad de los métodos de análisis de aflatoxinas***

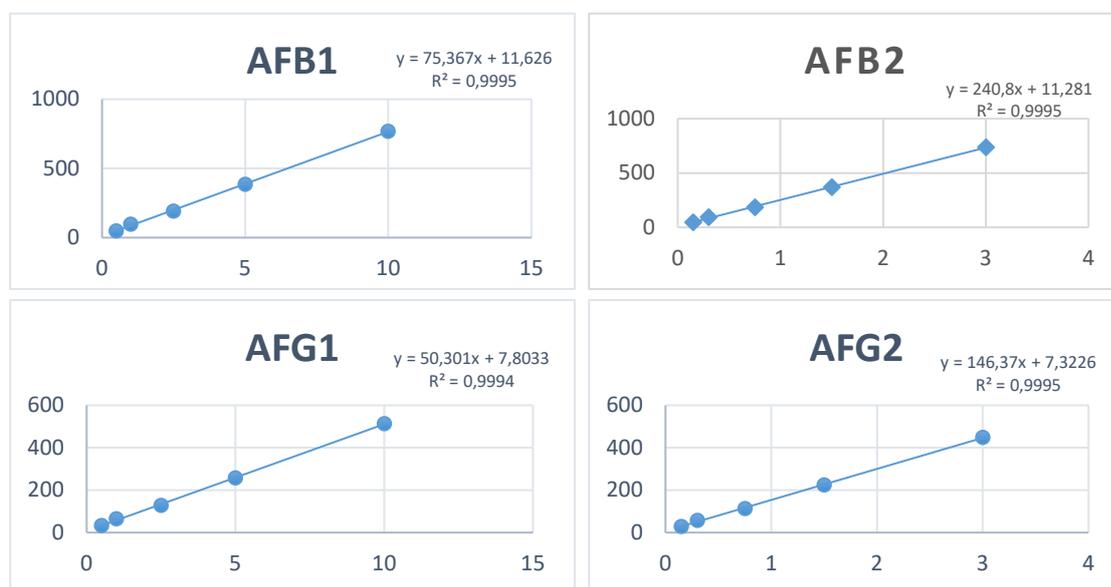
La **linealidad** viene representada a través de una recta de regresión que, posteriormente, se utiliza como recta de calibrado para calcular la concentración de aflatoxinas en las muestras problema. Las concentraciones de patrones preparadas en la recta lineal de aflatoxinas B1 y G1 fueron 0,5; 1,0; 2,5; 5 y 10  $\mu\text{g/L}$ , para aflatoxinas B2 y G2 se utilizaron 0,25; 0,5; 0,75; 1,5 y 3  $\mu\text{g/L}$ , mientras que para aflatoxina M1 utilizamos 25; 50; 75; 100; 150 y 200  $\text{ng/L}$ . Mediante el estudio de linealidad (coeficiente de correlación lineal  $r$  de Pearson y coeficiente de determinación  $R^2$ ) comprobamos que la señal obtenida en el detector es proporcionalmente lineal a la concentración del analito, para lo que utilizamos 5 rectas de calibrado.

A continuación, en la Tabla 16 se indican los resultados individuales de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), así como su valor medio y la desviación estándar relativa (RSD%). Todos los valores de  $R^2$  fueron superiores a 0,999, mostrando una alta precisión a juzgar por los valores de RSD% inferiores a 0,1%. Por lo tanto, estos resultados mostraron una linealidad satisfactoria dentro del rango analizado.

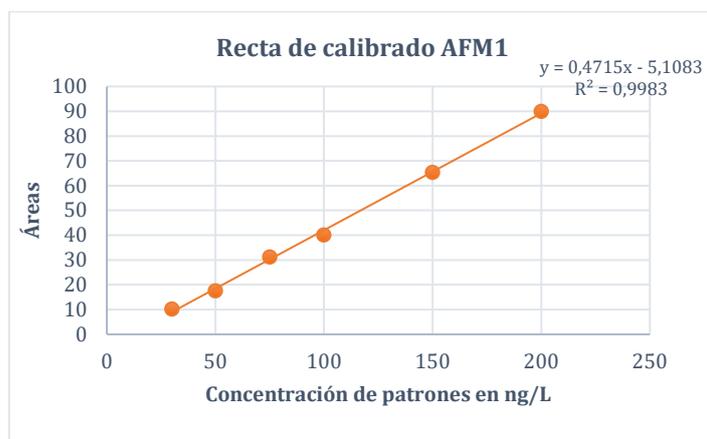
**Tabla 16.** Valores de  $R^2$  y RSD% de 5 rectas de linealidad de soluciones patrones de aflatoxinas B, G y M.

Recta de calibrado	Valores $R^2$				
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1
1	0,9999	0,9997	0,9994	0,9991	0,9983
2	0,9997	0,9995	0,9999	0,9995	0,9987
3	0,9998	0,9999	0,9993	0,9999	0,9999
4	0,9995	0,9997	0,9995	0,9995	0,9996
5	0,9993	0,9994	0,9999	0,9996	0,9991
<b>Media</b>	0,9996	0,9996	0,9996	0,9995	0,9991
<b>(RSD%)</b>	0,02	0,02	0,03	0,03	0,07

En las Figuras 21 y 22 podemos observar algunas de las rectas de calibrado de los patrones de cada aflatoxina, con  $R^2 > 0,999$ .



**Figura 21.** Recta de calibrado mediante patrón externo de una mezcla de aflatoxinas



**Figura 22.** Recta de calibrado mediante patrón externo de AFM1.

Otros autores como Huang et al. (2010) y Campos et al. (2017) obtuvieron, también, valores similares a los nuestros, de  $R^2$  mayores de 0,999 para todas las aflatoxinas.

### 5.2.3. Sensibilidad de los métodos de análisis de aflatoxinas

La evaluación de la sensibilidad se llevó a cabo mediante el cálculo de los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ). Estos valores se estimaron como una relación señal/ruido x3 y x10, respectivamente.

En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de LOD y LOQ, a partir del estudio de sensibilidad para las aflatoxinas investigadas. Todos los valores son satisfactorios, por debajo de los respectivos contenidos máximos establecidos por la legislación para AFB1 en raciones alimenticias destinadas al ganado (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y en leche (0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

**Tabla 17.** Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las aflatoxinas objeto de estudio en cada una de las matrices investigadas.

Aflatoxina	Raciones alimenticias		Leche cruda de vaca		Caldo YES	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
<b>Aflatoxina B1</b>	0,03	0,10	--	--	0,03	0,10
<b>Aflatoxina B2</b>	0,03	0,10	--	--	0,03	0,10
<b>Aflatoxina G1</b>	0,05	0,15	--	--	0,05	0,15
<b>Aflatoxina G2</b>	0,03	0,10	--	--	0,03	0,10
<b>Aflatoxina M1</b>	--	--	0,008	0,025	--	--

Al observar nuestros buenos resultados de LOD y LOQ, podemos concluir que los métodos desarrollados son suficientemente sensibles. La comparación con los datos ofrecidos por otros autores (Tabla 18), confirma la buena sensibilidad de nuestros métodos de determinación de aflatoxinas, tanto para raciones alimenticias como para leche. Por ejemplo Muscarella et al. (2009) analizaron muestras de pienso utilizando (HPLC-PHRED-FLD) como técnica cromatográfica y obtuvieron un LOD de  $0,08 \mu\text{g}/\text{kg}$ , ligeramente superior al conseguido en nuestro estudio. En España, Hernández y Navarro (2015), utilizaron un método HPLC-FLD con derivatización post-columna para la determinación de aflatoxina B1 en piensos de vacuno lechero, logrando un LOD de  $0,003 \mu\text{g}/\text{kg}$ . En el caso de la AFM1 en leche, otros autores han logrado valores de LOD por debajo de los nuestros, pudiendo alcanzar hasta  $0,003 \mu\text{g}/\text{kg}$  en muestras de leche líquida (Shundo et al., 2016).

En resumen, los resultados de sensibilidad mostrados en este estudio, son adecuados para el análisis de las aflatoxinas de interés, ya que los valores están acordes con los intervalos de concentración de los métodos analíticos recogidos en el Reglamento (CE) nº 401/2006.

**Tabla 18.** Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de aflatoxinas obtenidos por otros autores mediante el uso de HPLC.

LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Aflatoxina	Matriz	Autor
0,2	0,6	AFB1	Pienso	(Muscarella et al., 2009)
0,009	0,03	AFB1	Arroz	(Lai et al., 2014)
0,04	0,12	AFB1	Cereales	(Campone et al., 2011)
0,08	0,15	AFB1	Frutos secos	(Chun et al., 2007)
0,104	0,110	AFB1	Pimientos	(Golge et al., 2013)
0,003	0,008	AFM1	Leche	(Shundo et al., 2016)
0,021	0,025	AFM1	Leche	(Golge, 2014)
0,023	0,036	AFM1	Leche	(Bilandžić et al., 2014)
0,05	0,015	AFM1	Leche	(Mao et al., 2015)
0,020	0,087	AFM1	Leche	(Wang et al., 2012)
0,09	0,25	AFM1	Leche	(Scaglioni et al., 2014)

#### 5.2.4. Exactitud (recuperación) de los métodos de análisis de aflatoxinas

El estudio de la **exactitud** se llevó a cabo evaluando el porcentaje de recuperación, mediante el análisis de muestras blanco de raciones alimenticias, leche cruda de vaca y caldo YES, enriquecidas con las aflatoxinas de interés. Para enriquecer las muestras blanco se utilizaron tres niveles de concentración, cubriendo los rangos establecidos en el Reglamento (CE) nº 401/2006. En el caso de la leche, también se analizó material de referencia certificado (leche entera en polvo, reconstituida con agua destilada) con contaminación natural por aflatoxina M1. Como se puede observar en las Tablas 19, 20 y 21, los resultados se calcularon como porcentajes de recuperación (medias  $\pm$  RSD%).

**Tabla 19.** Porcentajes de recuperación de las aflatoxinas en raciones alimenticias (media  $\pm$  RSD%, n=6).

<b>Aflatoxina</b>	<b>Nivel de enriquecimiento</b>		
	<b>2,5 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>
AFB1	95,11 $\pm$ 0,09	89,21 $\pm$ 0,11	96,03 $\pm$ 0,23
AFB2	87,53 $\pm$ 0,14	93,11 $\pm$ 0,29	95,99 $\pm$ 0,14
AFG1	98,29 $\pm$ 0,01	90,62 $\pm$ 0,09	94,42 $\pm$ 0,10
AFG2	93,62 $\pm$ 0,12	92,24 $\pm$ 0,13	93,38 $\pm$ 0,08

**Tabla 20.** Porcentajes de recuperación de AFM1 en leche cruda de vaca (media  $\pm$  RSD%, n=6).

<b>AFM1 EN LECHE CRUDA DE VACA</b>	
<b>Nivel de enriquecimiento (<math>\mu\text{g}/\text{L}</math>)</b>	<b>Media <math>\pm</math> RSD<sub>R</sub>%</b>
<b>25</b>	98,60 $\pm$ 1,36
<b>50</b>	98,46 $\pm$ 1,46
<b>75</b>	96,62 $\pm$ 1,36

El análisis del material de referencia (leche entera en polvo con  $0,44 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxina M1), arrojó un resultado satisfactorio de  $0,40 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{kg}$  (n = 3), que indica un porcentaje de recuperación del 89%.

**Tabla 21.** Porcentajes de recuperación de aflatoxinas en caldo YES ( $\bar{x} \pm \text{RSD}\%$ , n=6).

Nivel de enriquecimiento	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
10 $\mu\text{g/L}$ para AFB1 y AFG1	94,59 $\pm$ 0,80	80,99 $\pm$ 0,39	78,23 $\pm$ 0,39	80,69 $\pm$ 0,25
3 $\mu\text{g/L}$ para AFB2 y AFG2				

En las muestras destinadas a la alimentación pudimos observar valores de recuperación entre 89,21 al 98,29%, resultados muy similares a los observados por Choochuay et al. (2018) en el mismo tipo de muestras.

En el caso del estudio *in vitro* en caldo YES, la determinación de este parámetro se llevó a cabo enriqueciendo seis muestras de caldo YES estéril, a un nivel de 10  $\mu\text{g/L}$  para B1, y G1, y de 3  $\mu\text{g/L}$  para B2 y G2 (Tabla 21).

En cuanto a la recuperación para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y AFM1, nuestros resultados oscilan entre 78% hasta 96%, que concuerda con lo establecido en el Reglamento (CE) n° 401/2006, donde los valores de recuperación para concentraciones de aflatoxinas entre 1-10  $\mu\text{g/kg}$  deben estar entre el 70 y el 110% (Tabla 22). Mientras que en el caso de la AFM1 para los intervalos de concentración de 0,01-0,05  $\mu\text{g/kg}$  valores de recuperación recomendados estarían entre 60 y 120%.

**Tabla 22.** Criterios para aflatoxinas establecidos en el Reglamento (CE) n° 401/2006.

Aflatoxina	Contenido ( $\mu\text{g/kg}$ )	% recuperación
AFB1, AFB2 , AFG1 y AFG2	< 1,0	De 50 a 120%
	1-10	De 70 a 110%
	> 10	De 80 a 110%
AFM1	0,01-0,05	De 60 a 120%
	> 0,05	De 70 a 110%

En nuestro caso, los valores obtenidos en cada una de las matrices se encuentran dentro de los límites establecidos por la legislación y están en la línea con los publicados por otros autores como Campos et al. (2017) en muestras de nueces; Sakin et al. (2018) en leche y piensos y Khodadadi et al. (2018) en muestras de leche.

### ***5.2.5. Precisión de los métodos de análisis de aflatoxinas***

#### **5.2.5.1. Precisión de la inyección manual**

Se determinó la **precisión de la inyección** en el HPLC, preparando soluciones patrón para cada aflatoxina y realizando diez repeticiones. Se calculó la media y la desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (RSDr) para cada micotoxina, para comprobar la precisión del método analítico (Reglamento (CE) nº 401/2006). En la Tabla 23 se muestran los valores de la media y de la desviación estándar relativa calculados tras la inyección de los patrones. Para AFB1 y AFG1 se inyectó una solución patrón de 5 µg/L, con un volumen de inyección de 100 µL, para AFB2 y AFG2 de 1,5 µg/L con un volumen de inyección de 100 µL, y para AFM1 de 200 µg/L con un volumen de inyección de 100 µL, en el HPLC. Se consideraron el tiempo de retención (TR) en minutos y la señal de cada patrón inyectado en cuentas de área.

**Tabla 23.** Precisión de la inyección de soluciones patrón de aflatoxinas, con indicación del tiempo de retención (TR en minutos) y la señal FLD (cuentas de área).

AFB1		AFB2		AFG1		AFG2		AFM1	
TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área
12,1	3300,1	10,2	1189,3	10,8	1623,1	9,3	1147,2	13,1	99,8
12,0	3162,7	10,2	1013,8	10,9	1847,9	9,1	1142,1	13,0	100,5
12,0	2904	10,1	1121,6	10,9	1868,4	9,1	1149,4	13,0	100,3
12,1	2886,6	10,0	1144,4	10,8	1692,5	9,1	1121,9	13,1	108
12,2	2749,4	10,2	1011,3	10,7	1849,3	9,1	1114,8	13,1	107,6
12,1	2914	10,0	1180,2	10,8	1643,1	9,1	1110,3	13,1	105,1
12,0	3100,4	10,1	1032,5	10,9	1837,8	9,1	1119,7	13,0	104,1
12,0	3262,3	10,2	1126,7	10,8	1863,1	9,1	1142,3	13,0	100,9
12,1	2876,1	10,2	1132,8	10,8	1794,5	9,3	1135,8	13,1	103,4
12,2	2729,2	10,2	1111,9	10,9	1842,2	9,1	1144,2	13,0	100,8
<b>12,1<sup>a</sup></b>	<b>2988,5</b>	<b>10,1</b>	<b>1106,5</b>	<b>10,8</b>	<b>1786,2</b>	<b>9,1</b>	<b>1132,8</b>	<b>13,1</b>	<b>103,1</b>
<b>0,65%<sup>b</sup></b>	<b>6,83%</b>	<b>0,83%</b>	<b>5,89%</b>	<b>0,62%</b>	<b>5,35%</b>	<b>0,92%</b>	<b>1,29%</b>	<b>0,40%</b>	<b>2,98%</b>

a: media; b: desviación estándar relativa

Los valores obtenidos de RSDr son (< 7%), lo cual nos permiten asegurar la eficacia de la inyección y de nuestro sistema cromatográfico. Estos valores concuerdan con los resultados logrados por Wen et al. (2013), quienes obtuvieron valores de% RSDr en el rango 0,09-3,5% para la Precisión. Por otro lado, Chan et al. (2004) obtuvo un RSDr% mucho más alto, entre 9,06 y 10,13% en condiciones de repetibilidad, lo que sugiere que el método validado aquí tiene una alta precisión.

### 5.2.5.2. Repetibilidad intralaboratorio

La **repetibilidad** se obtuvo calculando la desviación estándar relativa (RSD%) de 6 análisis de aflatoxinas, en muestras enriquecidas a tres niveles de concentración, analizadas el mismo día. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Precisión en condiciones de repetibilidad (RSD<sub>r</sub>%) (n=6) para AFB1, B2, G1, G2 y M1.

Nivel ⇒	Raciones alimenticias (µg/kg)			Leche de vaca (ng/L)			Caldo YES (µg/L)
	2,5	5	10	25	50	100	10
<b>AFB1</b>	3,95	2,45	3,04	--	--	--	5,53
<b>AFB2</b>	6,51	6,13	1,79	--	--	--	10,89
<b>AFG1</b>	0,46	2,0	1,38	--	--	--	9,05
<b>AFG2</b>	5,05	2,86	1,09	--	--	--	4,20
<b>AFM1</b>	--	--	--	9,66	4,56	10,17	--

Los datos mostrados permiten evaluar el coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad. De acuerdo con la ecuación de Horwitz, señalada por el Reglamento (CE) nº 401/2006 para el cálculo de los valores aceptables de repetibilidad (RSD<sub>r</sub>%), éstos son 26%, 23% y 21% para las concentraciones de 2,5, 5 y 10 µg/kg de aflatoxinas, respectivamente. Con concentraciones de analito inferiores a 1 µg/kg, como es el caso de la aflatoxina M1, la aplicación de la ecuación de Horwitz conduce a valores inaceptablemente elevados. Por ello, los valores de RSD<sub>r</sub>% para esta aflatoxina serán lo más bajos posible.

Todos nuestros resultados de repetibilidad se consideraron satisfactorios según los criterios establecidos en el Reglamento (CE) nº 401/2006. Nuestros resultados coinciden con los datos reportados por Muscarella et al. (2009) en muestras de alimentos para animales, que alcanzaron valores de 9,6% para AFB1, de 9,5% para AFB2, de 9,8% para AFG1 y 9,0% para AFG2, respectivamente. En el caso particular de aflatoxina M1, las RSDr% obtenidas están cercanas a las reportadas por Bellio et al. (2016) en muestras de leche, con valores de 9,7, 7,0 y 7,6% para concentraciones de 25, 50 y 75 ng/L, respectivamente.

### 5.2.5.3. Reproducibilidad intralaboratorio

La **reproducibilidad** se obtuvo calculando la desviación estándar relativa (RSD%) de 6 análisis de aflatoxinas, en muestras enriquecidas a tres niveles de concentración, analizadas en días distintos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 25.

**Tabla 25.** Precisión en condiciones de reproducibilidad (RSD<sub>R</sub>%) (n=6) para AFB1, B2, G1, G2 y M1.

Nivel ⇔	Raciones alimenticias (µg/kg)			Leche de vaca (ng/L)			Caldo YES (µg/L)
	2,5	5	10	25	50	100	10
<b>AFB1</b>	8,4	10,20	2,5	--	--	--	5,80
<b>AFB2</b>	11,0	10,02	3,1	--	--	--	13,71
<b>AFG1</b>	9,3	11,30	4,6	--	--	--	8,68
<b>AFG2</b>	12,6	12,87	3,8	--	--	--	9,91
<b>AFM1</b>	--	--	--	14,38	9,34	8,43	--

De acuerdo con la ecuación de Horwitz, señalada por el Reglamento (CE) nº 401/2006 para el cálculo de los valores aceptables de reproducibilidad ( $RSD_R\%$ ), éstos son 39%, 36% y 32% para las concentraciones de 2,5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas, respectivamente. Como señalamos en el estudio de la repetibilidad, a concentraciones tan bajas como las de aflatoxina M1, la ecuación de Horwitz no es aplicable, y simplemente los valores de  $RSD_R\%$  serán lo más bajos posible.

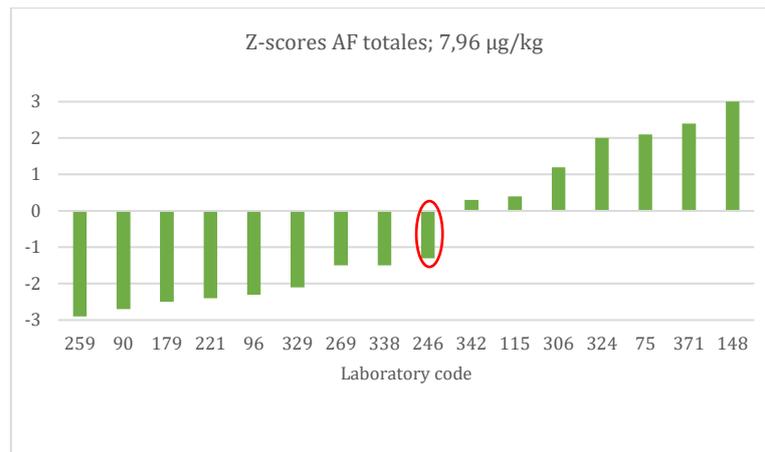
Todos nuestros resultados de reproducibilidad se consideraron satisfactorios según los criterios establecidos en el Reglamento (CE) nº 401/2006. Asimismo, los resultados obtenidos para este parámetro de precisión, son similares a los reportados por Chan et al. (2004); Saleemi et al. (2012) y Fu et al. (2008).

En resumen, todos los resultados del estudio de precisión intralaboratorio, mostraron la validez de los métodos analíticos para la determinación de aflatoxinas en las matrices investigadas en esta tesis doctoral.

#### ***5.2.6. Participación en un ejercicio de intercomparación***

Como aseguramiento externo de la validez de nuestros métodos analíticos, participamos en un **estudio de intercomparación** de aflatoxinas en maíz. A continuación, se muestran los resultados obtenidos por nuestro laboratorio, utilizando el MÉTODO #1.

En el análisis de aflatoxinas totales por HPLC, el *proficiency testing* (prueba de aptitud) obtuvo para nuestro laboratorio un Z-score de -1,3, con un valor asignado para la muestra de 7,96  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (nuestro resultado fue 5,68  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Figura 23).



**Figura 23.** Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AF totales de los diferentes participantes.

En la determinación de AFB<sub>1</sub>, el *proficiency testing* obtuvo para nuestro laboratorio un Z-score de -1,3 con un valor asignado de 7,03 µg/kg (nuestro resultado fue 4,95 µg/kg) (Figura 24).



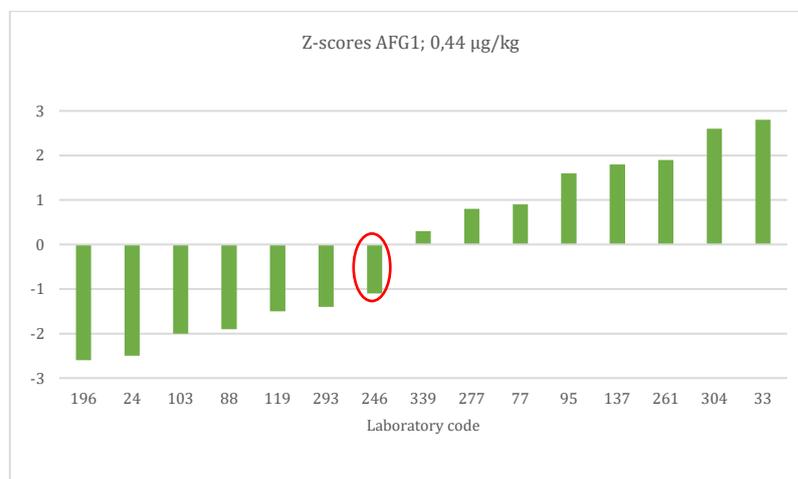
**Figura 24.** Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AFB<sub>1</sub> de los diferentes participantes.

En la determinación de AFB<sub>2</sub>, el *proficiency testing* obtuvo para nuestro laboratorio un Z-score de -1,0 con un valor asignado de 0,46 µg/kg (nuestro resultado fue 0,33 µg/kg) (Figura 25).



**Figura 25.** Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AFB2 de los diferentes participantes.

En la determinación de AFG1, el *proficiency testing* obtuvo para nuestro laboratorio un Z-score de -1,1 con un valor asignado de 0,44 µg/kg (y nuestro resultado fue 0,33 µg/kg (Figura 26).



**Figura 26.** Representación gráfica de los valores Z (Z-score) para AFG1 de los diferentes participantes.

En estos resultados podemos observar que los valores Z-score obtenidos por nuestro laboratorio para todas las aflatoxinas fueron inferiores al valor de referencia de 2, lo que indica que nuestros resultados son satisfactorios (valor  $Z \leq 2$ ), reflejando así que el método cromatográfico (HPLC-FLD) es adecuado para la cuantificación de aflatoxinas.

### **5.3. Aflatoxinas en raciones alimenticias completas y en leche cruda**

Los métodos validados se utilizaron para la determinación y cuantificación de aflatoxina B1 (AFB1) en 60 lotes de raciones completas de productos destinados a la alimentación del ganado vacuno lechero (MÉTODO #1), así como para la determinación y cuantificación de aflatoxina M1 (AFM1) en los 60 lotes correspondientes de leche cruda de vaca (MÉTODO #2), con objeto de evaluar la tasa de transferencia de aflatoxinas.

#### ***5.3.1. Aflatoxinas en raciones alimenticias completas***

En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de AFB1 en los 60 lotes de raciones completas para ganado, ordenados por tipo de producto (raciones unifeed n=38; pienso completo n=22) y estación del año en la que se realizó el muestreo (primavera n=35; invierno n=25). Las concentraciones de AFB1 se expresan calculadas sobre la base de un contenido de humedad del 12 %.

Los resultados individuales de todos los lotes, incluyendo además la provincia de origen (Burgos n=9; León n=9; Huesca n=6; Zaragoza n=36), se muestran en la Tabla 27. En esta tabla, las concentraciones de AFB1 se expresan calculadas sobre la base de un contenido de humedad del 12 % (como marca la legislación) y en materia seca, para facilitar el cálculo de la tasa de transferencia de aflatoxinas del alimento animal a la leche.

Como se indica en 4.7.1., para obtener la concentración de AFB1 en materia seca hay que dividir la concentración al 12% de humedad por el factor 0,88.

La prevalencia global de aflatoxina B1 fue del 55% (33 de 60 lotes), siendo mayor en pienso completo (19 lotes positivos, 86%) que en raciones unifeed (14 lotes positivos, 36,8%). La mayor incidencia de AFB1 en pienso completo podría ser debida a que contiene una mayor proporción de concentrado que el unifeed y, en segundo lugar, que en la fabricación del pienso compuesto se utilizan ingredientes importados de terceros países, como la semilla de algodón, que son muy susceptibles a la contaminación por aflatoxinas. En lo relativo a la estación de muestreo, la incidencia de aflatoxina B1 en muestras de primavera (57,1%) fue similar a la observada en los muestreos de invierno (52%), por lo que no se observó un efecto estacional.

La incidencia de aflatoxina B1 en las raciones completas de ganado se puede considerar alta, ya que alcanzó al 55% de las muestras. No obstante, este dato de incidencia está en el rango reportado para materias primas en las encuestas anuales de Biomin. Por comparación, las tasas de incidencia de aflatoxinas en materias primas del sur de Europa fueron del 55% de las muestras en el año 2014 y del 16% en el año 2018, lo que indica una gran variación interanual sujeta a los cambios climáticos.

La concentración media  $\pm$  desviación estándar de aflatoxina B1 en los 60 lotes de alimentos para ganado fue de  $0,61 \pm 1,14$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  (sobre 12% humedad). Respecto de las explotaciones de procedencia, las muestras originarias de la provincia de León mostraron unas tasas de aflatoxina B1 ( $1,84 \pm 2,26$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) significativamente superiores al resto de provincias ( $0,39 \pm 0,64$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (ANOVA  $p=0,0003$ ).

La concentración de AFB1 fue significativamente mayor en pienso completo ( $0,99 \pm 1,56$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) que en raciones unifeed ( $0,39 \pm 0,75$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (ANOVA  $p=0,0475$ ). En coherencia

con lo apuntado al discutir la alta incidencia de aflatoxinas en pienso completo, la mayor concentración de aflatoxina B1 de los piensos puede deberse a alguno de los ingredientes utilizados en su fabricación, como la semilla de algodón que no estaba presente en las raciones unifeed. En la revisión de van der Fels-Klerx et al. (2018) sobre ingredientes utilizados en alimentación animal, se señalan varias categorías de riesgo en lo atinente a aflatoxinas, adjudicando el mayor riesgo a cacahuetes, maíz y oleaginosas. En España, prácticamente no se utiliza el cacahuete para la fabricación de piensos compuestos, pero tanto el maíz y sus derivados, como la semilla de algodón, son ingredientes habituales (MAPA, 2018). Nuestros resultados coinciden con una investigación realizada en Etiopía sobre las tasas de AFB1 en raciones para ganado lechero (n=160) (Mesfin et al., 2018). La incidencia fue del 50% y los productos concentrados estaban más contaminados ( $7,67 \pm 0,80$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) que los forrajes ( $0,41 \pm 0,14$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

**Tabla 26.** Estudio descriptivo de los valores de aflatoxina B1 en raciones completas, calculados sobre la base de un contenido de humedad del 12 %.

<b>Aflatoxina B1 (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>n</b>	<b>Positividad</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>Máximo</b>
• <b>Total de muestras</b>	60	55%	$0,61 \pm 1,14$	5,17
• <b>Ración unifeed</b>	38	36,8%	$0,39 \pm 0,75$	2,75
• <b>Pienso completo</b>	22	86%	$0,99 \pm 1,56$	5,17
• <b>Primavera</b>	35	57,1%	$0,53 \pm 0,89$	3,29
• <b>Invierno</b>	25	52%	$0,73 \pm 1,43$	5,17

Asimismo, la concentración media de aflatoxina B1 en nuestras muestras de invierno ( $0,73 \pm 1,43 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), fue superior a la encontrada en los muestreos de primavera ( $0,53 \pm 0,89 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), aunque dicha diferencia no se confirmó estadísticamente (ANOVA  $p=0,4967$ ). En general, las raciones alimenticias de invierno contienen más proporción de concentrado a base de harina de maíz y de soja, mientras que en primavera se introduce mayor cantidad de ensilados de raigrás, alfalfa y paja de cereales. Se sabe que los climas cálidos son favorables para el crecimiento de los mohos aflatoxigénicos, sin embargo, no todos los estudios están de acuerdo con respecto a la influencia estacional sobre las tasas de aflatoxinas en productos para alimentación animal.

Así, Hernández y Navarro (2015) analizaron las tasas de aflatoxina B1 en 78 muestras de raciones de vacas lecheras en Navarra y señalaron la primavera como la estación con el nivel más alto de aflatoxina B1 en las raciones ( $0,086 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), seguido de invierno ( $0,075 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), verano ( $0,030 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) y otoño ( $0,017 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), lo cual difiere de nuestros resultados.

Del total de 60 lotes analizados en nuestro estudio, únicamente 2 lotes (3,3%) superaron el contenido máximo de aflatoxina B1 en piensos compuestos para vacas lecheras, establecido en  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ . En ambos casos se trataba de piensos completos con concentraciones de aflatoxina B1 de  $5,10$  y  $5,17 \mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Asimismo, estos dos lotes procedían de la provincia de León y coincidían con muestreos realizados en invierno (Tabla 27). A pesar de que dichos lotes superaban el contenido máximo establecido para AFB1, las vacas que los consumieron produjeron una leche que no superó el contenido máximo de aflatoxina M1.

**Tabla 27.** Concentración de aflatoxina B1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en los 60 lotes de productos destinados a la alimentación animal, expresada sobre 12% de humedad y en materia seca.

Lote	Tipo	Provincia	Estación	AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) [12% humedad]	AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) [Materia seca]
1	Unifeed	Burgos	Primavera	2,72	3,09
2	Unifeed	Burgos	Primavera	0,53	0,60
3	Unifeed	Burgos	Primavera	<LOD	<LOD
4	Unifeed	Burgos	Primavera	<LOD	<LOD
5	Unifeed	Burgos	Primavera	<LOD	<LOD
6	Unifeed	León	Primavera	<LOD	<LOD
7	Unifeed	León	Primavera	2,75	3,12
8	Unifeed	León	Primavera	<LOD	<LOD
9	Unifeed	León	Primavera	0,26	0,29
10	Unifeed	León	Primavera	<LOD	<LOD
11	Unifeed	Huesca	Primavera	2,18	2,48
12	Unifeed	Huesca	Primavera	1,37	1,56
13	Unifeed	Huesca	Primavera	<LOD	<LOD
14	Unifeed	Huesca	Primavera	0,55	0,62
15	Unifeed	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
16	Unifeed	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
17	Unifeed	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
18	Unifeed	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
19	Unifeed	Zaragoza	Primavera	1,53	1,74
20	Unifeed	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
21	Unifeed	Zaragoza	Primavera	0,16	0,18
22	Unifeed	Zaragoza	Primavera	0,70	0,79
23	Unifeed	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
24	Unifeed	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
25	Unifeed	Burgos	Invierno	0,26	0,29
26	Unifeed	Burgos	Invierno	<LOD	<LOD
27	Unifeed	Burgos	Invierno	<LOD	<LOD
28	Unifeed	Burgos	Invierno	0,48	0,55
29	Unifeed	Huesca	Invierno	<LOD	<LOD
30	Unifeed	Zaragoza	Invierno	<LOD	<LOD
31	Unifeed	Zaragoza	Invierno	<LOD	<LOD
32	Unifeed	Zaragoza	Invierno	<LOD	<LOD
33	Unifeed	Zaragoza	Invierno	<LOD	<LOD
34	Unifeed	Zaragoza	Invierno	1,21	1,37
35	Unifeed	Zaragoza	Invierno	<LOD	<LOD
36	Unifeed	Zaragoza	Invierno	<LOD	<LOD
37	Unifeed	Zaragoza	Invierno	0,14	0,16
38	Unifeed	Zaragoza	Invierno	<LOD	<LOD

LOD = límite de detección de AFB1 (0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

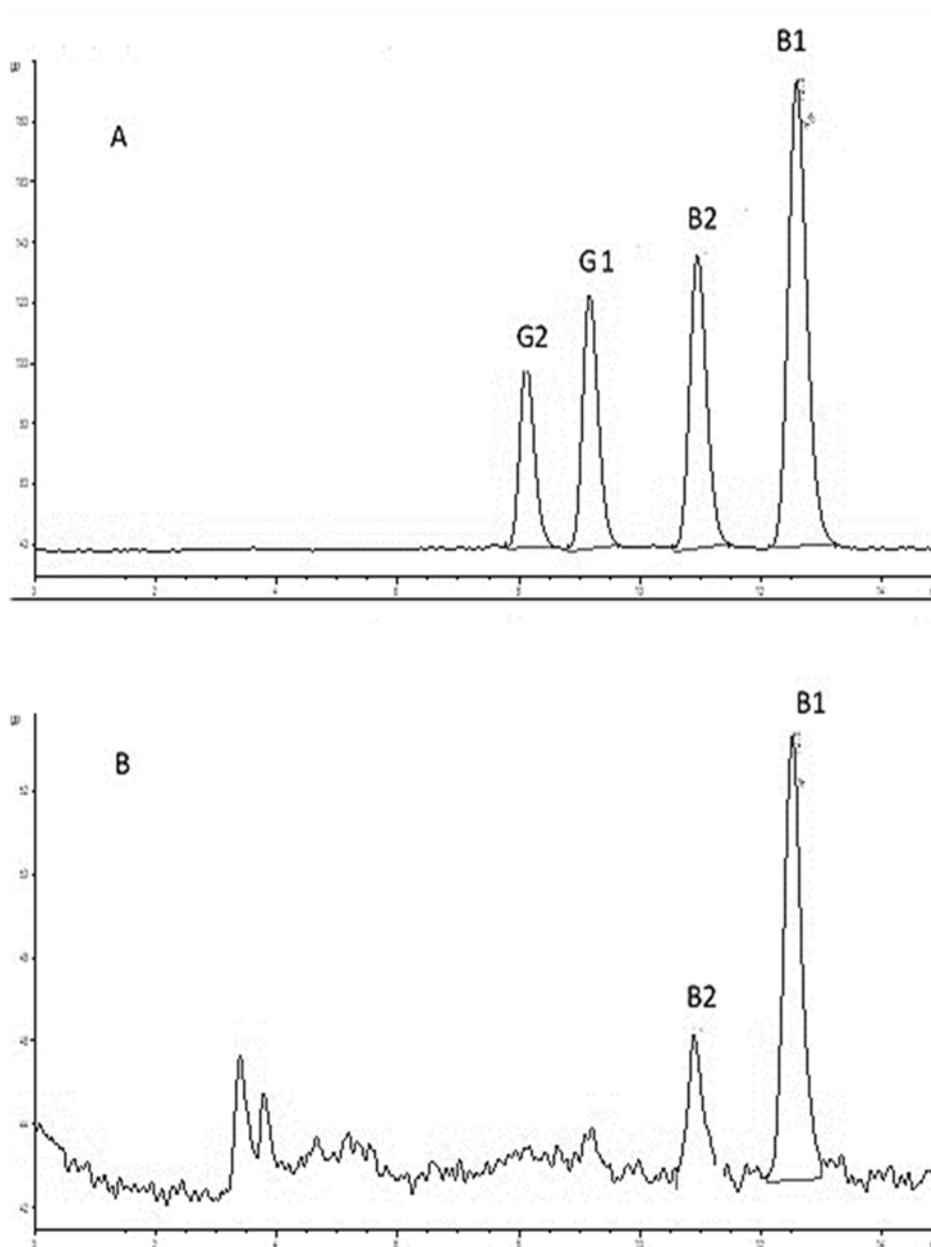
**Tabla 27 (cont.).** Concentración de aflatoxina B1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en los 60 lotes de productos destinados a la alimentación animal, expresada sobre 12% de humedad y en materia seca.

Lote	Tipo	Provincia	Estación	AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) [12% humedad]	AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) [Materia seca]
39	Pienso	León	Primavera	3,29	3,74
40	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,07	0,08
41	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,13	0,15
42	Pienso	Zaragoza	Primavera	<LOD	<LOD
43	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,12	0,14
44	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,24	0,27
45	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,19	0,22
46	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,73	0,83
47	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,49	0,56
48	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,15	0,17
49	Pienso	Zaragoza	Primavera	0,26	0,29
50	Pienso	León	Invierno	5,17	5,87
51	Pienso	León	Invierno	5,10	5,80
52	Pienso	León	Invierno	<LOD	<LOD
53	Pienso	Huesca	Invierno	<LOD	<LOD
54	Pienso	Zaragoza	Invierno	0,77	0,88
55	Pienso	Zaragoza	Invierno	0,17	0,19
56	Pienso	Zaragoza	Invierno	1,32	1,50
57	Pienso	Zaragoza	Invierno	1,32	1,50
58	Pienso	Zaragoza	Invierno	2,02	2,30
59	Pienso	Zaragoza	Invierno	0,17	0,19
60	Pienso	Zaragoza	Invierno	0,17	0,19

LOD = límite de detección de AFB1 (0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Concentración de AFB1 por encima del contenido máximo permitido (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

A continuación, en la Figura 27 se muestran cromatogramas representativos de una mezcla de estándares de aflatoxinas y de una muestra de pienso completo contaminada por aflatoxinas (5,17  $\mu\text{g}$  de aflatoxina B1/kg).



**Figura 27.** Cromatogramas de: (A) mezcla patrón de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2; (B) alimento para ganado contaminado con aflatoxinas B1 y B2.

Dentro de los esfuerzos para controlar la contaminación por micotoxinas en alimentación animal, se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la incidencia de la contaminación por micotoxinas en los piensos y las materias primas de los piensos.

En Navarra, Hernández y Navarro (2015) analizaron las tasas de aflatoxina B1 en 78 muestras de raciones de vacas lecheras procedentes de 40 granjas, utilizando HPLC-FLD y derivatización post-columna. Aunque la incidencia fue muy elevada (74% positividad), las tasas de contaminación fueron un orden de magnitud más bajas que las encontradas en nuestro estudio. A diferencia de nuestros resultados, las raciones unifeed mostraron mayores tasas de contaminación por AFB1 (0,072 µg/kg) que las raciones basadas en piensos compuestos (0,039 µg/kg), aunque ninguna de las muestras superó el contenido máximo establecido.

La incidencia de aflatoxina B1 en nuestro estudio, está en línea con los valores reportados en las encuestas anuales de productos destinados a la alimentación animal, realizadas por la empresa de alimentación animal Biomin (disponibles en <https://www.biomin.net>). Estas encuestas muestran una variabilidad interanual debida principalmente a factores relacionados con el clima. En la encuesta del año 2015 se analizaron 8271 muestras procedentes de 75 países y la prevalencia global de AFB1 fue del 18%. La positividad global a AFB1 en Europa fue del 11% (n=1163 muestras), con promedio de 6 µg/kg y máximo de 153 µg/kg. Por zonas de Europa, la incidencia fue en el sur (21%), centro (2%), este (24%) y norte (0%). A nivel global, la incidencia de AFB1 por tipo de producto fue: ensilado de maíz (24%), soja (24%), piensos compuestos (20%), granos destilados secos (20%) y maíz grano (13%).

En la encuesta Biomin del año 2016, la prevalencia global de AFB1 fue del 25%. La positividad a AFB1 en Europa fue del 13% (n=326 muestras), con promedio de 4 µg/kg y máximo de 18 µg/kg. Por zonas de Europa, la incidencia de AFB1 fue en el sur (26%), centro (11%), este (3%) y norte (0%). A nivel global, la incidencia de AFB1 por tipo de producto fue: ensilado de maíz (5%), soja (28%), piensos compuestos (22%), granos destilados secos

(35%) y maíz grano (25%). Finalmente, en la encuesta Biomin del año 2017, la incidencia de AFB1 en Europa fue del 22% (sur), 23% (centro), 4% (este) y 0% (norte), mientras que por tipo de producto fue de 10% en piensos compuestos y 22% en maíz grano (22%).

En Europa, en lo que respecta a la alimentación animal, se encuentra un nivel bajo de contaminación por micotoxinas en más del 50% de las muestras, aunque no es frecuente encontrar muestras con concentraciones por encima de los límites máximos establecidos (Streit et al., 2012). Rodrigues y Naehrer (2012) estudiaron la prevalencia de aflatoxinas en 169 muestras europeas, con 15% de positividad y un valor máximo de 106 µg/kg. Griesler et al. (2010), analizaron 127 muestras procedentes del sur de Europa, encontrando una positividad para aflatoxinas del 25%, con una concentración máxima de 66 µg/kg.

En Portugal, Martins et al. (2007) realizaron un amplio estudio en el que analizaron 1.001 muestras de piensos compuestos para ganado lechero. En el 37% de éstas se detectó aflatoxina B1. El 6,2% de las muestras analizadas superó, además, el contenido máximo permitido de aflatoxina B1 en piensos para ganado lechero en la UE, establecido en 5 µg/kg, cuyos valores oscilaron entre 5,1 y un máximo de 74 µg/kg. Un estudio posterior sobre 1.936 muestras, mostró una positividad a aflatoxina B1 de 26%, con una concentración máxima de 80 µg/kg (Martins et al., 2008).

En Rumania, en una investigación sobre 86 muestras de cereales para alimentación animal, la positividad a aflatoxina B1 fue del 38%, con un valor máximo de 52 µg/kg (Tabuc et al., 2011). En Polonia, en una investigación sobre 319 muestras de alimentos para animales, la positividad a aflatoxina B1 fue del 9,4%, con un valor máximo de 0,6 µg/kg (Grajewski et al., 2012). En Grecia, en una investigación sobre 183 muestras, la positividad a aflatoxina B1 fue del 4%, con un valor máximo de 90 µg/kg (Vlachou et al., 2011).

Los patrones de incidencia de micotoxinas están cambiando como consecuencia del aumento de las temperaturas promedio debido al cambio climático, lo que afecta especialmente a países del sur de Europa (Battilani et al., 2016; Medina et al., 2015; Wielogórska et al., 2016). Binder et al. (2007) reportaron niveles máximos de AFB1 en muestras destinadas a la alimentación animal provenientes del norte de Europa (60 µg/kg), Europa Central (311 µg/kg), y sur de Europa (656 µg/kg), indicando una asociación entre el clima y la presencia de aflatoxina B1. Asimismo, investigadores italianos detectaron AFB1 en la alimentación del ganado y AFM1 en la leche de vaca por encima del contenido máximo permitido en la UE, en 8,1% y en 1,7% de muestras, respectivamente, lo que asociaron con un año climático especialmente cálido (Decastelli et al., 2007).

En Serbia durante 2013, se examinaron 281 muestras de mezclas completas de alimento para vacas lecheras, 67 muestras (23,8%) contenían AFB1 por encima del límite máximo. El ingrediente causante de la contaminación era el grano de maíz utilizado como concentrado en forma de harina. También se han publicado altas frecuencias de aflatoxinas en maíz para consumo animal en Croacia, cuando el 38% de las 633 muestras de maíz analizadas estaban contaminadas con aflatoxinas, con un valor medio muy elevado de 81 µg/kg (Pleadin et al., 2014).

Los resultados de las encuestas de piensos realizadas en Europa también resaltan el problema de los altos niveles de co-contaminación con varias micotoxinas diferentes (Zachariasova et al., 2014). En el estudio antes citado de Griessler et al. (2010), las micotoxinas de *Fusarium* fueron los principales contaminantes, mientras que aflatoxinas y ocratoxina A se detectaron con menos frecuencia. Se informó además que el 23% de las muestras procedentes de España contenían al menos dos micotoxinas.

También se han publicado estudios realizados en otras partes del mundo. En este sentido, los niveles de aflatoxina B1 en nuestras muestras son comparables a los encontrados en Brasil por Simas et al. (2007), con un rango de 1 a 3 µg/kg en raciones de vacuno lechero. En China, Han et al. (2013) analizaron 200 muestras de raciones alimenticias para vacas lecheras, encontrando una incidencia de aflatoxina B1 del 11,5%, con niveles de aflatoxina B1 en un rango de 0,05–3,53 µg/kg. En general, nuestros resultados están de acuerdo con la presencia global de aflatoxina B1 en productos destinados a la alimentación de ganado vacuno lechero (Van Eijkeren et al., 2006).

### **5.3.2. Aflatoxinas en leche cruda de vaca**

Paralelamente, se analizó la presencia y concentración de aflatoxina M1 en los 60 lotes de leche cruda de vaca, que se correspondían con los lotes analizados de raciones completas para ganado. En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de AFM1 en los 60 lotes de leche cruda de vaca, ordenados por tipo de alimentación del ganado (raciones unifeed n=38; pienso completo n=22) y estación del año en la que se realizó el ordeño (primavera n=35; invierno n=25). Los resultados individuales de las muestras de leche se muestran en la Tabla 29.

La incidencia global de aflatoxina M1 fue del 38,3% (23 de 60 lotes), siendo mayor en leche procedente de vacas alimentadas con pienso completo (12 lotes positivos, 54,5%) que en las alimentadas con raciones unifeed (11 lotes positivos, 28,9%) (Tabla 28). En lo relativo a la estación de muestreo, la incidencia de aflatoxina M1 en muestras de primavera (40%) fue similar a la observada en las muestras de invierno (36%).

La concentración media  $\pm$  desviación estándar de aflatoxina M1 en los 60 lotes de leche cruda de vaca fue de 12,6  $\pm$  19,1 ng/kg, siendo mayor en leche procedente de vacas

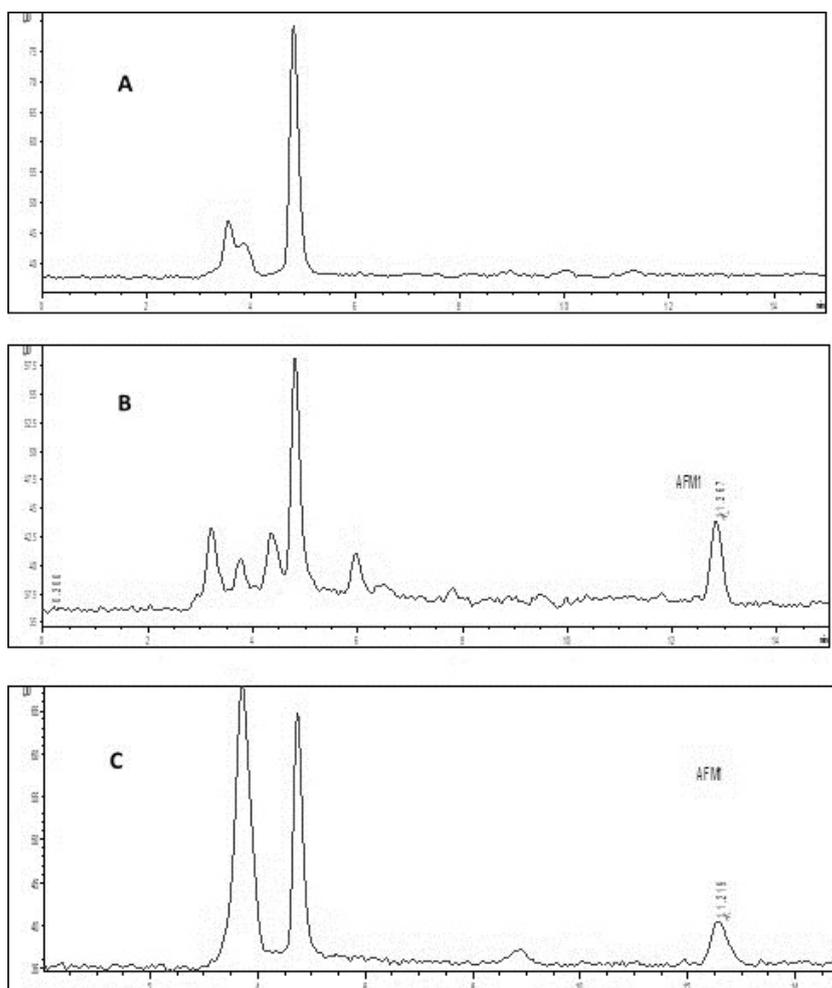
alimentadas con pienso completo ( $18,8 \pm 21,8$  ng/kg) que en las alimentadas con raciones unifeed ( $9,00 \pm 16,6$  ng/kg), aunque dicha diferencia no se pudo confirmar estadísticamente (ANOVA  $p=0,0537$ ). Recordemos que los piensos compuestos para vacuno lechero pueden contener semilla de algodón. Díaz y Espitia (2006) informaron que se produjeron lotes de leche contaminada con aflatoxina M1 en vacas alimentadas con subproductos de maíz o harina de semilla de algodón. También se ha observado una variación estacional de la contaminación por AFM1 de la leche, con un incremento de la micotoxina durante el periodo invernal vinculado directamente con el incremento de pienso en la dieta del animal (Prandini et al., 2009).

**Tabla 28.** Estudio descriptivo de los valores de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca.

<b>Aflatoxina M1 (ng/kg)</b>	<b>n</b>	<b>Positividad</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>Máximo</b>
• <b>Total de muestras</b>	60	38,3%	$12,6 \pm 19,1$	67,2
• <b>Ración unifeed</b>	38	28,9%	$9,00 \pm 16,6$	58,1
• <b>Pienso completo</b>	22	54,5%	$18,8 \pm 21,8$	67,2
• <b>Primavera</b>	35	40%	$15,3 \pm 22,3$	67,2
• <b>Invierno</b>	25	36%	$8,8 \pm 12,8$	42,1

La procedencia de las muestras de leche no fue un factor determinante, ya que no hubo diferencias entre provincias (ANOVA  $p=0,509$ ). Asimismo, la concentración media de aflatoxina M1 en las muestras de primavera ( $15,3 \pm 22,3$  ng/kg), fue superior a la encontrada en los muestreos de invierno ( $8,8 \pm 12,8$  ng/kg), aunque sin confirmación estadística (ANOVA  $p=0,1948$ ).

Del total de 60 lotes de leche analizados, 5 lotes (8,3%) superaron el contenido máximo de aflatoxina M1 en leche cruda, establecido en 50 ng/kg (Tabla 29). Tres de estos lotes, con concentraciones de AFM1 de 67,2, 66,1 y 50,2 ng/kg, correspondían a leche de vacas alimentadas con pienso, mientras que los otros dos lotes de leche (58,1 y 54,7 ng/kg) procedían de vacas alimentadas con raciones unifeed. Cabe destacar que los 5 lotes de leche cuyos niveles de aflatoxina M1 superaron el contenido máximo establecido, coincidían con muestreos de primavera; cuatro de ellos eran originarios de la provincia de Zaragoza y uno de León. En la Figura 28 aparecen cromatogramas representativos de muestras de leche negativa y positiva, así como de una solución patrón de aflatoxina M1.



**Figura 28.** Cromatogramas de: (A) muestra negativa de leche de vaca; (B) solución patrón de AFM1 a 75 ng/kg; (C) leche de vaca contaminada con AFM1 a 50,2 ng/kg.

**Tabla 29.** Concentración de aflatoxina M1 (ng/kg) en los 60 lotes de leche cruda de vaca y tasa de transferencia de aflatoxinas del alimento del ganado a la leche.

Lote	Alimento	Estación	AFM1 (ng/kg)	AFB1 (µg/kg) [Materia seca]	Tasa (%) transferencia
1	Unifeed	Primavera	30,01	3,09	1,6
2	Unifeed	Primavera	13,13	0,60	3,5
3	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
4	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
5	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
6	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
7	Unifeed	Primavera	54,67	3,12	2,8
8	Unifeed	Primavera	11,71	<LOD	0
9	Unifeed	Primavera	<LOD	0,29	0
10	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
11	Unifeed	Primavera	35,76	2,48	2,3
12	Unifeed	Primavera	22,00	1,56	2,3
13	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
14	Unifeed	Primavera	<LOD	0,62	0
15	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
16	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
17	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
18	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
19	Unifeed	Primavera	39,37	1,74	3,6
20	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
21	Unifeed	Primavera	40,53	0,18	36
22	Unifeed	Primavera	58,11	0,79	11,8
23	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
24	Unifeed	Primavera	<LOD	<LOD	0
25	Unifeed	Invierno	<LOD	0,29	0
26	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
27	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
28	Unifeed	Invierno	<LOD	0,55	0
29	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
30	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
31	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
32	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
33	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
34	Unifeed	Invierno	21,32	1,37	2,5
35	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
36	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0
37	Unifeed	Invierno	15,41	0,16	15,4
38	Unifeed	Invierno	<LOD	<LOD	0

LOD = límite de detección de AFM1 (8 ng/kg) y de AFB1 (0,03 µg/kg)

Concentración de AFM1 por encima del contenido máximo permitido (50 ng/kg)

**Tabla 29 (cont.).** Concentración de aflatoxina M1 (ng/kg) en los 60 lotes de leche cruda de vaca y tasa de transferencia de aflatoxinas del alimento del ganado a la leche.

Lote	Alimento	Estación	AFM1 (ng/kg)	AFB1 (µg/kg) [Materia seca]	Tasa (%) transferencia
39	Pienso	Primavera	20,05	3,74	0,9
40	Pienso	Primavera	0	0,08	0
41	Pienso	Primavera	0	0,15	0
42	Pienso	Primavera	0	0	0
43	Pienso	Primavera	0	0,14	0
44	Pienso	Primavera	50,17	0,27	29,7
45	Pienso	Primavera	27,14	0,22	19,7
46	Pienso	Primavera	66,05	0,83	12,7
47	Pienso	Primavera	67,15	0,56	19,2
48	Pienso	Primavera	0	0,17	0
49	Pienso	Primavera	0	0,29	0
50	Pienso	Invierno	42,13	5,87	1,2
51	Pienso	Invierno	27,53	5,80	0,8
52	Pienso	Invierno	0	0	0
53	Pienso	Invierno	0	0	0
54	Pienso	Invierno	24,04	0,88	4,4
55	Pienso	Invierno	0	0,19	0
56	Pienso	Invierno	18,53	1,50	2
57	Pienso	Invierno	29,41	1,50	3,1
58	Pienso	Invierno	22,27	2,30	1,6
59	Pienso	Invierno	0	0,19	0
60	Pienso	Invierno	19,49	0,19	16,4

LOD = límite de detección de AFM1 (8 ng/kg) y de AFB1 (0,03 µg/kg)

Concentración de AFM1 por encima del contenido máximo permitido (50 ng/kg)

Además de estas 60 muestras de leche para el estudio de transferencia de aflatoxinas, se analizaron adicionalmente otras 20 muestras de leche cruda de vaca para completar los datos de incidencia de aflatoxina M1. Estas muestras fueron tomadas de explotaciones de vacuno lechero de Burgos (n=1), León (n=1), Huesca (n=5) y Zaragoza (n=13), en las estaciones de primavera (n=12) e invierno (n=8).

La aflatoxina M1 fue detectada en 4 de las 20 muestras (20%), con una concentración media de  $6,9 \pm 16,0$  ng/kg y un valor máximo de 52,6 ng/kg. La contaminación de esta muestra de leche cuyo contenido de aflatoxina M1 era superior al límite legal de 50 ng/kg, fue causada, probablemente, por la presencia de semillas de algodón contaminadas con

aflatoxina B1 en el pienso comercial de lactación utilizado para elaborar las raciones alimenticias de las vacas.

En este caso, el problema fue corregido en la propia granja con la retirada del lote de pienso compuesto contaminado, el cambio de alimentación y la adición del adsorbente Mycotrax (NutralSCA, de Cargill) en la dieta de las vacas; dicho adsorbente es de tipo mixto porque está compuesto por aluminosilicatos, beta-glucanos y cultivos de levaduras. La dosis añadida a la ración completa de las vacas fue de 0,1% (1 kg/Tm), con lo que las vacas dejaron de eliminar aflatoxina M1 en leche al cabo de tres días.

Considerando el total de 80 muestras de leche (60 del estudio de transferencia más las 20 muestras adicionales), la incidencia global de aflatoxina M1 fue del 33,8% (27 muestras positivas), con un rango de 11,2 a 67,2 ng/kg y un valor medio de  $11,2 \pm 18,4$  ng/kg. Seis muestras (7,5%) superaron el contenido máximo establecido en 50 ng/kg, correspondiendo todas ellas a muestreos de primavera.

Hay varios estudios disponibles realizados en España sobre la contaminación por aflatoxina M1 en leche. Rodríguez et al. (2003), analizaron 92 muestras de leche cruda de vaca recolectada en granjas lecheras de la provincia de León. La positividad a AFM1 fue del 3,3% (3 muestras), la décima parte de la encontrada en nuestro estudio; las concentraciones estuvieron en el rango de 10 a 50 ng/kg, por lo que ninguna muestra superó el contenido máximo permitido por la legislación de la Unión Europea.

En Navarra, Gómez-Arranz (2008) analizó las tasas de aflatoxina M1 en 477 muestras de leche de vaca a lo largo de un año, como trabajo de tesis doctoral. Las tasas de contaminación fueron similares a las encontradas en nuestro estudio. Asimismo, el efecto estacional también señaló la primavera como la estación con el nivel medio más alto de aflatoxina M1 en la leche (11 ng/kg), seguido de invierno (7 ng/kg) y verano (3 ng/kg); no

se detectó aflatoxina M1 en las muestras de otoño. Considerando el tipo de alimentación, las vacas alimentadas con raciones unifeed mostraron mayores tasas de AFM1 en leche (7 ng/kg) que las alimentadas con piensos compuestos (4 ng/kg), lo cual difiere de nuestros resultados.

En Cataluña, Cano-Sancho et al. (2010) detectaron aflatoxina M1 en 68 de 72 muestras de leche UHT (94,4%), con un valor máximo de 14 ng/kg. La alta incidencia de AFM1 es un motivo de preocupación ya que la leche es un alimento básico de la dieta recomendado para todas las edades, y especialmente en niños y adolescentes.

Desde el año 2013, en Andalucía se ha incorporado el control de la presencia de aflatoxina M1 en la leche a lo largo de las fases de producción del sector lácteo, a través de programas de control desarrollados por las Consejerías competentes en materia de Agricultura y Salud pública. Hay algunos datos que apuntan al aumento de la incidencia de aflatoxina M1 en leche, especialmente en años calurosos y secos en los que las raciones del ganado (especialmente maíz y derivados) pueden contener tasas elevadas de aflatoxina B1. En el año 2016 se registraron 56 casos positivos a AFM1 en leche, mientras que en el año 2017 se produjeron 16 casos, localizados fundamentalmente en las provincias de Cádiz, Sevilla y Córdoba (Junta de Andalucía, 2018).

La incidencia de AFM1 se ha informado en varios lugares del mundo, y muchos de los estudios expresaron su preocupación por los niveles de contaminación de AFM1 por encima del nivel máximo establecido por la legislación de la Unión Europea (UE) (0,05 µg/kg), aunque los niveles de AFM1 a menudo no sobrepasan el nivel máximo establecido por la FDA en los EE. UU. (0,50 µg/kg). Los datos recopilados de los estudios realizados en los últimos años, evidencian que la incidencia de AFM1 en muestras de leche es relativamente baja en los países europeos, mientras que en los estudios en países asiáticos se observa que la

frecuencia de aparición de AFM1 puede alcanzar el 100% de las muestras (Becker-Algeri et al., 2016).

Flores-Flores et al. (2015), han revisado la presencia de AFM1 en leche de vaca de varias partes del mundo. De las 22.189 muestras de leche analizadas que se tuvieron en cuenta en dicha revisión, al menos el 9,8% de ellas (2.190 muestras) superaron el contenido máximo de AFM1 establecido por la UE. En lo que respecta al número de muestras no conformes por continente, 1.709 procedían de Asia, 253 de África, 119 de Europa y 109 de América.

La contaminación por AFM1 en leche y productos lácteos muestra variaciones según la región geográfica, la temporada, las condiciones ambientales, la diversidad de los sistemas agrícolas, la disponibilidad de forraje verde y el consumo de concentrados de piensos, entre otros (Becker-Algeri et al., 2016). En China, Xiong et al. (2013) evaluaron la contaminación de la leche cruda durante diferentes estaciones y encontraron que la presencia de AFM1 fue significativamente mayor durante el invierno (123 ng/kg), en comparación con las estaciones restantes, primavera 29 ng/kg, verano 32 ng/kg y otoño 32 ng/kg. En Croacia, Bilandžić et al. (2010) también verificaron la distribución de la concentración de AFM1 en la leche durante las diferentes estaciones y encontraron que la concentración fue estadísticamente mayor entre enero y abril (0,036 a 0,059 µg/kg) que entre junio y septiembre (0,012 a 0,015 µg/kg).

En el estudio de Bilandžić et al. (2016) realizado en países de Europa del este, se analizaron muestras de leche de vaca UHT, que mostraron unas tasas de positividad (36%) comparables a las nuestras y una concentración de aflatoxina M1 que incluso, en un caso, llegó a duplicar los límites legales.

En el estudio de Zinedine et al. (2007) sobre 54 muestras de leche de vaca de Marruecos, la incidencia de aflatoxina M1 fue del 88,8%, con una tasa media de contaminación de 18 ng/kg y 4 muestras por encima del contenido máximo UE.

En algunos estudios, se ha informado un efecto estacional de la concentración de aflatoxina M1, en el que se observó una mayor concentración de AFM1 en temporadas frías que en temporadas cálidas, porque los agricultores tienden a usar mayores cantidades de piensos compuestos en invierno (Mohammadi, 2011). En otras palabras, los animales consumen alimentos menos concentrados en verano porque también se alimentan de pasto. Varios estudios coinciden en que la leche de animales alimentados por pastoreo presenta niveles más bajos de AFM1 en comparación con la leche de animales alimentados con piensos compuestos y productos almacenados. En el estudio de Çeçen (2009), se mostró que el pastoreo tiene un efecto importante en la disminución de AFM1 en la leche. Se investigaron 30 muestras de leche de animales estabulados alimentados en granja, frente a 31 muestras procedentes de animales de pastoreo. Se encontró que solo una muestra de leche de animales de pastoreo tenía AFM1 (3,22%), mientras que 23 muestras de animales que se alimentaban en los establos (76,66%) tenían AFM1. Por tanto, el tipo de alimentos consumidos (concentrados, forrajes, pastos), puede estar detrás del efecto estacional observado en la incidencia y concentración de AFM1 en la leche de vaca.

Finalmente, con nuestros resultados de contaminación, podemos calcular la ingesta diaria estimada de aflatoxina M1 por un adulto medio en España. Considerando un consumo anual de leche líquida de 70 kg por persona (MAPA, 2019), derivamos un consumo diario de leche de 192 g por persona. La media de contaminación calculada a partir de nuestras 80 es de 11,2 ng AFM1 por kg de leche, lo que implica una ingesta de AFM1 de 2,15 ng/día (0,034 ng/kg peso corporal/día). Al tratarse de un agente genotóxico cancerígeno, no se han

establecido ingestas diarias admisibles para ninguna de las aflatoxinas. No obstante, para estudios de exposición dietética a aflatoxina M1 se han sugerido valores de seguridad de 2 ng/kg peso corporal/día (Gimeno y Martins, 2003) o de 1 ng/kg peso corporal/día (Leblanc et al., 2005; Cano-Sancho et al., 2010). El peso corporal de referencia de los europeos de ambos sexos, mayores de 18 años, se ha establecido en 63,3 kg (EFSA, 2013).

Por lo tanto, la ingesta diaria estimada de aflatoxina M1 a partir de la leche líquida se situaría entre 1,7% y 3,4% del valor de seguridad de 1 ó 2 ng/kg de peso corporal/día. No obstante, hay que tener en cuenta que no se ha incluido el consumo de productos lácteos (queso, yogur, nata, mantequilla), que en conjunto asciende a 30-35 kg/persona/año. Como comparación, en Cataluña se ha calculado la ingesta diaria de aflatoxina M1 por la población adulta en 0,039 ng/kg peso corporal/día (Cano-Sancho et al., 2010), valor muy similar al derivado de nuestro estudio (0,034 ng/kg peso corporal/día).

Adicionalmente, la leche es un ingrediente habitual de alimentos infantiles. En España, Beltrán et al. (2011) han detectado aflatoxina M1 en muestras comerciales de alimentos infantiles (cereales y leche), aunque por debajo del contenido máximo permitido en preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación, que está fijado en 25 ng de aflatoxina M1/kg.

#### **5.4. Tasa de transferencia de aflatoxinas de las raciones completas a la leche**

Para el cálculo de la tasa de transferencia de aflatoxinas desde las raciones del ganado (AFB1 en µg/kg materia seca), a la leche correspondiente (AFM1), se utilizaron los datos apareados de los 60 lotes de raciones completas y los 60 lotes correspondientes de leche cruda, muestreados en las 18 explotaciones de vacuno lechero (Tabla 30).

La tasa de transferencia de aflatoxinas se calculó sobre la base de un consumo medio de materia seca de 25 kg/animal/día y una producción de leche de 40 litros/animal/día. Estos datos de consumo de materia seca y de producción de leche fueron obtenidos de las explotaciones investigadas, y se corresponden con valores medios actuales para vacas de alta producción lechera en toda Europa.

Para el cálculo de la tasa de transferencia de aflatoxinas se utilizó la fórmula:

$$\text{Tasa (\%) de transferencia} = \frac{\left( \frac{[\text{ng AFM1 por kg de leche}] \times 40}{1000} \right) \times 100}{[\mu\text{g AFB1 por kg de materia seca alimento}] \times 25}$$

o abreviadamente:

$$\text{Tasa (\%) de transferencia} = \frac{\text{ng AFM1 por kg de leche} \times 4}{\mu\text{g AFB1 por kg de materia seca} \times 25}$$

Supóngase una ración completa contaminada con aflatoxina B1 al nivel máximo permitido de 5 µg/kg (equivalente a 5,68 µg/kg materia seca), que se suministra a vacas de alta producción, cuya tasa de aflatoxina M1 en leche es el máximo permitido de 50 ng/kg. En este supuesto, la tasa de transferencia de aflatoxinas sería de 1,4%.

Del análisis de nuestros resultados, se deriva que la tasa global de transferencia de aflatoxinas en los 60 lotes apareados de raciones completas y de leche fue del 3,2% (Tabla 30), siendo mayor en las vacas alimentadas con pienso completo (5,1%) que en las alimentadas mediante raciones unifeed (2,2%), aunque dicha diferencia no se confirmó estadísticamente (ANOVA p=0,1408). Hay estudios que indican que los diversos ingredientes de las raciones (algodón, maíz, cacahuete), conducen a variaciones en la mezcla de aflatoxinas que, eventualmente, se transformarán en AFM1 (Van Eijkeren et al., 2006). Estos autores calcularon que la tasa de transferencia de aflatoxina a leche es mayor cuando

las raciones contienen semilla de algodón contaminada que cuando contienen maíz contaminado. Por tanto, el tipo de ingrediente contaminado que se utiliza en el concentrado, no solo determina la composición de aflatoxinas naturales, sino que también puede afectar a la transferencia de aflatoxinas.

En nuestro estudio, el efecto de la estacionalidad evidenció una mayor tasa de transferencia en primavera (4,2%) frente al invierno (1,9%), aunque la diferencia no fue significativa (ANOVA  $p=0,2406$ ).

Si únicamente se tienen en cuenta los 22 lotes apareados en los que se detectó AFB1 en pienso y AFM1 en leche correspondiente, la tasa de transferencia fue del 8,8%, con un intervalo del 0,8 al 36%. En los dos lotes de raciones completas cuya tasa de aflatoxina B1 superaba el contenido máximo de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (lotes 50 y 51), la tasa de transferencia fue de 1,2% y 0,8%, respectivamente. En los cinco lotes de leche cruda cuya tasa de aflatoxina M1 superó el contenido máximo de 50  $\text{ng}/\text{kg}$  (lotes 7, 22, 44, 46 y 47), la tasa de transferencia osciló entre 2,9 y 29,7%, con un promedio de 15,2%.

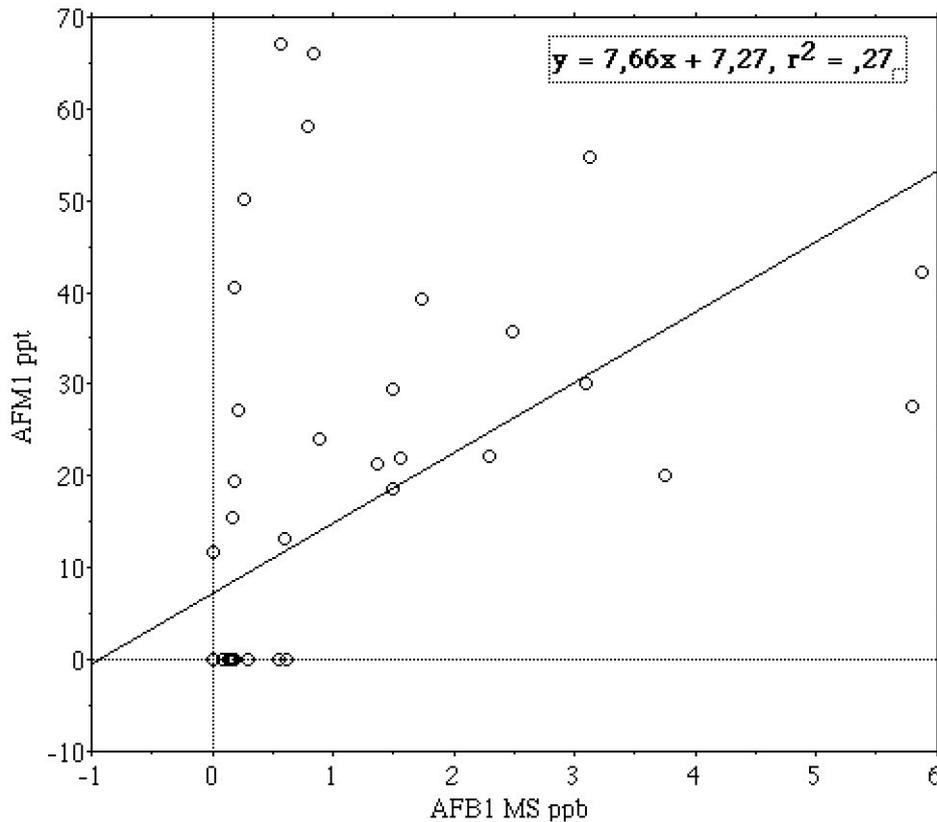
La transferencia de aflatoxinas a la leche puede reducirse añadiendo adsorbentes de aflatoxinas a las raciones del ganado lechero, por lo que nos propusimos estudiar la capacidad de fijación de AFB1 de varios aditivos tecnológicos utilizados en alimentación animal (apartado 5.7.).

**Tabla 30.** Tasa de transferencia de aflatoxinas desde las raciones alimenticias ( $\mu\text{g}$  de AFB1 por kg de materia seca MS) a la leche cruda de vaca (ng de AFM1 por kg de leche).

Tipología	n	AFB1 raciones ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ MS)	AFM1 leche (ng/kg)	Tasa de transferencia
<b>Total de lotes</b>	60	0,70 $\pm$ 1,30	12,6 $\pm$ 19,1	3,2%
<b>Ganado unifeed</b>	38	0,44 $\pm$ 0,86	9,00 $\pm$ 16,6	2,2%
<b>Ganado pienso</b>	22	1,13 $\pm$ 1,77	18,8 $\pm$ 21,8	5,1%
<b>Ordeños primavera</b>	35	0,60 $\pm$ 1,02	15,3 $\pm$ 22,3	4,2%
<b>Ordeños invierno</b>	25	0,83 $\pm$ 1,63	8,8 $\pm$ 12,8	1,9%
<b>Lotes positivos*</b>	22	1,76 $\pm$ 1,68	33,8 $\pm$ 16,4	8,8%

\*Lotes positivos: se detectó AFB1 en las raciones alimenticias y AFM1 en la leche correspondiente de las vacas

La correlación entre las tasas de aflatoxina B1 en raciones completas y las tasas correspondientes de aflatoxina M1 en leche cruda fue de  $r=+0,52$ , con un valor  $R^2 = 0,27$  ( $p=0,0001$ ). En la Figura 29 se muestra el gráfico de correlación entre la concentración de AFB1 en las raciones completas (eje X) y la concentración de aflatoxina M1 en la leche (eje Y).



**Figura 29.** Gráfico de correlación de valores entre AFB1 y AFM1.

Han et al. (2013) observaron que, aunque todas las muestras analizadas de raciones alimenticias para el ganado estaban dentro de los niveles de AFB1 permitidos por la Comisión Europea (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), el contenido de AFM1 en 3 de 200 muestras de leche estaba por encima de los niveles máximos establecidos por la UE (50  $\text{ng}/\text{kg}$ ). Battacone et al. (2009) también informaron que no existe total garantía de que la concentración de AFM1 en la leche, sea siempre inferior al límite legal de la UE, aun cuando los niveles de AFB1 en la alimentación animal estén dentro de los límites.

La tasa de transferencia de aflatoxinas desde el pienso (AFB1) a la leche (AFM1), depende del nivel de contaminación, la cantidad ingerida, la duración de la exposición, el tipo de alimentación, el metabolismo de la vaca y su estado de salud, entre otros factores

(Masoero et al., 2007; Aslam et al., 2014). Van Eijkeren et al. (2006), propusieron un modelo estacionario de transferencia de AFB1 a AFM1. Una fracción de la ingesta diaria de AFB1 ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ) se absorbe a través del intestino, dependiendo de la fuente de contaminación (maíz, algodón, cacahuete), de la composición del concentrado y de la composición total de la ración completa. La cantidad absorbida de AFB1 determina la concentración plasmática, que se elimina en parte por excreción urinaria o por transformación en metabolitos como AFM1. Una vez que se ha formado AFM1 en el hígado, ésta circula a través del plasma y una parte se excreta en la leche.

La EFSA ha estimado que la tasa de transferencia de aflatoxina B1 en pienso a aflatoxina M1 en leche de vaca es del 1-2% como media, aunque en ganado de alta productividad puede aumentar hasta el 6% o más (EFSA, 2004). Sin embargo, esta tasa de transferencia puede variar en animales individuales, de un día a otro y de un ordeño a otro, ya que está influenciada por los factores señalados anteriormente. Para vacas lecheras de alto rendimiento con una producción de hasta 40 litros de leche por día, se han reportado porcentajes de transferencia de aflatoxinas de hasta 6,2%, sobre todo en la primera fase de la lactación (Veldman et al., 1992). Por el contrario, otros investigadores han encontrado tasas de transferencia de sólo el 0,56%, como Xiong et al. (2015) en un experimento con vacas Holstein que producían 21,3 kg de leche al día.

Estudios recientes realizados en Serbia indican que entre el 0,3 y el 6,2% de AFB1 ingerida por las vacas se transforma en AFM1, y la mayor cantidad de AFM1 está presente en la leche entre 6 y 24 h después de que las vacas hayan consumido el alimento contaminado. Después de ese período, si el animal ya no ingiere alimentos contaminados con AFB1, la cantidad de AFM1 comienza a disminuir hasta su completa eliminación al cabo de 72 a 96 h (Kos, 2015).

En nuestro estudio, el mayor índice de transferencia se produjo en vacas alimentadas con pienso completo (5,1%), lo que está en línea con el valor de 6% indicado por EFSA para vacas de alta productividad. Esta tasa de transferencia es mucho más alta que el valor de 0,54% reportado para vacas Holstein por Galvano et al. (1996). Sin embargo, las vacas utilizadas en dicho estudio estaban en la última etapa de la lactación, cuando la velocidad de transferencia se reduce marcadamente.

La AFM1 aparece en la leche dentro de las 12 primeras horas de la ingestión de AFB1, y alcanza una concentración máxima después de tres días. De manera similar, desaparece de la leche dentro de los 3 ó 4 días posteriores a la eliminación de la fuente de aflatoxinas en las raciones alimenticias (Díaz et al., 2004; Aslam et al., 2016).

Otros investigadores reportaron una transferencia del 2,35% de aflatoxinas en vacas frisonas Holstein (Bantaokul, 2009), similar a la encontrada en nuestro estudio. Por otra parte, Masoero et al. (2007) en un estudio similar con vacas Holstein, reportaron una transferencia de 1,29% en animales de baja producción de leche (21,2 kg/día) y de 2,70% en vacas de alta producción (41,8 kg/día), en la misma línea que nuestros resultados. Otros autores como Aslam et al. (2014), observaron una transferencia de aflatoxinas a la leche del 15%, muy elevada en comparación con el resto de autores.

### **5.5. Aflatoxinas en materias primas a base de maíz**

El método validado MÉTODO #1, se utilizó para la determinación y cuantificación de aflatoxina B1 (AFB1) en los lotes de materias primas (maíz grano, harina de maíz y ensilado de maíz). Es bien sabido que el maíz es un cereal muy susceptible a la contaminación con *Aspergillus flavus* y con aflatoxina B1, tanto en el campo como durante la fase de almacenamiento. La incidencia de aflatoxina B1 en grano de maíz recién cosechado, puede

ser un indicador del efecto del cambio climático. Por otro lado, la incidencia de aflatoxina B1 en grano de maíz en secadero y almacén, puede ser un indicador de las condiciones de manejo postcosecha y durante el almacenamiento. Finalmente, el muestreo de productos a base de maíz en explotaciones ganaderas, nos puede dar una idea de las prácticas de manejo y almacenamiento en granja. Con estos objetivos, nos planteamos un muestreo en las diferentes etapas de la cadena cerealista que sigue el maíz destinado a la alimentación animal. Para este estudio, se analizaron un total de 80 muestras, formadas por 30 muestras de maíz grano recién cosechado, 30 muestras de grano de maíz en secadero-almacén, así como 20 muestras tomadas en explotaciones de vacuno lechero (7 muestras de harina de maíz y 13 muestras de ensilado de maíz).

No se detectó aflatoxina B1 en ninguna de las muestras de maíz grano recién cosechado (Tabla 31), procedentes de Aragón y Navarra, lo que puede indicar la ausencia de mohos aflatoxigénicos en el maíz, o que las condiciones precosecha no han permitido la síntesis de aflatoxinas.

Por otro lado, en grano de maíz de secaderos y almacenes de grano, se detectaron únicamente 2 muestras positivas (6,7%) a aflatoxina B1, con valores de 0,61 y 7,76 µg/kg, respectivamente (Tabla 31), ambas de secaderos localizados en Aragón. Una de estas muestras superó el contenido máximo de aflatoxina B1 en maíz para consumo humano (5 µg/kg), aunque estaba por debajo del contenido máximo en materias primas para pienso (20 µg/kg). La causa más probable fue un fallo en la desecación del grano o en el almacenamiento posterior, ya que dicha muestra presentaba un porcentaje de humedad del 32%. En la costra superficial presentaba un aspecto enmohecido verdoso, compatible con la presencia de *Aspergillus flavus*. Esta especie de *Aspergillus* afecta especialmente al maíz y produce

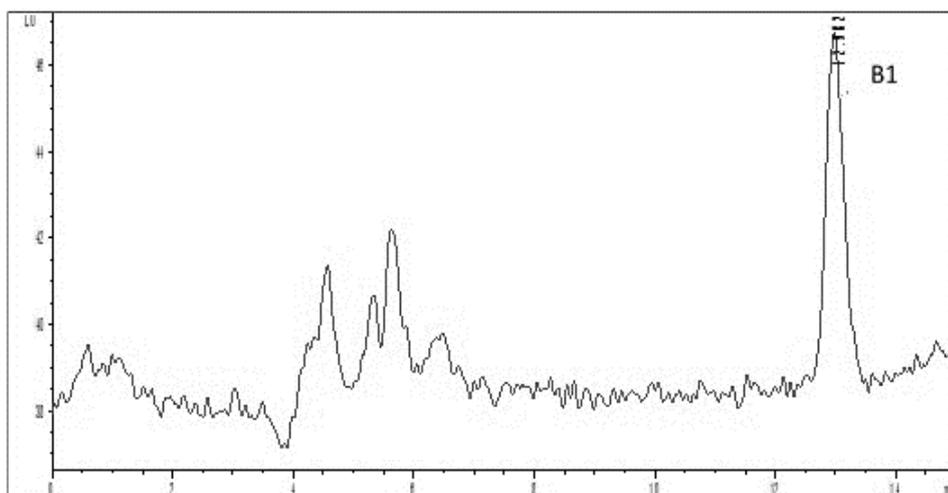
aflatoxinas de la serie B, a diferencia de *A. parasiticus* que raramente afecta al maíz y produce aflatoxinas B y G (Ehrlich et al., 2007).

Finalmente, la aflatoxina B1 fue detectada en 6 de las 20 muestras (30%) de productos a base de maíz, siendo mayor la incidencia en ensilado de maíz (5 muestras positivas) que en harina de maíz (1 positivo) (Tabla 31). Las concentraciones medias de aflatoxina B1, referidas al 12% de humedad, fueron de  $0,47 \pm 1,25 \mu\text{g}/\text{kg}$  (harina de maíz) y  $0,35 \pm 0,91 \mu\text{g}/\text{kg}$  (ensilado de maíz). Es bien sabido que el maíz y sus derivados son una de las fuentes más comunes de aflatoxinas. El ensilado de maíz también puede ser una fuente de aflatoxinas, porque el proceso de ensilado no destruye las toxinas ya presentes en el material de partida (Cassel et al., 2012).

**Tabla 31.** Prevalencia de AFB1 en materias primas a base de maíz, expresada en porcentaje de positividad y rango de concentraciones.

<b>Tipo muestra</b>	<b>Nº muestras analizadas</b>	<b>Nº muestras positivas</b>	<b>% Positividad</b>	<b>Rango de AFB1 (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Maíz grano en remolque	30	0	0%	<LOD
Maíz grano en almacén	30	2	6,7%	LOD - 7,76
Harina de maíz en granja lechera	7	1	14,3%	LOD - 3,30
Ensilado de maíz en granja lechera	13	5	38,5%	LOD - 3,30
<b>TOTAL</b>	<b>80</b>	<b>8</b>	<b>10%</b>	<b>LOD - 7,76</b>

A continuación, en la Figura 30 se muestra un cromatograma representativo de una muestra positiva de ensilado de maíz (AFB1 a  $3,30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).



**Figura 30.** Cromatograma de una muestra de ensilado de maíz positiva a AFB1.

Si combinamos nuestros resultados en grano de maíz en cosecha y postcosecha, obtenemos una incidencia de aflatoxinas de 3,3% (2 positivos de 60 muestras). Estos resultados son similares a los hallados en España por Cano-Sancho et al. (2013), que analizaron aflatoxinas en 394 muestras de maíz dulce y aperitivos de maíz, de las cuales sólo 3 resultaron positivas (0,76%), con un intervalo de contaminación de 0,8 a 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . También se detectó una incidencia comparable en el estudio de Ibáñez-Vea et al. (2011), en el que 9% de las muestras de cereales recogidas de España estaban contaminadas con AFB1.

El maíz y sus derivados, son productos cereales muy utilizados en la alimentación animal y particularmente en las raciones de ganado vacuno lechero. La empresa multinacional Nutriad de alimentación animal, publica anualmente informes de la incidencia de micotoxinas en maíz cultivado en España (disponibles en <https://nutriad.com/>). En el año 2015 se analizaron 60 muestras de maíz; la AFB1 se detectó en el 11% de las muestras y la concentración media en las muestras positivas fue 18,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y una muestra con 20,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  superó el contenido máximo establecido para materias primas en alimentación animal (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). En 2016 se analizaron 107 muestras de maíz; la AFB1 se detectó en el 4,7% de

las muestras y la concentración media en las muestras positivas fue 4,7 µg/kg; la concentración máxima fue de 13 µg/kg, por lo que ninguna de las muestras excedió la concentración máxima permitida. Los datos disponibles del año 2017 sobre 121 muestras de maíz, indican una positividad a AFB1 del 5,8%. La concentración media de AFB1 en las muestras positivas fue de 30,2 µg/kg y la concentración máxima fue de 115,4 µg/kg.

En respuesta a una solicitud de información emitida por la Comisión Europea, la EFSA recogió resultados analíticos de aflatoxinas en un total de 34.326 muestras de productos alimenticios de 22 Estados miembros de la UE (EFSA, 2007). Se reportaron aflatoxinas en 8.875 muestras (26%). Para el maíz, hubo 943 muestras con 136 (14%) positivos para AFB1, cuyos valores medios oscilaron entre 0,12 y 0,26 µg/kg.

En un estudio realizado por Van der Fels-Klerx et al. (2012), con muestras de granos de cereales procedentes de todo el noroeste de Europa, no se detectaron aflatoxinas. En un estudio realizado en los Países Bajos (Van der Fels-Klerx et al., 2018), hubo un aumento en la presencia de aflatoxina en el maíz y los productos de maíz en comparación con años anteriores; del total de 300 muestras analizadas, el 2% superaron el contenido máximo establecido.

En general, la contaminación primaria de los cereales con AFB1 se había relacionado siempre con productos provenientes de zonas de climas tropicales y subtropicales (Giray et al., 2007). No obstante, los patrones de incidencia de micotoxinas en productos agrícolas están cambiando como consecuencia del aumento de las temperaturas promedio, debido al cambio climático (Miraglia et al., 2009; Paterson y Lima, 2010; Medina et al., 2015; Wielogórska et al., 2016).

Miraglia et al. (2009) enfatizaron que la infección por *A. flavus* y la contaminación por aflatoxinas, antes poco común en Europa, será cada vez más importante, especialmente en

maíz cultivado en el sur de Europa. De hecho, en 2003, una temporada cálida y seca condujo a una grave infección por *A. flavus* del maíz en el norte de Italia (Piva et al., 2006). Una encuesta sobre 110 muestras mostró una incidencia de AFB1 del 75% con una contaminación media de 4,4 µg/kg. El uso de este maíz como alimento para el ganado lechero dio lugar a una contaminación generalizada de AFM1 en la leche de vaca, por lo que varios miles de toneladas de leche que excedían el límite legal de la UE tuvieron que ser eliminados. Otro estudio llevado a cabo en Italia destacó el elevado porcentaje de positividad (26%) encontrado en 50 muestras de harina de maíz, en las que se hallaron tasas de AFB1 comprendidas entre 0,17 y 3,75 µg/kg.

Durante el año 2012, Serbia experimentó una sequía que afectó mucho a los cultivos agrícolas. Al analizar 680 muestras de maíz en el período 2012-2013, la incidencia de aflatoxina B1 fue del 79% y los niveles medios de AFB1 estuvieron entre 28,06 y 33,21 µg/kg, según las regiones de Serbia; el número de muestras por encima del límite máximo osciló entre 20,8 y 29,7%. La consecuencia de las altas concentraciones de AFB1 en el maíz, que fue utilizado para alimentación animal, fue la alta incidencia de aflatoxina M1 en leche (198 muestras positivas de un total de 200), así como las altas concentraciones con valores medios desde 120 a 210 ng/kg y un valor máximo de 1200 ng/kg (Kos, 2015; Jovanović et al., 2018). Estudios posteriores realizados en Serbia (Kos et al., 2013) y Croacia (Pleadin et al., 2015), revelaron que el 68,5% y 28,8% de las muestras de maíz superaron el máximo legal permitido, respectivamente. Estos investigadores enfatizaron que los cambios climáticos podrían ser el motivo de la elevada incidencia de aflatoxinas.

En otras zonas del mundo también se ha encontrado la presencia de aflatoxina B1 en maíz y productos derivados. En EE.UU., Whitlow (2006) reportó la presencia de AFB1 tanto en maíz como en ensilado de maíz, con una concentración media de 170 µg/kg. En China, Fu

et al. (2008) analizaron 18 muestras de maíz y encontraron un 22% de incidencia de aflatoxina B1, con un valor máximo de 2,41 µg/kg.

En conclusión, se confirma que el maíz y los productos derivados son muy susceptibles a los mohos aflatoxígenos, especialmente *Aspergillus flavus*, por lo que presentan un alto riesgo de contaminación por aflatoxinas, principalmente del grupo B. El cambio climático puede afectar a la distribución de *A. flavus* en las cosechas, así como a la relación entre el moho y la planta. No en vano, varios estudios de modelización prevén un aumento de la incidencia de aflatoxinas en la cadena cerealista, particularmente en el maíz cultivado en el sur de Europa.

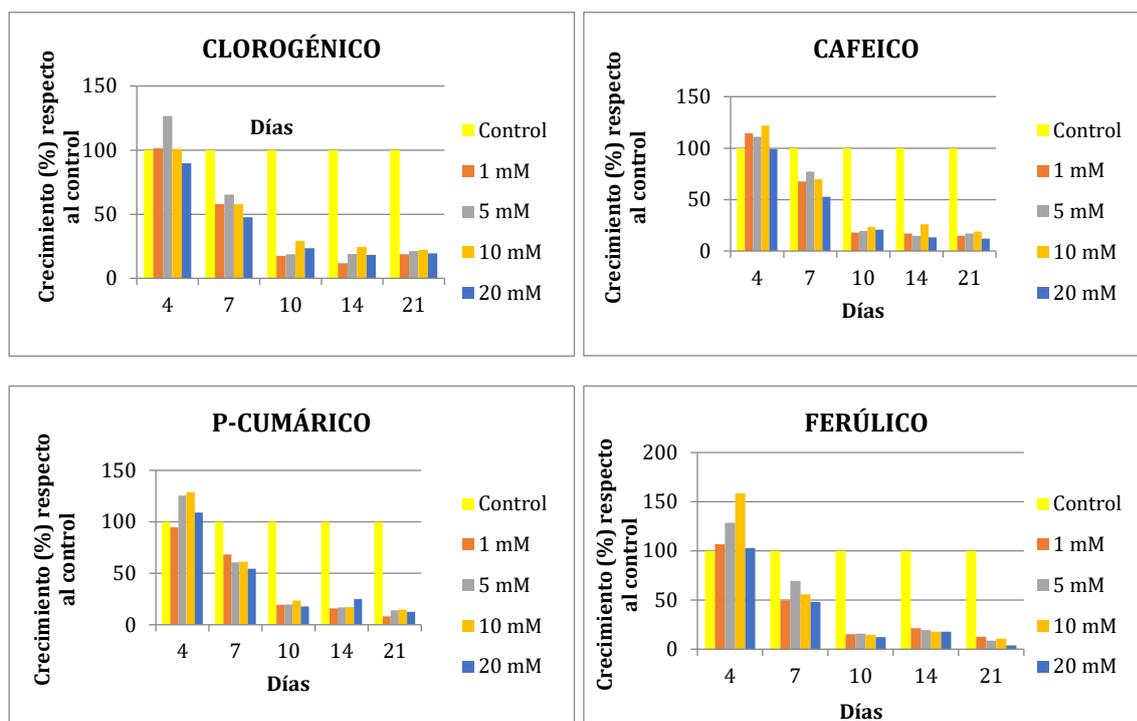
## **5.6. Prevención del crecimiento fúngico y síntesis de aflatoxinas**

### **5.6.1. Actividad antifúngica de los ácidos fenólicos**

Se ha evaluado el efecto in vitro de los principales ácidos fenólicos naturales (ferúlico, cafeico, p-cumárico y clorogénico) sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y su capacidad para la síntesis de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. Se analizaron cuatro concentraciones diferentes de cada uno de los compuestos fenólicos (1 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM) durante 21 días de incubación; estas concentraciones equivalen aproximadamente al 0,02 - 0,4% (0,2 - 4 mg/g). La adición inicial de los ácidos fenólicos produjo ligeros cambios en los valores de pH del medio de cultivo, que fueron de 5,35 (control), 5,30 (ferúlico 20 mM), 5,27 (cafeico 20 mM), 5,31 (p-cumárico 20 mM) y 5,13 (clorogénico 20 mM).

Los resultados de actividad antifúngica mostraron una mayor inhibición del crecimiento conforme aumentaba la concentración de ácidos fenólicos y el tiempo de incubación, aunque ninguno de los 4 ácidos fenólicos logró inhibir completamente el crecimiento de *A. parasiticus* (Figura 31). No obstante, al cuarto día de incubación se pudo

observar cierta estimulación del crecimiento fúngico con concentraciones de ácidos fenólicos de hasta 10 mM. Sin embargo, este efecto estimulador desapareció al séptimo día de incubación, a partir del cual se observaron reducciones significativas del crecimiento respecto de los controles. En lo referente a los valores de pH durante la incubación, éstos alcanzaron al día 7 valores cercanos a pH 4 en los controles, debido a la acidificación del medio por el crecimiento fúngico. Sin embargo, en los ensayos con ácidos fenólicos, los valores de pH se mantuvieron generalmente por encima de 4,5, ya que la inhibición del crecimiento produjo una menor actividad fermentativa sobre la glucosa.



**Figura 31.** Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de *A. parasiticus* en medio líquido.

Como hemos visto, concentraciones de ácidos fenólicos  $\leq 10$  mM tuvieron cierto efecto estimulante del crecimiento de *A. parasiticus*. Este efecto fue también observado en *Fusarium*

*verticillioides* y *F. proliferatum*, en un ensayo con agar a base de maíz utilizando concentraciones de ácido ferúlico inferiores a 10 mM (Ferrochio et al., 2013).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaron que la adición de ácidos fenólicos al agar de harina de maíz a niveles de 2,5 a 10 mM, tuvo un efecto inhibitorio notable dosis-respuesta en el crecimiento radial de seis especies toxigénicas de *Fusarium*, causando una inhibición total (100%) en todas las especies excepto en *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*.

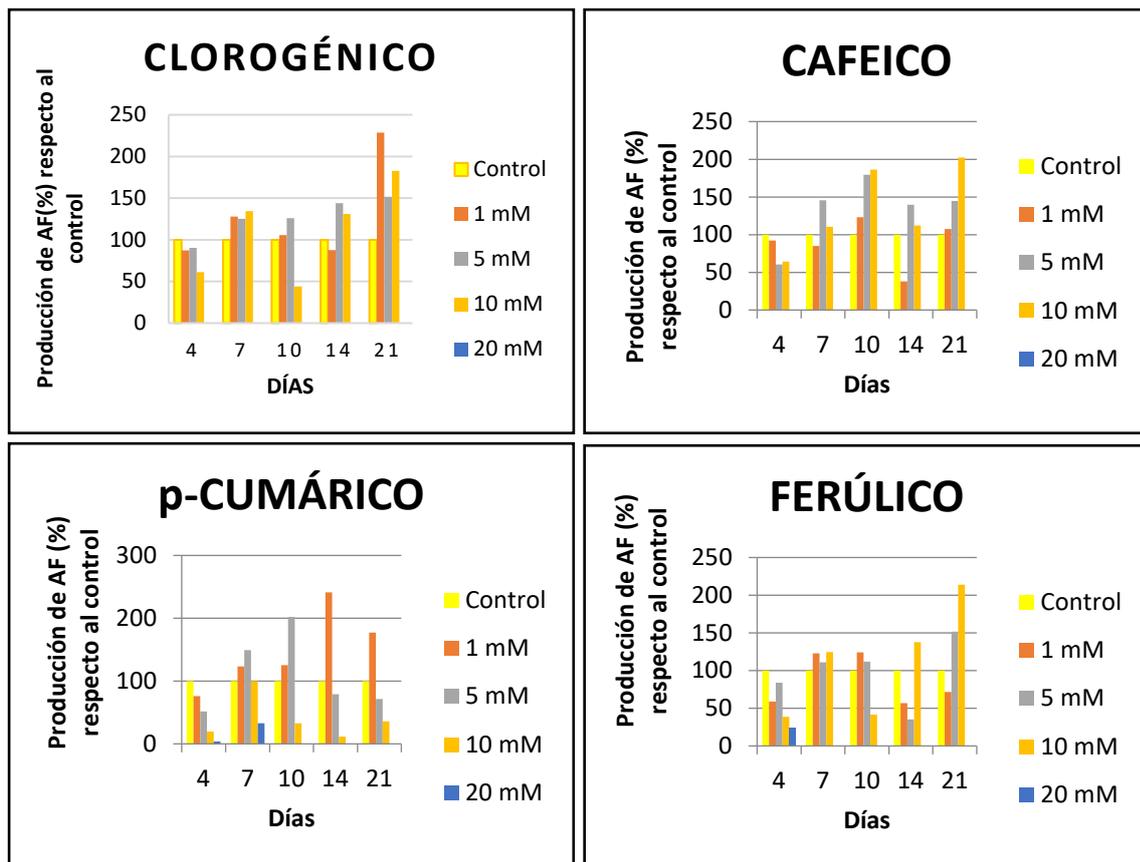
En un estudio reciente en caldo patata dextrosa, el crecimiento de *A. flavus* se vio completamente inhibido tras 5 días de incubación a 25°C con una concentración de ácido ferúlico del 1% (equivalente a 50 mM), mientras que al 0,1% y 0,01% la inhibición fue del 67,2% y 14,2%, respectivamente (Moon et al., 2018). En nuestro estudio, el ácido ferúlico a 5 mM (0,1%) produjo una inhibición del crecimiento de *A. parasiticus* del 30,7%.

En la actualidad, la información sobre el mecanismo de acción de los fenólicos sobre el crecimiento fúngico es limitada. Hashem et al. (2010), indicaron que la eficacia de los ácidos fenólicos depende de la constante de disociación ácida (pKa), reflejando una mejor actividad antifúngica con un 50% de disociación. Kwon et al. (2011) plantearon la hipótesis que los ácidos fenólicos pueden actuar a nivel de la membrana celular, alterando su permeabilidad. Adicionalmente, los compuestos fenólicos, por su capacidad antioxidante, llevan a cabo reacciones redox en la membrana plasmática de la célula y secuestran electrones procedentes del proceso de respiración, lo que explicaría su capacidad antimicrobiana (Lacombe et al., 2010).

### **5.6.2. Actividad antiaflatoxigénica de los ácidos fenólicos**

En nuestro estudio, la síntesis de aflatoxinas fue completamente inhibida a la máxima concentración de 20 mM con los cuatro ácidos fenólicos ensayados, y esta inhibición total se observó a partir del día 4 para los ácidos cafeico y clorogénico, del día 7 con el ácido ferúlico y del día 10 en el caso del ácido p-cumárico (Figura 32). No obstante, a concentraciones inferiores a 20 mM, se observó un estímulo en la síntesis de aflatoxinas, que en ocasiones alcanzó el doble de concentración que los controles correspondientes. De manera similar, Ferrochio et al. (2013) detectaron que a concentraciones bajas de ácidos fenólicos ( $\leq 10$  mM), la producción de micotoxinas, como las fumonisinas, se ve favorecida, datos que coinciden con los resultados obtenidos en nuestra investigación.

Nuestros resultados coinciden en parte con los de Kim et al. (2008), que estudiaron el efecto del ácido cafeico en placas de PDA enriquecidas con 12 mM, observando una reducción de la producción de aflatoxinas por *A. flavus* de hasta el 95%, en 6 días de incubación, aunque el crecimiento del moho prácticamente no se vio afectado.



**Figura 32.** Producción de aflatoxinas totales por *A. parasiticus*.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaron que la adición de ácidos fenólicos a granos de maíz a niveles entre 1 y 3,5 g/kg, únicamente lograron reducir la síntesis de T-2 y HT-2 (reducción del 90%) y zearalenona (reducción del 48 al 77%), pero fumonisinas y deoxinivalenol no se vieron afectadas. Por lo tanto, los efectos de los ácidos fenólicos sobre la producción de micotoxinas en los granos de maíz fueron menos evidentes que los efectos sobre el crecimiento.

Después de nuestro estudio in vitro en caldo YES, se realizó un ensayo para evaluar la capacidad del ácido ferúlico de inhibir la síntesis de aflatoxina B1, utilizando grano de maíz enriquecido con dicho ácido fenólico a una concentración final de 4 g/kg (0,4%). El crecimiento del moho fue visible a los 3 días de incubación a 25°C, tanto en los matraces

controles como en los suplementados. Al cabo de los 21 días de incubación, el control alcanzó una concentración de aflatoxina B1 de 22,8 mg/kg, mientras que la concentración de AFB1 en el ensayo con ferúlico al 0,4% fue de 10,8 mg/kg. Por consiguiente, los resultados obtenidos indicaron que el ácido ferúlico al 0,4% inhibe la síntesis de aflatoxina B1 un 52,6% frente al control.

En comparación, los ácidos propiónico, acético y butírico inhibieron completamente el crecimiento de *Aspergillus flavus* a una concentración del 0,5%, el ácido sórbico al 0,1% y el ácido benzoico al 0,05% (Moon et al., 2018). El ácido propiónico, el ácido butírico, el ácido benzoico y el ácido sórbico también mostraron potentes actividades antiaflatoxigénicas a una concentración del 0,1%. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el ácido ferúlico no alcanza una eficacia comparable a los ácidos orgánicos, como conservantes de materias primas en alimentación animal. La única ventaja es que el ácido ferúlico, a diferencia de los ácidos orgánicos habituales, no modifica negativamente las características sensoriales de los productos tratados.

Varios autores han afirmado que los ácidos fenólicos pueden reducir la producción de micotoxinas, incluso a concentraciones en las que el crecimiento del moho no se vio afectado. Esto sugiere que la inhibición de la síntesis de micotoxinas no es el resultado de un efecto fungitóxico, sino que dichos ácidos producen un efecto específico sobre la biosíntesis de las toxinas (Bily et al., 2003). De acuerdo con esta hipótesis, Boutigny et al. (2009) propusieron que la inhibición de la síntesis de tricotecenos tipo B en *Fusarium* por el ácido ferúlico, podría estar regulada a nivel transcripcional (*Tri* genes). Igualmente, en el caso de las aflatoxinas, se ha sugerido que la inhibición de la síntesis de AFB1 en *A. parasiticus* por eugenol, se debía a la inhibición de varios genes clave para la ruta biosintética, como el gen *aflR* (Jahanshiri et al., 2015). Esto ha sido confirmado en los estudios de Moon et al. (2018),

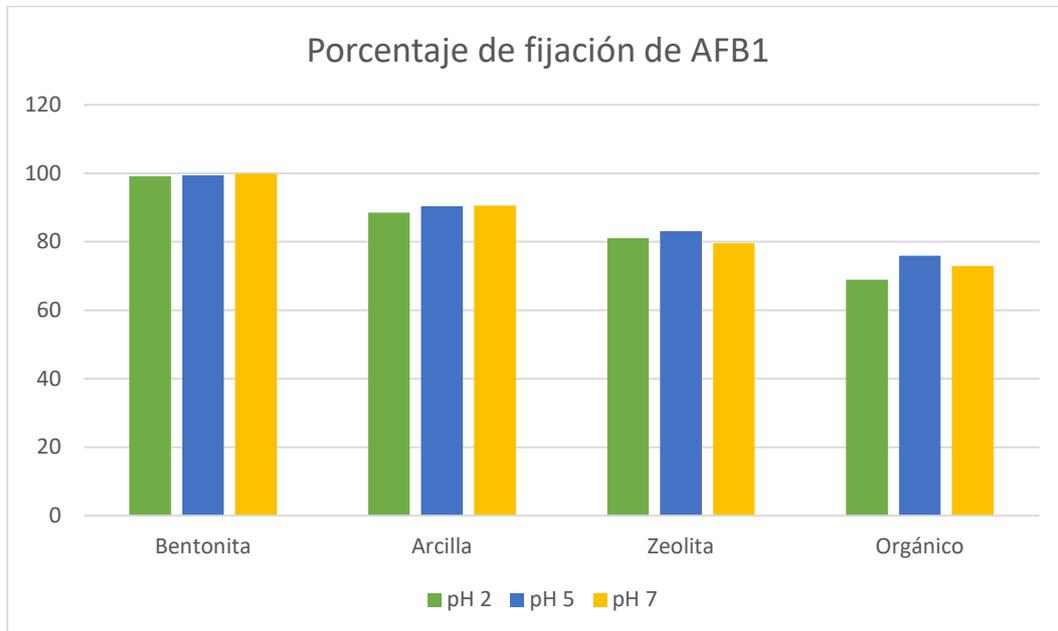
en los que los ácidos orgánicos suprimieron la producción de aflatoxinas mediante la reducción de la expresión de genes relacionados con su biosíntesis en *Aspergillus flavus*.

### 5.7. Capacidad de los adsorbentes para la fijación de aflatoxina B1

Se ha evaluado la capacidad *in vitro* de fijación de aflatoxina B1 de dos adsorbentes inorgánicos (arcilla sepiolítica y zeolita-clinoptilolita), así como de un adsorbente orgánico natural, utilizando bentonita como adsorbente de referencia. Los ensayos se realizaron en soluciones buffer de pH 2, pH 5 y pH 7, con una concentración de aflatoxina B1 de 20 µg/L.

La bentonita obtuvo unos porcentajes de fijación de AFB1 superiores al 99% en los tres valores de pH. La capacidad de fijación de AFB1 de la arcilla sepiolítica fue del  $89,8 \pm 1,2\%$ , con un rango del 88,5% (pH 2) al 90,6% (pH 7). La zeolita-clinoptilolita mostró unos resultados muy similares, con una media de fijación de AFB1 del  $81,3 \pm 1,8\%$ , ligeramente superior a pH 5 (83,1%) e inferior con pH 7 (79,6%). Finalmente, el adsorbente orgánico alcanzó un porcentaje medio de fijación de AFB1 del  $75,9 \pm 3,5\%$ , oscilando entre 68,9% (pH 2) y 75,9% (pH 5).

En la Figura 33 se compara la capacidad de fijación de aflatoxina B1 de los adsorbentes ensayados.



**Figura 33.** Porcentajes de fijación de aflatoxina B1 con los adsorbentes ensayados a distintos valores de pH en soluciones buffer

Los cuatro adsorbentes ensayados han mostrado buena capacidad para la fijación in vitro de aflatoxina B1. La bentonita utilizada como control fue la que presentó mejores porcentajes de fijación de AFB1, superiores al 90% en todos los ensayos. Esto concuerda con los trabajos clásicos de Ramos y Hernández (1997). Igualmente, en el Reglamento de Ejecución (UE) No 1060/2013, relativo a la autorización de la bentonita como aditivo en piensos para todas las especies animales, se indica que la capacidad de fijación de la AFB1 será superior al 90%. Asimismo, nuestros resultados con arcilla sepiolítica coinciden con los estudios de Iloabuchi (2017), que observó que tras 60 minutos de ensayo las arcillas adsorbían hasta 77,39% de aflatoxina. Respecto de la zeolita, Tomasevic et al. (2003)

indicaron que es capaz de adsorber entre 88 y 100% de aflatoxina B1 en solución buffer a pH 3, lo que también concuerda con nuestros resultados.

En general, los valores de fijación de AFB1 se vieron poco influidos por los valores de pH, lo que concuerda con la observación de Sun et al. (2018) en la que la fijación de aflatoxina B1 por adsorbentes minerales no se ve afectada por los cambios de pH ocurridos en el intervalo fisiológico. En el caso de adsorbentes de origen mineral, la cinética de formación del complejo adsorbente-micotoxina es muy rápida, alcanzando valores máximos en los primeros minutos (Ramos y Hernández, 1997). Sin embargo, con adsorbentes orgánicos basados en pared de levaduras, se precisan al menos 15 minutos hasta alcanzar el equilibrio de adsorción (Faucet et al., 2014).



## **CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS**

---



## 6. CONCLUSIONES

### **Primera**

La metodología analítica optimizada en este estudio garantiza la extracción y purificación eficientes de aflatoxina B1 (AFB1) en productos destinados a la alimentación animal, así como la detección y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución con derivatización fotoquímica y detección fluorimétrica, con un límite de detección de 0,03 µg/kg.

### **Segunda**

Para la determinación de aflatoxina M1 (AFM1) en leche cruda de vaca, se ha optimizado un método basado en la preparación de la muestra sin solventes y purificación mediante inmunoafinidad, seguido de detección y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, logrando una sensibilidad de 8 ng/kg.

### **Tercera**

Los métodos analíticos para la determinación de las aflatoxinas B1 y M1, que son motivo de preocupación global por su presencia en alimentos animales y leche, han sido validados satisfactoriamente, cumpliendo los criterios de especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión establecidos por la normativa europea para el control oficial de micotoxinas.

#### **Cuarta**

Se ha detectado aflatoxina B1 en el 55% de las muestras de raciones completas para ganado, con una mayor incidencia en pienso completo (86%) que en raciones unifeed (36,8%). Esta diferencia podría ser debida a la proporción de concentrados y a la presencia de ingredientes como la semilla de algodón. Asimismo, la positividad de aflatoxina B1 en materias primas a base de maíz, alcanzó el 38,5% en muestras de ensilado. En su conjunto, los datos de incidencia indican la necesidad de aplicar estrategias integrales de prevención y reducción de la contaminación, máxime teniendo en cuenta las predicciones de aumento del riesgo de aflatoxinas por el cambio climático.

#### **Quinta**

La concentración media de aflatoxina B1 en las raciones alimenticias para ganado fue de 0,61 µg/kg, siendo significativamente superior en pienso completo (0,99 µg/kg) que en raciones unifeed (0,39 µg/kg). También hubo diferencias significativas en las tasas de AFB1 según el origen geográfico de las muestras, mientras que la variación estacional no fue determinante. Dos de los 60 lotes de alimentos para el ganado, sobrepasaron el contenido máximo de AFB1 establecido en 5 µg/kg por la Unión Europea.

#### **Sexta**

La incidencia global de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca fue del 33,8%, con un rango de 11,2 a 67,2 ng/kg y un valor medio de 11,2 ng/kg. El patrón de contaminación indica una mayor presencia de AFM1 en leche de vacas alimentadas con pienso completo frente a las raciones unifeed, así como en leche de primavera respecto a la producida en

invierno. En total, seis muestras de leche (7,5%) superaron el contenido máximo de AFM1 fijado en 50 ng/kg, lo que indica un riesgo de salud pública que justificaría un plan integral de vigilancia y control de aflatoxinas en toda la cadena de producción.

### **Séptima**

La tasa global de transferencia de aflatoxinas desde las raciones alimenticias a la leche fue del 3,2%, siendo mayor en las vacas alimentadas con pienso completo (5,1%) que mediante raciones unifeed (2,2%), así como en los ordeños de primavera (4,2%) frente a los de invierno (1,9%). En una selección de lotes positivos, la transferencia de aflatoxinas alcanzó el 8,8%, superando el umbral del 6% que ha estimado EFSA para vacas estabuladas de alta producción. Este estudio es el primero realizado en España para analizar la transferencia de aflatoxinas en ganado vacuno lechero.

### **Octava**

La exposición dietética a AFM1 por el consumo de leche líquida se ha calculado en 2,15 ng/día, lo que supone 0,034 ng/kg peso corporal/día para un adulto medio. Al tratarse de un agente genotóxico cancerígeno no se ha establecido un valor de ingesta diaria admisible, pero considerando un margen de seguridad entre 1 y 2 ng/kg peso corporal/día según la literatura científica, la ingesta diaria estimada de AFM1 se situaría entre 1,7% y 3,4% del valor de seguridad.

### **Novena**

Los ensayos in vitro con ácidos fenólicos en caldo YES, mostraron una estimulación inicial del crecimiento fúngico, aunque a partir del día 7, los ácidos ferúlico, cafeico, p-cumárico y clorogénico tuvieron un claro efecto fungistático a todas las concentraciones ensayadas (1 a 20 mM). Sin embargo, la síntesis de aflatoxinas solo se vio inhibida a la máxima concentración de 20 mM. La adición de ácido ferúlico al 0,4% en maíz grano, redujo la síntesis de aflatoxina B1 un 52,6% frente al control.

### **Décima**

Los adsorbentes ensayados han mostrado buena capacidad in vitro para la fijación de aflatoxina B1 en soluciones buffer a pH 2, 5 y 7, por lo que a priori serían candidatos para su aplicación en la reducción de aflatoxinas en los piensos. La eficacia fue algo superior en los adsorbentes de origen inorgánico (80-90%) que en el orgánico (69-76%), aunque en ambos casos estuvo por debajo del 99% obtenido por la bentonita utilizada como referencia. No obstante, habría que realizar estudios in vivo para validar el efecto sobre la transferencia de aflatoxinas del pienso a la leche.

## 7. CONCLUSIONS

### **First**

The analytical methodology optimized in this study guarantees the efficient extraction and purification of aflatoxin B1 (AFB1) in products intended for animal feed, as well as the detection and quantification by high performance liquid chromatography with photochemical derivatization and fluorimetric detection, with a limit of detection of 0.03 µg/kg.

### **Second**

For the determination of aflatoxin M1 (AFM1) in raw cow's milk, a method based on the preparation of the sample without solvents and purification by immunoaffinity was optimized, followed by detection and quantification by high performance liquid chromatography with fluorescence detector, achieving a sensitivity of 8 ng/kg.

### **Third**

The analytical methods for the determination of aflatoxins B1 and M1, which are of global concern due to their presence in animal feeds and milk, have been satisfactorily validated, meeting the criteria of specificity, linearity, sensitivity, accuracy and precision established by the regulations for the official control of mycotoxins.

#### **Fourth**

Aflatoxin B1 was detected in 55% of the samples of complete rations for cattle, with a higher incidence in complete feed (86%) than in unifeed rations (36.8%). This difference could be due to the proportion of concentrates and the presence of ingredients such as cottonseed. Likewise, the positivity of aflatoxin B1 in raw materials based on corn, reached 38.5% in silage samples. As a whole, the incidence data indicate the need to apply integrated strategies for the prevention and reduction of contamination, especially taking into account the predictions of increased risk of aflatoxins due to climate change.

#### **Fifth**

The mean concentration of aflatoxin B1 in feed rations for cattle was 0.61 µg/kg, being significantly higher in whole feed (0.99 µg/kg) than in unifeed rations (0.39 µg/kg). There were also significant differences in the rates of AFB1 according to the geographical origin of the samples, while the seasonal variation was not decisive. Two of the 60 batches of feed for livestock exceeded the maximum content of AFB1 set at 5 µg/kg by the European Union.

#### **Sixth**

The overall incidence of aflatoxin M1 in raw cow's milk was 33.8%, with a range of 11.2 to 67.2 ng/kg and a mean value of 11.2 ng/kg. The pattern of contamination indicates a greater presence of AFM1 in milk of cows fed complete feed versus unifeed rations, as well as in spring milk compared to that produced in winter. In total, six samples of milk (7.5%) exceeded the maximum content of AFM1 set at 50 ng/kg, which indicates a public health risk

that would justify an integrated plan for aflatoxin surveillance and control throughout the production chain.

### **Seventh**

The overall transfer rate of aflatoxins from food rations to milk was 3.2%, being higher in cows fed complete feed (5.1%) than unifeed rations (2.2%), as well as in spring milkings (4.2%) compared to winter milkings (1.9%). In a selection of positive batches, aflatoxin transfer reached 8.8%, surpassing the 6% threshold that EFSA has estimated for high production stall cows. This study is the first carried out in Spain to analyze the transfer of aflatoxins in dairy cattle.

### **Eighth**

The dietary exposure to AFM1 due to the consumption of liquid milk has been calculated at 2.15 ng/day, which is 0.034 ng/kg body weight/day for an average adult. Being a carcinogenic genotoxic agent, an acceptable daily intake value has not been established, but considering a safety margin between 1 and 2 ng/kg body weight/day according to the scientific literature, the estimated daily intake of AFM1 would be between 1.7% and 3.4% of the safety value.

### **Ninth**

In vitro tests with phenolic acids in YES broth showed initial stimulation of fungal growth, although from day 7, ferulic, caffeic, p-coumaric and chlorogenic acids had a clear fungistatic effect at all concentrations tested (1 to 20 mM). However, the synthesis of

aflatoxins was only inhibited at the maximum concentration of 20 mM. The addition of 0.4% ferulic acid in corn grain reduced the synthesis of aflatoxin B1 by 52.6% compared to the control.

### **Tenth**

The tested adsorbents have shown good in vitro binding capacity for aflatoxin B1 in buffer solutions at pH 2, 5 and 7, so a priori they would be candidates for its application in the reduction of aflatoxins in feed. The effectiveness was somewhat higher in the adsorbents of inorganic origin (80-90%) than in the organic (69-76%), although in both cases it was below 99% obtained by the bentonite used as a reference. However, in vivo studies should be carried out to validate the effect on aflatoxin transfer from the feed to the milk.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablotowicz, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A., & Weaver, M. A. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 142-153.
- Abdel-Wahhab, M. A., & Kholif, A. M. (2008). Mycotoxins in animal feeds and prevention strategies: A review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 2(1), 7-25.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55.
- AFLASAFE. (2019). <https://aflasafe.com>
- Aliabadi, M. A., Alikhani, F. E., Mohammadi, M., & Darsanaki, R. K. (2013). Biological control of aflatoxins. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 162-166.
- Ammann, H. M. (2003). Is Indoor Mold Contamination a Threat to Health? Part Two. *Journal of Environmental Health*, 66(2), 47-49.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2016). AOAC Official Method 994.08. Aflatoxins in Corn, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts, and Pistachio Nuts. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20 Edition.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2016). AOAC Official method 991.31, Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanuts butter. Immunoaffinity column (Aflatest) method. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20 Edition.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2016). AOAC Official Method 994.08. Aflatoxins in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachios nuts. Multifunctional column (Mycosep) method. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20

Edition.

- Aravind, K. L., Patil, V. S., Devegowda, G., Umakantha, B., & Ganpule, S. P. (2003). Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*, 82(4), 571–576.
- Ariño, A., & Bullerman, L. B. (1993). Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* NRRL-2999 as Affected by the Fungicide Iprodione. *Journal of Food Protection*, 56(8), 718–721.
- Ariño, A., Estopañan, G., Juan, T., & Herrera, A. (2007). Estimation of dietary intakes of fumonisins B1 and B2 from conventional and organic corn. *Food Control*, 18(9), 1058–1062.
- Ariño, A., Herrera, M., Estopañan, G., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Juan, T., & Herrera, A. (2009). Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. *Food Control*, 20(9), 811–814.
- Ariño, A., Herrera, M., Juan, T., Estopañan, G., Carramiñana, J. J., Rota, C., & Herrera, A. (2009). Influence of agricultural practices on the contamination of maize by fumonisin mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 72(4), 898-902.
- Asan, P. D. A. (2004). *Aspergillus*, *Penicillium* and Related Species Reported from Turkey. *Mycotaxon*, 89(1), 155–157.
- Asi, M. R., Iqbal, S. Z., Ariño, A., & Hussain, A. (2012). Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M1 contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 25(1), 34-38.
- Aslam, N., Iqbal, Z. M., Warriach, H. M., & Wynn, P. C. (2014). Pattern of partitioning of aflatoxins from feed to urine and its effect on serum chemistry in Nili-Ravi buffalo

- heifers. *Animal Production Science*, 54(10), 1671-1675.
- Aslam, N., Rodrigues, I., mcgill, D. M., Warriach, H. M., Cowling, A., Haque, A., & Wynn, P. C. (2016). Transfer of aflatoxins from naturally contaminated feed to milk of Nili-Ravi buffaloes fed a mycotoxin binder. *Animal Production Science*, 56(10), 1637-1642.
- Assem, E., Mohamad, A., & Oula, E.A. (2011). A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control*, 22(12), 1856-1858.
- Atanasova-Penichon, V., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2016). Antioxidant secondary metabolites in cereals: Potential involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 566.
- Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., & Visconti, A. (2005). Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 379-388.
- Aziz, N. H., El-Zeany, S. A., & Moussa, L. A. A. (2002). Influence of  $\gamma$ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus*. *Nahrung - Food*, 46(5), 327-331.
- Bahrami, R., Shahbazi, Y., & Nikousefat, Z. (2016). Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. *Food Control*, 62, 250-256.
- Bandyopadhyay, R., Ortega-Beltran, A., Akande, A., Mutegi, C., Atehnkeng, J., Kaptoge, L., Senghor, A.L., Adhikari, B.N., & Cotty, P. J. (2016). Biological control of aflatoxins in Africa: current status and potential challenges in the face of climate change. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 771-789.
- Bantaokul, C. (2009). Carry-over rate of aflatoxin M1 into cow milk during early lactation

- period. PhD Thesis, Chulalongkorn University (Thailandia).
- Bao, L., Trucksess, M. W., & White, K. D. (2010). Determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in olive oil, peanut oil, and sesame oil. *Journal of AOAC International*, 93(3), 936-942.
- Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Mazzette, A., & Pulina, G. (2009). The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4997–5004.
- Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., van der Fels-Klerx, H.J., Booij, C.J.H., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., & Brera, C. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *EFSA Supporting Publications*, 9(1), 223E, 172 pp.
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Leggieri, M. C., Brera, C., Rortais A., Goumperis T., & Robinson, T. (2016). Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 24328.
- Bbosa, G. S., Kitya, D., Odda, J., & Ogwal-Okeng, J. (2013). Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*, 5(10), 14–34.
- Becker-Algeri, T. A., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Drunkler, D. A., & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in bovine milk and dairy products: a review. *Journal of Food Science*, 81(3), R544-R552.
- Bellio, A., Bianchi, D., Gramaglia, M., Loria, A., Nucera, D., Gallina, S., & Decastelli, L. (2016). Aflatoxin M1 in cow's milk: Method validation for milk sampled in northern Italy. *Toxins*, 8(3), 57.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Cortés, M. Á., Yusà, V., & Hernández, F. (2011). UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and

- ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chemistry*, 126(2), 737-744.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516.
- Bhatnagar, D., Yu, J., & Ehrlich, K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology*, 81, 167–206.
- Bhatnagar, S., Betrán, F. J., & Transue, O. K. (2003). Agronomic performance, aflatoxin accumulation and protein quality of subtropical and tropical QPM hybrids in southern U.S. *Maydica*, 48(2), 113–124.
- Bilandžić, N., Božić, D., Dokić, M., Sedak, M., Kolanović, B. S., Varenina, I., & Cvetnić, Ž. (2014). Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food Control*, 43, 18–21.
- Bilandžić, N., Tanković, S., Jelušić, V., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., Luburić, D. B., & Cvetnić, Ž. (2016). Aflatoxin M1 in raw and UHT cow milk collected in Bosnia and Herzegovina and Croatia. *Food Control*, 68, 352–357.
- Bilandžić, N., Varenina, I., & Solomun, B. (2010). Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control*, 21(9), 1279-1281.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Taylor, J. H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A. J., & Philogene, B. J. R. (2003). Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93(6), 712-719.
- Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Handl, J., & Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4), 265–282.
- Biomin Mycotoxin Survey. (2014). <https://www.biomin.net/en/biomin-mycotoxin-survey/>
- Biomin Mycotoxin Survey. (2018). <https://www.biomin.net/en/biomin-mycotoxin-survey/>

- Blount, W. P. (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys*, 9(2), 52-55.
- Boudergue, C., Burel, C., Dragacci, S., Favrot, M. C., Fremy, J. M., Massimi, C., Avantaggiato, G. & Morgavi, D. (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications*, 6(9), 22E.
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S., & Morgavi, D. P. (2007). Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3197-3201.
- Boutigny, A. L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L., & Richard-Forget, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological research*, 113(6-7), 746-753.
- Callejo, A. (2015). Alimentación de precisión en vacuno lechero. *Frisona Española* 206: 104-109.
- Calsamiglia, S., Bach, A., de Blas, C., Fernández, C., & García-Rebollar, P. (2009). Necesidades nutricionales para rumiantes de leche. *Normas FEDNA*. 89 pp.
- Camardo Leggieri, M., Bertuzzi, T., Pietri, A., & Battilani, P. (2015). Mycotoxin occurrence in maize produced in Northern Italy over the years 2009-2011: Focus on the role of crop related factors. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 212-221.
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Celano, R., & Rastrelli, L. (2011). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereal products. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7648-7654.
- Campos, W. E., Rosas, L. B., Neto, A. P., Mello, R. A., & Vasconcelos, A. A. (2017). Extended validation of a sensitive and robust method for simultaneous quantification of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts by HPLC-FLD. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 90-96.

- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A. J., Peris-Vicente, J., & Sanchis, V. (2010). Incidencia de aflatoxina M1 y evaluación de la exposición en Cataluña (España). *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(3), 130–135.
- Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S., & Ramos, A. J. (2013). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 188–193.
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 109-120.
- Cassel, E.K., Campbell, B., Draper, M., & Epperson, B. (2012) Aflatoxins hazards in grain/Aflatoxicosis and livestock. South Dakota State University (SDSU).
- Çeçen, A. (2009). Comparison of aflatoxin M1 occurrence in milks of animals fed in stables and pastures. Yüzüncü Yıl University, Graduate School of Natural and Applied Sciences.
- CESFAC (Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para Animales). (2016). Manual de aditivos en alimentación animal. CESFAC.
- Chan, D., macdonald, S. J., Boughtflower, V., & Brereton, P. (2004). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1059(1-2), 13-16.
- Chanda, A., Roze, L. V., Pastor, A., Frame, M. K., & Linz, J. E. (2009). Purification of a vesicle-vacuole fraction functionally linked to aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Microbiological Methods*, 78(1), 28–33.
- Choochuay, S., Phakam, J., Jala, P., Maneeboon, T., & Tansakul, N. (2018). Determination of Aflatoxin B1 in Feedstuffs without Clean-Up Step by High-Performance Liquid

- 
- Chromatography. International journal of analytical chemistry, 2018.
- Chu, F. S. (1991). Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3-4), 291-306.
- Chun, H. S., Kim, H. J., Ok, H. E., Hwang, J. B., & Chung, D. H. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102(1), 385-391.
- Cismileanu, A., Voicu, G. E. O. R. G. E. T. A., Ciuca, V., & Ionescu, M. I. N. O. D. O. R. A. (2008). Determination of aflatoxin B1 in cereal-based feed by a high-performance chromatographic method. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, 41, 565-569.
- Codex Alimentarius. (1997). Código de prácticas para reducir la aflatoxina B1 presente en las materias primas y los piensos suplementarios para animales productores de leche. CAC/RCP 45-1997. FAO/WHO.
- Codex Alimentarius. (2014). General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969. FAO/WHO.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H., & Taniwaki, M. H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 141-144.
- Cotty, P. J., & Bhatnagar, D. (1994). Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2248-2251.
- Cotty, P. J., & Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 109-115.

- 
- Cotty, P. J., Howell, D. R., Bock, C., & Tellez, A. (1997). Aflatoxin contamination of commercially grown transgenic Bt cottonseed. In Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf. National Cotton Council of America, Memphis, TN (pp. 108–110).
- Coulombe, R. A., Huie, J. M., Ball, R. W., Sharma, R. P., & Wilson, D. W. (1991). Pharmacokinetics of intratracheally administered aflatoxin B1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 109(2), 196–206.
- Craufurd, P. Q., Prasad, P. V. V., Waliyar, F., & Taheri, A. (2006). Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. *Field Crops Research*, 98(1), 20–29.
- Cruz, L., Pinto, V. F., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1-14.
- Dalie, D. K. D., Deschamps, a M., Atanasova-Penichon, V., & Richard-Forget, F. (2010). Potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) isolated from maize leaf to suppress fumonisin-producing fungal growth. *Journal of Food Protection*, 73(6), 1129–1137.
- De Rijk, T. C., Van Egmond, H. P., Van der Fels-Klerx, H. J., Herbes, R., De Nijs, M., Samson, R. A., & Van der Spiegel, M. (2015). A study of the 2013 Western European issue of aflatoxin contamination of maize from the Balkan area. *World Mycotoxin Journal*, 8(5), 641-651.
- De Roma, A., Rossini, C., Ritieni, A., Gallo, P., & Esposito, M. (2017). A survey on the Aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. *Food Control*, 81, 30–33.
- Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtmann, C., Oldano, F., Ruffier, M., Sezian, A., & Bandirola, C. (2007). Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy

- during 2004-2005. *Food Control* 18, 1263–1266.
- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados. *Diario Oficial de la Unión Europea*, DO L 221 de 17.08.2002, p. 8.
- Denli, M., Blandon, J. C., Guynot, M. E., Salado, S., & Perez, J. F. (2008). Efficacy of a new ochratoxin-binding agent (ocratox) to counteract the deleterious effects of ochratoxin A in laying hens. *Poultry Science*, 87(11), 2266–2272.
- Di Gregorio, M.C., de Neeff, D.V., Jager, A.V., Corassin, C.H., de Pinho Carão, A.C., de Albuquerque, R., de Azevedo, A.C., & Fernandes Oliveira, C.A. (2014). Mineral adsorbents for prevention mycotoxins in animal feeds. *Toxin Reviews* 33, 125–135.
- Di Natale, F., Gallo, M., & Nigro, R. (2009). Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 186–191.
- Díaz, D. E., Hagler, W. M., Blackwelder, J. T., Eve, J. A., Hopkins, B. A., Anderson, K. L., Jones, F.T., & Whitlow, L. W. (2004). Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, 157(2), 233–241.
- Díaz, G. J. (2002). Evaluation of the efficacy of a feed additive to ameliorate the toxic effects of 4, 15-diacetoxiscirpenol in growing chicks. *Poultry Science*, 81(10), 1492–1495.
- Díaz, G. J., & Espitia, E. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogota, Colombia. *Food additives and contaminants*, 23(8), 811-815.
- Díaz-Llano, G., & Smith, T. K. (2006). Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts. *Journal of Animal Science*, 84(9), 2361–2366.

- 
- Díaz-Royón, F., & García, A. (2012). Utilización de maíz dañado por sequía como forraje. *Frisona Española* 191: 102-104.
- Directiva 2002/32/CE, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, DO L 140 de 30.5.2002, p. 10.
- Directiva 96/23/CE, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, DO L 125 de 23.5.1996, p. 10.
- Dragacci, S., Grosso, F., & Gilbert, J. (2001). Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84(2), 437-443.
- Drejer Storm, I. M. L., Rasmussen, R. R., & Rasmussen, P. H. (2014). Occurrence of Pre- and Post-Harvest Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Danish Maize Silage. *Toxins*, 6(8), 2256–2269.
- Duncan, H.E., & Hagler, M. (2008) Aflatoxins and other mycotoxins. *Oklahoma Cooperative Extension. Fact Sheet (CR-2105-1203)*, Oklahoma, USA.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal* (2004) 39, 1-27
- EFSA (European Food Safety Authority). (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal* (2007) 446, 1 - 127.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific Opinion on the efficacy of

- Bentonite (dioctahedral montmorillonite) for all species. EFSA Journal 2011; 9(6):2276.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for energy. EFSA Journal 2013; 11(1):3005, 112 pp.
- Egal, S., Hounsa, A., Gong, Y. Y., Turner, P. C., Wild, C. P., Hall, A. J., & Cardwell, K. F. (2005). Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 104(2), 215–224.
- Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montalbano, B. G., & Cotty, P. J. (2007). Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International journal of food microbiology*, 114(2), 153-159.
- ELIKA (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria). (2013). Aflatoxinas M1 en leche. <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo10/aflatoxina%20m1%20leche.pdf>
- Erdogan-Orhan, I., Baki, E., Şenol, S., Yilmaz, G., Dvorackova, E., Snoblova, M., & Samman, S. (2014). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 26(2), 3937–3950.
- Fallah, A. A., Barani, A., & Nasiri, Z. (2015). Aflatoxin M1 in raw milk in Qazvin Province, Iran: a seasonal study. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(3), 195-198.
- Fallah, A. A., Fazlollahi, R., & Emami, A. (2016). Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk of four dairy species in Yazd, Iran. *Food Control*, 68, 77–82.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper 81. FAO, Rome, Italy
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2011). Seguridad Alimentaria y Nutricional. Food and Agriculture Organization of the United Nations,

3(4), 2–8.

Faucet-Marquis, V., Joannis-Cassan, C., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2014). Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B 1, zearalenone and ochratoxin A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7583-7596.

FDA (Food and Drug Administration). (2005). Chemical Contaminants, Metals, Natural Toxins & Pesticides Guidance Documents & Regulations <https://www.fda.gov/Food/guidanceregulation/default.htm>

Fernández, A., Hernández, M., Verde, M. T., & Sanz, M. (2000). Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64(1), 53–58.

Ferrochio, L., Cendoya, E., Farnochi, M. C., Massad, W., & Ramirez, M. L. (2013). Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 215–220.

Ferruz, E., Loran, S., Herrera, M., Giménez, I., Bervis, N., Bárcena, C., Carramiñana, J.J., Juan, T., Herrera, A., & Ariño, A. (2016). Inhibition of *Fusarium* growth and mycotoxin production in culture medium and in maize kernels by natural phenolic acids. *Journal of food protection*, 79(10), 1753-1758.

Fink-Gremmels, J. (2008). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Veterinary Journal*, 176(1), 84–92.

Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., de Cerain, A. L., & González-Peñas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53, 163-176.

Friedman, M., & Rasooly, R. (2013). Review of the inhibition of biological activities of food-

- related selected toxins by natural compounds. *Toxins*, 5(4), 743-775.
- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (1991). Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. *Developments in Food Science (Netherlands)*, 26, 441-476.
- Fu, Z., Huang, X., & Min, S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography A*, 1209(1-2), 271-274.
- Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(2), 217-234.
- Gallo, A., & Trevisi, E. (2018). Micotoxinas: riesgos para los rumiantes. *Frisona Española* 225: 96-98.
- Gallo, A., Giuberti, G., Frisvad, J. C., Bertuzzi, T., & Nielsen, K. F. (2015). Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*, 7(8), 3057-3111.
- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Fusconi, G., Galvano, M., Piva, A., & Piva, G. (1996). Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. *Journal of food protection*, 59(5), 551-554.
- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Gagliardi, L., Ciotti, S., Luisi, S., & Gazzolo, D. (2008). Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(4), 496-501.
- Gandomi, H., Misaghi, A., Basti, A. A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A., & Javan, A. J. (2009). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2397-2400.

- Garrido, N. S., Iha, M. H., Santos Ortolani, M. R., & Duarte Fávaro, R. M. (2003). Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 20(1), 70–73.
- Geiser, D. M. (2009). Sexual structures in *Aspergillus*: Morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*, 47(Suppl. 1), S21–S26.
- Geiser, D. M., Timberlake, W. E., & Arnold, M. L. (1996). Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Molecular Biology and Evolution*, 13(6), 809–817.
- Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 113-125.
- Giménez, I. (2012). Toxinas de *Fusarium* en germen de trigo: efecto de la molienda y contaminación en productos derivados. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.
- Gimeno, A. (2004). Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control. Associação Portuguesa Dos Industriais de Alimentos Compostos Para Animais (IACA), *Alimentação Animal*, 49, 32–44.
- Gimeno, A., & Martins, M.L. (2003). “Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos”. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres graficos del SRL, Buenos Aires (Argentina). Pp. 1-160.
- Giorni, P. (2007). Impact of Environmental and Plant Factors on *Aspergillus* Section Flavi. PhD Thesis, University of Cranfield (Reino Unido).
- Giray, B., Girgin, G., Engin, A. B., Aydın, S., & Sahin, G. (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food control*, 18(1), 23-29.
- Gizachew, D., Szonyi, B., Tegegne, A., Hanson, J., & Grace, D. (2016). Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control*, 59, 773–779.

- Gnonlonfin, G. J. B., Adjovi, Y. C., Tokpo, A. F., Agbekponou, E. D., Ameyapoh, Y., de Souza, C., & Sanni, A. (2013). Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. *Food Control*, 34(1), 115–120.
- Gnonlonfin, G. J. B., Hell, K., Adjovi, Y., Fandohan, P., Koudande, D. O., Mensah, G. A., Brimer, L. (2013). A Review on Aflatoxin Contamination and Its Implications in the Developing World: A Sub-Saharan African Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(4), 349–365.
- Golge, O. (2014). A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Adana province of Turkey. *Food Control*, 45, 150-155.
- Golge, O., Hepsag, F., & Kabak, B. (2013). Incidence and level of aflatoxin contamination in chilli commercialised in Turkey. *Food Control*, 33(2), 514-520.
- Gómez-Arranz, E. (2008). Determinación analítica e incidencia de aflatoxina M1 en leche cruda y sus derivados. Thesis Ph.D., University of Navarra. Pamplona, Spain.
- Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P. C., Sutcliffe, A. E., Hall, A. J., & Wild, C. P. (2004). Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: A longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*, 112(13), 1334–1338.
- Grajewski, J., Błajet-Kosicka, A., Twarużek, M., & Kosicki, R. (2012). Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006–2009. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(5), 870-877.
- Griessler, K., Rodrigues, I., Handl, J., & Hofstetter, U. (2010). Occurrence of mycotoxins in Southern Europe. *World Mycotoxin Journal*, 3(3), 301-309.
- Guo, H., Zhou, X., Zhang, Y., Song, B., Zhang, J., & Shi, H. (2016). Highly sensitive and simultaneous detection of melamine and aflatoxin M1 in milk products by multiplexed planar waveguide fluorescence immunosensor (MPWFI). *Food Chemistry*, 197, 359–

366.

- Gürbay, A., Sabuncuoğlu, S. A., Girgin, G., Şahin, G., Yiğit, Ş., Yurdakök, M., & Tekinalp, G. (2010). Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 314–319.
- Guzmán de Peña, D. (2007). Exposure to aflatoxin B1 in experimental animals and its public health significance. *Salud Publica de México*, 49, 227–235.
- Han, R. W., Zheng, N., Wang, J. Q., Zhen, Y. P., Xu, X. M., & Li, S. L. (2013). Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food control*, 34(1), 35-39.
- Harper, A. F., Estienne, M. J., Meldrum, J. B., Harrell, R. J., & Diaz, D. E. (2010). Assessment of a hydrated sodium calcium aluminosilicate agent and antioxidant blend for mitigation of aflatoxin- induced physiological alterations in pigs. *Journal of Swine Health and Production*, 18(6), 282 – 289.
- Hashem, M., & Alamri, S. (2010). Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(2), 167-175.
- Hashemi, M. (2016). A survey of aflatoxin M1 in cow milk in Southern Iran. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4), 888-893.
- Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S., & Ahokas, J. T. (2001). Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3086-3091.
- Hell, K., Cardwell, K. F., Setamou, M., & Poehling, H. M. (2000). The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, West Africa. *Journal of Stored Products Research*, 36(4), 365–382.
- Hernández, R., & Navarro, I. (2015). Surveillance of aflatoxin content in dairy cow feedstuff

- from Navarra (Spain). *Animal Feed Science and Technology*, 200, 35-46.
- Horn, B. W. (2005). Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Aflatoxin and Food Safety*, 1, 95-116.
- Horn, B. W., Moore, G. G., & Carbone, I. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101(3), 423-429.
- Horwitz, W., Kamps, L. R., & Boyer, K. W. (1980). Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 63(6), 1344-1354.
- Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., & Jiang, W. (2010). Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules*, 15(11), 7558-7569.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., & Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122(2), 179-188.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Lyon: IARC Scientific Publication 56: 19-23.
- IARC. (International Agency for Research on Cancer). (2002). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 82 Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Iarcpress Lyon France, 82, 590.
- IARC. (International Agency for Research on Cancer). (2012). Aflatoxins. Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks on Humans, 100 F, 225-248.
- Ibáñez-Vea, M., Martínez, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., & de Cerain, A. L. (2011). Co-

- occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market. *Food Control*, 22(12), 1949-1955.
- Iloabuchi, G. (2017). *Synthesis and Interventive Performances of Alumina, Silica and their Complexes in Aflatoxin Adsorption In-Vitro*. Master Thesis, Kwame Nkrumah University (Ghana).
- INFOCARNE. (2015). Alimentos para vacas lecheras. [http://www.infocarne.com/bovino/vacas\\_lecheras.asp](http://www.infocarne.com/bovino/vacas_lecheras.asp)
- International Organization for Standardization. (1994). ISO 5725-2: 1994: Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results-Part 2. Methods for the Determination of Repeatability and Reproducibility. International Organization for Standardization.
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., & Ariño, A. (2011). Aflatoxin M1 contamination in cow and buffalo milk samples from the North West Frontier Province (NWFP) and Punjab provinces of Pakistan. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 4(4), 282-288.
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., & Malik, N. (2017). The seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and dairy products and assessment of dietary intake in Punjab, Pakistan. *Food Control*, 79, 292-296.
- Ismail, M. A. (2001). Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-Saharan tropical East African countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. *Mycopathologia*, 150(2), 67-84.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (1995). Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (1995) 1699-1723.
- Iyer, R. S., Coles, B. F., Raney, K. D., Thier, R., Guengerich, F. P., & Harris, T. M. (1994). DNA

- Adduction by the Potent Carcinogen Aflatoxin B1: Mechanistic Studies. *Journal of the American Chemical Society*, 116(5), 1603–1609.
- Izquierdo, A. C., Campos, V. M. X., Jiménez, M. S. C., Jiménez, C. A. C., & Guerra, J. E. (2007). Factores que predisponen a enfermedades causantes de abortos en vacas lecheras. Una revisión. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 7-21.
- Jager, A. V., Tedesco, M. P., Souto, P. C. M. C., & Oliveira, C. A. F. (2013). Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33(1), 87–92.
- Jahanshiri, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2015). Inhibitory effect of eugenol on aflatoxin B1 production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of major genes in the toxin biosynthetic pathway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(7), 1071-1078.
- JECFA (Joint Expert for Food Additives of the Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2001). Fifty-sixth meeting of JECFA. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food; WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutrition Paper 74. Geneva: WHO.
- JECFA (Joint Expert for Food Additives of the Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2005). Evaluation of certain food additives. *World Health Organ Tech. Rep. Ser.* 928, 1-156.
- Johnson, N. M., Qian, G., Xu, L., Tietze, D., Marroquin-Cardona, A., Robinson, A., Phillips, T. D., & Guerra, F. (2010). Aflatoxin and PAH exposure biomarkers in a US population with a high incidence of hepatocellular carcinoma. *Science of the Total Environment*, 408(23), 6027-6031.
- Joseph, G. S., Jayaprakasha, G. K., Selvi, A. T., Jena, B. S., & Sakariah, K. K. (2005). Antiaflatoxic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. *International Journal*

- of Food Microbiology, 101(1-2), 153-160.
- Jouany, J.P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137, 342-362.
- Jouany, J.P., & Diaz, D.E. (2005). Effects of mycotoxins in ruminants. In *Mycotoxins Blue Book*; Nottingham University Press: Thrumpton, Nottingham, UK. pp. 295-321.
- Jovanović, D., Marković, R., Radulović, S., Grdović, S., Krstić, M., & Šefer, D. (2018). Aflatoxins in feed. *Veterinarski Glasnik*, 72 (1), 14-21.
- Junta de Andalucía. (2017). Plan Integral de Vigilancia y Control de Aflatoxinas. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- Junta de Andalucía. (2018). Manual técnico sobre controles de la cadena alimentaria en el sector lácteo de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 593-619.
- Kana, J. R., Tegua, A., & Tchoumboue, J. (2010). Effect of dietary plant charcoal from *Canarium schweinfurthii* Engl. And maize cob on aflatoxin B1 toxicosis in broiler chickens. *Advances in Animal Biosciences*, 1(2), 462-463.
- Kana, J. R., Tegua, A., Mungfu, B. M., & Tchoumboue, J. (2011). Growth performance and carcass characteristics of broiler chickens fed diets supplemented with graded levels of charcoal from maize cob or seed of *Canarium schweinfurthii* Engl. *Tropical Animal Health and Production*, 43(1), 51-56.
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32(4), 179-205.

- Keith, G. T. (2007). Water management in agriculture: ten years of World Bank assistance, 1994-2004. The World Bank.
- Keith, G. T. (2007). Water management in agriculture: ten years of World Bank assistance, 1994-2004. The World Bank.
- Keyl, A. C., & Booth, A. N. (1971). Aflatoxin effects in livestock. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(10), 599–604.
- Khodadadi, M., Malekpour, A., & Mehrgardi, M. A. (2018). Aptamer functionalized magnetic nanoparticles for effective extraction of ultratrace amounts of aflatoxin M1 prior its determination by HPLC. *Journal of Chromatography A*, 1564, 85-93.
- Kim, J. H., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., Varga, J., & Campbell, B. C. (2008). Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 49–60.
- Kleter, G. A., & Marvin, H. J. (2009). Indicators of emerging hazards and risks to food safety. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 1022-1039.
- Klich, M. A. (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94(1), 21–27.
- Kolossova, A., & Stroka, J. (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal*, 4(3), 225-256.
- Kong, C., Shin, S. Y., & Kim, B. G. (2014). Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: An in vitro approach. *Springerplus*, 3(1), 1–4.
- Kos, J. (2015). Aflatoxins: occurrence analysis, risk assessment and optimization of its determination in maize and milk. PhD Thesis, University of Novi Sad (Serbia).
- Kos, J., Mastilović, J., Hajnal, E. J., & Šarić, B. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009-2012. *Food Control*, 34(1), 31–34.

- Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., & Krska, R. (2016). Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. *Toxins*, 8(12), 1–29.
- Krishan, M., & Kretser, A. (2014). Toxicology and risk assessment of chemical mixtures. *Toxicology Letters*, 229, S213.
- Krishnamachari, K. A. V. R., Nagarajan, V., Bhat, R. V., & Tilak, T. B. G. (1975). Hepatitis due to aflatoxicosis. An Outbreak in Western India. *The Lancet*, 305(7915), 1061–1063.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., macdonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(2), 152–163.
- Kuilman, M. E. M., Maas, R. F. M., & Fink-Gremmels, J. (2000). Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1 in bovine hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 14(4), 321–327.
- Kwon, I., Lee, H. H., Choi, J., Shin, J. K., Seo, S. H., Choi, S. W., & Chun, H. S. (2011). Extended-gate metal oxide semiconductor field effect transistor-based biosensor for detection of deoxynivalenol. *Japanese Journal of Applied Physics*, 50(6S), 06GL08.
- Lacombe, A., Wu, V. C., Tyler, S., & Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157: H7. *International journal of food microbiology*, 139(1-2), 102-107.
- Lai, X. W., Sun, D. L., Ruan, C. Q., Zhang, H., & Liu, C. L. (2014). Rapid analysis of aflatoxins B 1, B 2, and ochratoxin A in rice samples using dispersive liquid–liquid microextraction combined with HPLC. *Journal of Separation Science*, 37(1-2), 92-98.
- Lakkireddy, K., Kondapalli, K., & Sambasiva, K. (2014). Aflatoxins in Food and Feed: The Science of Safe Food. *Research & Reviews: Journal of Food Science and Technology*, 3,

6-11.

- Leblanc, J. C., Tard, A., Volatier, J. L., & Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants*, 22(7), 652-672.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Gupta, N. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1763-1767.
- Lozano, M. C., & Diaz, G. J. (2006). Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B1 in four poultry species. *British Poultry Science*, 47(6), 734-741.
- Lynch, G. P., Covey, F. T., Smith, D. F., & Weinland, B. T. (1972). Response of calves to a single dose of aflatoxin. *Journal of Animal Science*, 35(1), 65-68.
- Madrigal-Santillán, E., Álvarez-González, I., Márquez-Márquez, R., Velázquez-Guadarrama, N., & Madrigal-Bujaidar, E. (2007). Inhibitory effect of mannan on the toxicity produced in mice fed aflatoxin B 1 contaminated corn. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(3), 466-472.
- Mahmoudi, R., Norian, R., Katirae, F., & Pajohi Alamoti, M. R. (2013). Total aflatoxin contamination of maize produced in different regions of Qazvin-Iran. *International Food Research Journal*, 20(5), 2901-2904.
- Mao, J., Lei, S., Liu, Y., Xiao, D., Fu, C., Zhong, L., & Ouyang, H. (2015). Quantification of aflatoxin M1 in raw milk by a core-shell column on a conventional HPLC with large volume injection and step gradient elution. *Food Control*, 51, 156-162.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2018). Datos de producción de piensos 2017. CNCAA - Informe interno.

- [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/informedatosdeproducciondepiensosenespana2017\\_tcm30-459584.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/informedatosdeproducciondepiensosenespana2017_tcm30-459584.pdf)
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2019). Informe de Coyuntura del Sector Vacuno de leche – Febrero 2019. Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios.
- Marasas, W. F. O., Gelderblom, W. C. A., Shephard, G. S., & Vismer, H. F. (2008). Mycotoxins: A global problem. In J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, & A. Visconti (Eds.). *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade* (pp. 29–40). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI.
- Marin, D. E., & Taranu, I. (2012). Overview on aflatoxins and oxidative stress. *Toxin Reviews*, 31(3-4), 32-43.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
- Martins, H. M., Guerra, M. M. M., & Bernardo, F. M. D. A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal. *Rev Iberoam Micol*, 24, 69-71.
- Martins, H. M., Marques, M., Almeida, I., Guerra, M. M., & Bernardo, F. (2008). Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. *Mycotoxin Research*, 24(1), 19-23.
- Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G., & Díaz, D. (2007). Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1(9), 1344–1350.
- Medina, A., Gonzalez-Jartin, J. M., & Sainz, M. J. (2017). Impact of global warming on mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 18, 76–81.
- Medina, A., Rodriguez, A., & Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 348.

- 
- Medina, A., Rodríguez, A., Sultan, Y., & Magan, N. (2015). Climate change factors and *Aspergillus flavus*: effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal* 8, 171–179.
- Mesfin, R., Assefa, G., Assefa, F. (2018). Determination of aflatoxin in dairy feeds and milk in some selected areas of Ethiopia. *Food and Environment Safety Journal*, 17(3), 286 - 299.
- Miele, M., Donato, F., Hall, A. J., Whittle, H., Chapot, B., Bonatti, S., Wild, C. P. (1996). Aflatoxin exposure and cytogenetic alterations in individuals from the Gambia, West Africa. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 349(2), 209–217.
- Miller, J. D. (2008). Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(2), 219–230.
- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., & Filippi, L. (2009). Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and chemical toxicology*, 47(5), 1009-1021.
- Mohammadi, H. (2011). A review of aflatoxin M1, milk, and milk products. In *Aflatoxins- Biochemistry and Molecular Biology*. Intechopen.
- Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2007). *Food microbiology: an introduction* (No. Ed. 2). ASM press.
- Moon, Y. S., Kim, H. M., Chun, H. S., & Lee, S. E. (2018). Organic acids suppress aflatoxin production via lowering expression of aflatoxin biosynthesis-related genes in *Aspergillus flavus*. *Food control*, 88, 207-216.
- Moore, G. G., Olarte, R. A., Horn, B. W., Elliott, J. L., Singh, R., O'Neal, C. J., & Carbone, I. (2017).

- Global population structure and adaptive evolution of aflatoxin-producing fungi. *Ecology and Evolution*, 7(21), 9179-9191.
- Moretti, A., Pascale, M., & Logrieco, A. F. (2019). Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology*, 84, 38-40.
- Munkvold, G., Hurburgh, C., Meyer, J. (2009). Aflatoxins in corn. Iowa State University. Extension, PM 1800.
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. M. (2006). Food mycotoxins: an update. *Journal of food science*, 71(5), R51-R65.
- Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Lo Magro, S., Palermo, C., Centonze, D., & Palermo, D. (2009). Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 26 (10): 1402-1410.
- Mycobank (2019). International Mycological Association. <http://www.mycobank.org/>
- Navas, S. A., Sabino, M., & Rodríguez-Amaya, D. B. (2005). Aflatoxin M1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 22(5), 457-462.
- Nazari, L., Patteri, E., Terzi, V., Morcia, C., & Rossi, V. (2014). Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology*, 39, 19-26.
- Neeff, D. V., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Bermudez, A. J., Dakovic, A., Murarolli, R. A., & Oliveira, C. A. F. (2013). In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed

- aflatoxin B1. *Poultry Science*, 92(1), 131–137.
- Negash, D. (2018). A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering* 8(2):190–197
- Nesci, A., & Etcheverry, M. (2009). Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *Fungal ecology*, 2(1), 44-51.
- Nesic, K. (2018). Mycotoxins–climate impact and steps to prevention based on prediction. *Acta Veterinaria*, 68(1), 1-15.
- Newbern, P. M., & Butler, W. H. (1969). Acute and Chronic Effects of Aflatoxin on the Liver of Domestic and Laboratory Animals : A Review. *Cancer Research*, 29(1), 236–250.
- Ngindu, A., Kenya, P. R., Ocheng, D. M., Omondi, T. N., Ngare, W., Gatei, D., & Arap Siongok, T. (1982). Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *The Lancet*, 319(8285), 1346–1348.
- Norma UNE-EN ISO 14123:2008 Productos alimenticios. Determinación de aflatoxina B1 y de la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en avellanas, cacahuetes, pistachos, higos y pimentón molido. Método por cromatografía líquida de alta resolución con transformación química postcolumna y purificación en columna de inmunoafinidad.
- Norma UNE-EN ISO 14501:2008 Leche y leche en polvo. Determinación del contenido de aflatoxina M1. Purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad y determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución.
- Norma UNE-EN ISO 14675:2003 Leche y productos lácteos. Guía para la descripción normalizada de inmunoanálisis enzimáticos competitivos. Determinación del contenido de aflatoxina M1.
- Norma UNE-EN ISO 15851:2010 Productos alimenticios. Determinación de aflatoxina B1 en

- alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método por HPLC con purificación en columna de inmunoafinidad y detección por fluorescencia.
- Norma UNE-EN ISO 16050:2011 Productos alimenticios. Determinación de aflatoxina B1, y contenido total de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución.
- Norma UNE-EN ISO 16050:2011 Productos alimenticios. Determinación de aflatoxina B1, y contenido total de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en cereales, nueces y productos derivados. Método por cromatografía líquida de alta resolución
- Norma UNE-EN ISO 17375:2007 Alimentos para animales. Determinación de aflatoxina B1
- NRC (National Research Council); Subcommittee Dairy Cattle Nutrition (2001). Nutrient requirements of Dairy Cattle. Seventh revised Edition. Ed National academy press, Washington, D.C., USA, 381 pp.
- Nuryono, N., Agus, A., Wedhastri, S., Maryudani, Y. B., Sigit Setyabudi, F. M. C., Böhm, J., & Razzazi-Fazeli, E. (2009). A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. *Food Control*, 20(8), 721–724.
- Oliveira, C. A., Rosmaninho, J. F., Butkeraitis, P., Correa, B., Reis, T. A., Guerra, J. L., & Moro, M. E. (2002). Effect of low levels of dietary aflatoxin B1 on laying Japanese quail. *Poultry Science*, 81(7), 976-980.
- Omar, S. S. (2016). Aflatoxin M1 levels in raw milk, pasteurised milk and infant formula. *Italian Journal of Food Safety*, 5(3): 5778.
- Otsuki, T. (2001). What price precaution? European harmonisation of aflatoxin regulations and African groundnut exports. *European Review of Agriculture Economics*, 28(3), 263–284.
- Ou, S., & Kwok, K.C. (2004). Review. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and

- applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261-1269.
- Ou, S., Kwok, K. C., & Kang, Y. (2004). Changes in in vitro digestibility and available lysine of soy protein isolate after formation of film. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 301-305.
- Ozay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S., & Yilmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) During growth, harvest, drying and storage: A 3-year study. *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 209-218.
- Pascale, M. (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, (117), 15-25.
- Passone, M. A., Resnik, S. L., & Etcheverry, M. G. (2005). In vitro effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus* section Flavi. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 682-691.
- Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43(7), 1902-1914.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Perusia, O. R., & Rodríguez, R. (2001). Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 87-116.
- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W., & Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. Nomius*. *Mycologia*, 93(4), 689-703.
- Phillips, T. D. (1999). Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci.*, 52(2 Suppl), 118-126.
- Phillips, T. D., Sarr, B. A., Clement, B. A., Kubena, L. F., & Harvey, R. B. (1991). Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin. *Mycotoxins*,

- Cancer, and Health. 1991.:223-237.
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V., & Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal by products. *Toxins* 8(2), 45.
- Pitt, J. I., Boesch, C., Whitaker, T. B., Clarke, R. (2018). A systematic approach to monitoring high preharvest aflatoxin levels in maize and peanuts in Africa and Asia. *World Mycotoxin Journal*, 11(4), 485-491.
- Piva, G.; Battilani, P.; Pietri, A. Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy. In *The Mycotoxin Factbook, Food and Feed Topics*; Barug, D., Bhatnagar, D., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2006; pp. 139–153
- Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., & Cvetnić, Ž. (2015). Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control*, 47, 221–225.
- Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Ž. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities–Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and chemical toxicology*, 47(5), 984-991.
- Probst, C. (2011). *Fungi associated with aflatoxin contamination in Africa*. The University of Arizona.

- 
- Qi, L. N., Li, L. Q., Chen, Y. Y., Chen, Z. H., Bai, T., Xiang, B. D., Peng, T. & Liu, T. W. (2013). Genome-wide and differential proteomic analysis of hepatitis B virus and aflatoxin B1 related hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *PLoS One*, 8(12), e83465.
- Ramos, A. J. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis* (Ediciones A. Madrid Vicente).
- Ramos, A. J., & Hernández, E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 65(1-4), 197-206.
- Ramos, A. J., Hernández, E., Plá-Delfina, J. M., & Merino, M. (1996). Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *International Journal of Pharmaceutics*, 128(1-2), 129-137.
- Ramos, A.J., & Hernández, E. (1996). In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Animal Feed Science Technology*, 62, 263-269.
- Ramos, A.J., & Hernández, E. (1997). Adsorción in vitro de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes: Montmorillonita. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 72-77
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) (2019). RASFF Portal disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?Event=searchform&cleansearch=1>
- Rawal, S., & Coulombe, R. A. (2011). Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes: The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(3), 349-354.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yoshinari, T., Rezaee, M.-B., Jaimand, K., Nagasawa, H., & Sakuda, S. (2008). Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. Essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal*

- of Food Microbiology, 123(3), 228–233.
- Reglamento (CE) nº 1831/2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea, DO L 268 de 18.10.2003, p. 29.
- Reglamento (CE) nº 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, DO L 364 de 20.12.2006, p. 5.
- Reglamento (CE) nº 401/2006, 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, DO L 70 de 9.3.2006, p. 12.
- Reglamento (CE) nº 767/2009, sobre la comercialización y la utilización de los piensos. Diario Oficial de la Unión Europea, DO L 229 de 1.9.2009, p. 1.
- Reglamento (UE) nº 2015/786, por el que se definen los criterios de aceptabilidad de los procesos de detoxificación aplicados a los productos destinados a la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea, DO L 125 de 21.5.2015, p. 10.
- Reglamento (UE) nº 574/2011, por el que se consolidan los anexos I y II de la Directiva 2002/32/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, DO L 159 de 17.6.2011, p. 7.
- Reglamento de Ejecución (UE) nº 1060/2013, relativo a la autorización de la bentonita como aditivo en piensos para todas las especies animales. Diario Oficial de la Unión Europea, DO L 289 de 31.10.2013, p. 33.
- Rodrigues, I., & Naehrer, K. (2012). Prevalence of mycotoxins in feedstuffs and feed surveyed worldwide in 2009 and 2010. *Phytopatol. Mediterr.* 51, 175–192.
- Rodríguez, M.L., Calonge, M.M., & Ordóñez, D. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives and Contaminants*, 20, 276-280.

- 
- Rodríguez-Carrasco, Y., Izzo, L., Gaspari, A., Graziani, G., Mañes, J., & Ritieni, A. (2018). Simultaneous Determination of AFB1 and AFM1 in Milk Samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. *Beverages*, 4(2), 43.
- Romero, S.M., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C., & Vaamonde, G. (2009). Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds. *Mycotoxin Research*, 25(3), 165-170.
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 19-34.
- Ruangwises, N., & Ruangwises, S. (2010). Aflatoxin M1 contamination in raw milk within the central region of Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(2), 195–198.
- Saad, A. M., Abdelgadir, A. M., & Moss, M. O. (1995). Exposure of infants to aflatoxin m1 from mothers' breast milk in Abu Dhabi, UAE. *Food Additives and Contaminants*, 12(2), 255–261.
- Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M. H. J., Van Der Doelen, M. A. M., & Fink-Gremmels, J. (2007). In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxinoses. *Mycopathologia*, 163(2), 81–90.
- Sakin, F., Tekeli, İ. O., Yipel, M., & Kürekci, C. (2018). Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Sürk, a Turkish dairy food, as studied by HPLC. *Food control*, 90, 317-323.
- Saleemi, M. K., Khan, M. Z., Khan, A., Javed, I., Ul Hasan, Z., Hameed, M. R., & Mehmood, M. A. (2012). Occurrence of toxigenic fungi in maize and maize-gluten meal from Pakistan. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), 219–224.

- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology*, 24(5), 465–473.
- Sampietro, D. A., Apud, G. R., Belizán, M. M. E., Vattuone, M. A., & Catalán, C. A. N. (2013). Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* isolated from maize of northwest Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 417–422.
- Sanchis, V., Sala, N., Palomes, A., Santamarina, P., & Burdaspal, P. A. (1986). Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in foods and feed in Spain. *Journal of Food Protection*, 49(6), 445-448.
- Scaglioni, P. T., Becker-Algeri, T., Drunkler, D., & Badiale-Furlong, E. (2014). Aflatoxin B1 and M1 in milk. *Analytica chimica acta*, 829, 68-74.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., & Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 231–237.
- SECYTA (Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines. (2014). <https://www.secyta.es/es/node/37>
- Selim, K. M., El-hofy, H., & Khalil, R. H. (2014). The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B1-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 22(2), 523–540.
- Shephard, G. S. (2008). Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(10), 1246–1256.

- 
- Shundo, L., De Almeida, A.P., Alaburda, J., Lamardo, L.C.A., Navas, S.A., Ruvieri, V., & Sabino M. S. (2016). Occurrence of aflatoxin M1 in bovine milk samples consumed in different regions of Brazil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 75: 1074.
- Shundo, L., Navas, S. A., Lamardo, L. C. A., Ruvieri, V., & Sabino, M. (2009). Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20(7), 655–657.
- Siddappa, V., Nanjegowda, D. K., & Viswanath, P. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in some samples of UHT, raw and pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4158–4162.
- Silvotti, L., Petterino, C., Bonomi, a, & Cabassi, E. (1997). Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins. *The Veterinary Record*, 141(18), 469–472.
- Simas, M. M., Botura, M. B., Correa, B., Sabino, M., Mallmann, C. A., Bitencourt, T. C., & Batatinha, M. J. (2007). Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*, 18(5), 404-408.
- Smith, T. K., Diaz-Llano, G., Korosteleva, S. N., & Yegani, M. (2007). Significance of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on livestock health and reproduction. In *Proceedings of the 13th International Congress in Animal Hygiene: Precision livestock farming–health and welfare aspects* (Vol. 1, pp. 698-694).
- Soriano, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Díaz de Santos, Madrid
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., & Oswald, I.P. (2012). Current situation of mycotoxin contamination and Co-occurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins* 4, 788–809.
- Sun, Z., Song, A., Wang, B., Wang, G., & Zheng, S. (2018). Adsorption behaviors of aflatoxin B1

- and zearalenone by organo-rectorite modified with quaternary ammonium salts. *Journal of Molecular Liquids*, 264, 645–651.
- Tabuc, C., Taranu, I., & Calin, L. (2011). Survey of mould and mycotoxin contamination of cereals in South-Eastern Romania in 2008–2010. *Archiva Zootechnica*, 14(4), 25-38.
- Thompson, M. (2000). Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, 125(3), 385-386.
- Thompson, M. (2000). Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, 125(3), 385-386.
- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G., Matijašević, S., & Duričić, M. (2003). Surfactant modified zeolites-new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials*, 61(1–3), 173–180.
- Trucksess, M., Weaver, C., Oles, C., D'Ovidio, K., & Rader, J. (2006). Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 89(3), 624–630.
- Turner, P. C., Sylla, A., Gong, Y. Y., Diallo, M. S., Sutcliffe, A. E., Hall, A. J., & Wild, C. P. (2005). Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in West Africa: A community-based intervention study. *Lancet*, 365(9475), 1950–1956.
- Uhlig, S., Eriksen, G. S., Hofgaard, I. S., Krska, R., Beltrán, E., & Sulyok, M. (2013). Faces of a changing climate: Semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. *Toxins*, 5(10), 1682–1697.

- 
- Van der Fels-Klerx, H. J., Adamse, P., Punt, A., & Van Asselt, E. (2018). Data Analyses and Modelling for Risk Based Monitoring of Mycotoxins in Animal Feed. *Toxins*, 10(2), 54.
- Van Der Fels-Klerx, H. J., Klemsdal, S., Hietaniemi, V., Lindblad, M., Ioannou-Kakouri, E., & Van Asselt, E. D. (2012). Mycotoxin contamination of cereal grain commodities in relation to climate in North West Europe. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(10), 1581-1592.
- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 147-157.
- Van Eijkeren, J. C., Bakker, M. I., & Zeilmaker, M. J. (2006). A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Additives and Contaminants*, 23(8), 833-838.
- Van Vleet, T. R., Klein, P. J., & Coulombe, R. A. (2002). Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin b1 in cytochrome P-450-expressing human lung cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 65(12), 853-867.
- Vasanthi, S., & Bhat, R. V. (1998). Mycotoxins in foods--occurrence, health & economic significance & food control measures. *The Indian Journal of Medical Research*, 108, 212-224.
- Vekiru, E., Fruhauf, S., Rodrigues, I., Ottner, F., Krska, R., Schatzmayr, G., & Bermudez, A. J. (2015). In vitro binding assessment and in vivo efficacy of several adsorbents against aflatoxin B 1. *World Mycotoxin Journal*, 8(4), 477-488.
- Veldman, A., Meijs, J. A. C., Borggreve, G. J., & Heeres-Van Der Tol, J. J. (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production*, 55(2), 163-168.
- Vieira, S. L. (2003). Nutritional implications of mould development in feedstuffs and alternatives to reduce the mycotoxin problem in poultry feeds. *World's Poultry Science*

- Journal, 59(1), 111–122.
- Vila Donat, P., Marín Sillué, S., Sanchís Almenar, V., & Ramos Girona, A. J. (2017). Evaluación de nuevos adsorbentes multimicotoxínicos basados en bentonitas para alimentación animal. *Revista de Toxicología*, 34, 1-21.
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A.J. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology* 114, 246–259
- Vinatea, V. J., & Gil, F. M. (1996). Sistema de alimentación unifeed. *MG Mundo ganadero*, (74), 33-36.
- Visser, R. G. (2006). Interpretation of interlaboratory comparison results to evaluate laboratory proficiency. *Accreditation and Quality Assurance*, 10(10), 521-526.
- Vlachou, S., Zoiopoulos, P. E., & Drosinos, E. H. (2004). Assessment of some hygienic parameters of animal feeds in Greece. *Animal Feed Science and Technology*, 117(3-4), 331-337.
- Völkel, I., Schröer-Merker, E., & Czerny, C. P. (2011). The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. *Food and Nutrition Sciences*, 2(08), 852-867.
- Waliyar, F., Reddy, S. V., Subramaniam, K., Reddy, T. Y., Devi, K. R., Craufurd, P. Q., & Scudamore, K. A. (2003). Importance of mycotoxins in food and feed in India. *Aspects of Applied Biology*, 68, 147-154.
- Wang, Y., Liu, X., Xiao, C., Wang, Z., Wang, J., Xiao, H., & Yue, T. (2012). HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control*, 28(1), 131-134.
- Wen, J., Kong, W., Wang, J., & Yang, M. (2013). Simultaneous determination of four aflatoxins

- and ochratoxin A in ginger and related products by HPLC with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and postcolumn photochemical derivatization. *Journal of Separation Science*, 36(23), 3709-3716.
- Whitaker, T. B. (2006). Sampling foods for mycotoxins. *Food additives and contaminants*, 23(1), 50-61.
- Whitlow, L. W. (2006). Evaluation of mycotoxin binders. In *Proceedings of the 4th Mid-Atlantic Nutrition Conference* (pp. 132-143).
- WHO (World Health Organization). (2015). Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. *World Health Organization*, 14, 2.
- Wielogórska, E., MacDonald, S., & Elliot, C.T. (2016). A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal* 9, 419-433.
- Wild, C. P., & Turner, P.C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6), 471-481.
- Williams, I. O., Ugbaje, S. A., Igile, G. O., & Ekpe, O. O. (2015). Occurrence of Aflatoxin in Some Food Commodities Commonly Consumed in Nigeria. *Journal of Food Research*, 4(5), 81-88.
- Williams, J. G., Deschl, U., & Williams, G. M. (2011). DNA damage in fetal liver cells of turkey and chicken eggs dosed with aflatoxin B1. *Archives of Toxicology*, 85(9), 1167-1172.
- Wogan, G. N. (1992). Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer research*, 52(7 Supplement), 2114s-2118s.
- Wolzak, A., Pearson, A. M., Coleman, T. H., Pestka, J. J., & Gray, J. I. (1985). Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 23(12), 1057-1061.

- Wolzack, A., Pearson, A. M., Coleman, T. H., Pestka, J. J., Gray, J. I., & Chen, C. (1986). Aflatoxin carryover and clearance from tissues of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 24(1), 37–41.
- Wong, B. Y., Lau, B. H., Yamasaki, T., & Teel, R. W. (1993). Inhibition of dexamethasone-induced cytochrome P450-mediated mutagenicity and metabolism of aflatoxin B1 by Chinese medicinal herbs. *European Journal of cancer Prevention*, 2(4), 351–356.
- Wood, G. E. (1992). Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *Journal of Animal Science*, 70(12), 3941-3949.
- Wu, F. (2015). Global impacts of aflatoxin in maize: Trade and human health. *World Mycotoxin Journal*, 8, 137–142.
- Wu, H. S., Luo, J., Raza, W., Liu, Y. X., Gu, M., Chen, G., & Shen, Q. R. (2010). Effect of exogenously added ferulic acid on in vitro *Fusarium oxysporum* f. Sp. *niveum*. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 448-453.
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., & Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 1-7.
- Xiong, J. L., Wang, Y. M., Nennich, T. D., Li, Y., & Liu, J. X. (2015). Transfer of dietary aflatoxin B1 to milk aflatoxin M1 and effect of inclusion of adsorbent in the diet of dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(4), 2545-2554.
- Yao, D. Sheng, Cao, H., Wen, S., Liu, D. Ling, Bai, Y., & Zheng, W. Jie. (2006). A novel biosensor for sterigmatocystin constructed by multi-walled carbon nanotubes (MWNT) modified with aflatoxin-detoxifizyme (ADTZ). *Bioelectrochemistry*, 68(2), 126–133.
- Yarru, L. P., Settivari, R. S., Antoniou, E., Ledoux, D. R., & Rottinghaus, G. E. (2009). Toxicological and gene expression analysis of the impact of aflatoxin B1 on hepatic function of male broiler chicks. *Poultry Science*, 88(2), 360–371.

- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., & Jouany, J. P. (2004). Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.*, 67(6), 1195-1200.
- Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., & Bennett, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Environmental and Microbiology* 70(3), 1253-1262.
- Zabka, M., & Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93(6), 1051–1056.
- Zachariasova, M., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Hajkova, K., Jiru, M., Vaclavikova, M., Zachariasova, A., Pospichalova, M., Florian, M., & Hajslova, J. (2014). Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 124–140.
- Zarba, A., Wild, C. P., Hall, A. J., Montesano, R., Hudson, G. J., & Groopman, J. D. (1992). Aflatoxin M1 in human breast milk from the Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. *Carcinogenesis*, 13(5), 891–894.
- Zhou, H. (2016). Mixture of palygorskite and montmorillonite (Paly-Mont) and its adsorptive application for mycotoxins. *Applied Clay Science*, 131, 140–143.
- Zinedine, A., González-Osnaya, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Idrissi, L., & Mañes, J. (2007). Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 25-29.
- Zirbes, J. M., & Milla, C. E. (2008). Steroid-sparing effect of omalizumab for allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 43(6),

607-610.



## **RESUMEN/SUMMARY**

---



## 9. RESUMEN

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas principalmente por el hongo *Aspergillus flavus* y la especie estrechamente relacionada *A. parasiticus*, que contaminan una gran variedad de materias primas, piensos y alimentos. Estas dos especies de *Aspergillus* son especialmente abundante en zonas tropicales y subtropicales de clima cálido, aunque su distribución se puede extender a otros lugares a consecuencia del cambio climático. Las aflatoxinas principales son B1, B2, G1 y G2, así como la aflatoxina M1 que aparece en la leche de animales alimentados con productos contaminados. Las aflatoxinas están considerados agentes genotóxicos y cancerígenos, clasificados en el Grupo 1 (carcinógenos para seres humanos) por el IARC.

En el presente estudio se ha investigado la presencia de aflatoxinas (AFB1 y AFM1) en productos destinados a la alimentación de ganado vacuno lechero (140 muestras) y en leche cruda de vaca (80 muestras), con métodos validados basados en inmunoafinidad, derivatización fotoquímica y determinación por HPLC con detector de fluorescencia.

Se ha detectado aflatoxina B1 en el 55% de las muestras de raciones completas para el ganado, con una mayor incidencia en pienso completo que en raciones unifeed. La concentración media de aflatoxina B1 en las raciones alimenticias fue 0,61 µg/kg, siendo significativamente superior en pienso completo que en raciones unifeed. Estas diferencias podrían ser debidas a la distinta proporción de concentrados y a la presencia de ingredientes como la semilla de algodón. Respecto de las materias primas analizadas, se detectó aflatoxina B1 en maíz grano y en ensilado de maíz. Dos lotes de raciones alimenticias completas sobrepasaron el contenido máximo de AFB1 de la Unión Europea.

La incidencia global de aflatoxina M1 en leche cruda de vaca fue del 33,8%, con un rango de 11 a 67 ng/kg. El patrón de contaminación reveló una mayor presencia de AFM1 en leche de vacas alimentadas con pienso completo frente a las raciones unifeed, así como en leche de primavera respecto a la producida en invierno. En total, 7,5% de las muestras superaron el contenido máximo de AFM1 de la UE, lo que indica un riesgo de salud pública, por lo que se calculó la exposición dietética de la población.

La tasa global de transferencia de aflatoxinas desde las raciones alimenticias a la leche fue de 3,2%, siendo mayor en las vacas alimentadas con pienso completo y en los ordeños de primavera. En una selección de lotes positivos, la transferencia de aflatoxinas superó el umbral del 6% estimado EFSA para vacas estabuladas de alta producción. Este estudio es el primero realizado en España para analizar la transferencia de aflatoxinas en ganado vacuno lechero.

Finalmente se han investigado estrategias de prevención y reducción del riesgo por aflatoxinas en la alimentación animal, basadas en antifúngicos naturales (ácidos fenólicos) y adsorbentes de micotoxinas. En general, los ácidos fenólicos fueron eficaces in vitro como fungistáticos, aunque mostraron menos capacidad para inhibir la síntesis de aflatoxinas. Por otro lado, los adsorbentes ensayados han mostrado buena capacidad in vitro para la fijación de aflatoxina B1, por lo que serían candidatos adecuados como aditivos tecnológicos para su aplicación en la reducción de aflatoxinas en los piensos.

En su conjunto, los resultados obtenidos indican la necesidad de establecer un plan integral de vigilancia y control de aflatoxinas en toda la cadena de producción, máxime teniendo en cuenta las predicciones de aumento del riesgo en Europa por el cambio climático.

## 10. SUMMARY

Aflatoxins are mycotoxins produced mainly by the fungus *Aspergillus flavus* and the closely related species *A. parasiticus*, which contaminate a wide variety of raw materials, feed and food. These two species of *Aspergillus* are especially abundant in tropical and subtropical zones of warm climate, although their distribution can be extended to other places as a result of climate change. The main aflatoxins are B1, B2, G1 and G2, as well as the aflatoxin M1 that appears in the milk of animals fed with contaminated feedstuffs. Aflatoxins are considered genotoxic and carcinogenic agents, classified in Group 1 (carcinogenic to humans) by IARC.

In the present study the presence of aflatoxins (AFB1 and AFM1) in products intended for dairy cattle feed (140 samples) and raw cow's milk (80 samples) was investigated, with validated methods based on immunoaffinity, photochemical derivatization and HPLC determination with fluorescence detector.

Aflatoxin B1 was detected in 55% of the samples of feed rations, with a greater incidence in complete feed than in unifeed rations. The mean concentration of aflatoxin B1 in the feed rations was 0.61 µg/kg, being significantly higher in complete feed than in unifeed rations. These differences could be due to the different proportion of concentrates and the presence of ingredients such as cottonseed. Regarding the feed materials analyzed, aflatoxin B1 was detected in corn grain and corn silage. Two batches of feed rations exceeded the maximum AFB1 content of the European Union.

The overall incidence of aflatoxin M1 in raw cow's milk was 33.8%, with a range of 11 to 67 ng/kg. The pattern of contamination revealed a greater presence of AFM1 in milk of cows fed complete feed versus unifeed rations, as well as in spring milk compared to that produced in winter. In total, 7.5% of the samples exceeded the maximum content of AFM1

of the EU, which indicates a public health risk, so the dietary exposure of the population was calculated.

The overall transfer rate of aflatoxins from feed rations to milk was 3.2%, being higher in cows fed with complete feed and in spring milkings. In a selection of positive batches, aflatoxin transfer exceeded the EFSA estimated 6% threshold for high production stall cows. This study is the first carried out in Spain to analyze the transfer of aflatoxins in dairy cattle.

Finally, strategies for the prevention and reduction of aflatoxins in animal feed were investigated, based on natural antifungals (phenolic acids) and mycotoxin adsorbents. In general, phenolic acids were effective *in vitro* as fungistatics, although they showed less ability to inhibit the synthesis of aflatoxins. On the other hand, the tested adsorbents showed good *in vitro* capacity for aflatoxin B1 binding, so they would be suitable candidates as technological additives for their application in the reduction of aflatoxins in feed.

As a whole, the results obtained indicate the need to establish an integrated plan for the surveillance and control of aflatoxins throughout the production chain, especially taking into account the predictions of increased risk in Europe due to climate change.

## **ANEXO**

---



## 11. ANEXO