



Universidad de Valladolid

Micotoxinas en panificación

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

PRESENTADO POR: Noelia García Román

TUTELADO POR: Irma Caro Canales, Manuel Gómez Pallarés



**Escuela Técnica Superior
de Ingenierías Agrarias Palencia**

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Tipos de micotoxinas	5
3. Peligros para la salud	8
4. Microorganismos productores de los diferentes tipos de micotoxinas	9
5. Análisis del contenido de micotoxinas.....	11
6. Legislación en relación con la presencia, máximos niveles de micotoxinas permitidos	13
7. Sistemas para reducir el contenido en micotoxinas (calor, pH, fermentación).....	15
8. Micotoxinas en cereales	17
9. Presencia de micotoxinas en harinas (blancas e integrales)	19
10. Micotoxinas en el pan.....	21
11. Conclusiones.....	22
Bibliografía.....	23
Anexos	30

Resumen

Los cereales son la base de la alimentación humana, siendo el principal ingrediente de numerosos productos derivados como la harina y el pan. Sin embargo, algunos cereales pueden contener compuestos tóxicos producidos por microorganismos. Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por un gran número de especies de mohos filamentosos y pueden ser encontradas en cereales contaminados por estos. Estos metabolitos son capaces de producir diversos problemas graves de salud debido a su capacidad hepatotóxica, genotóxica y carcinogénica. Se reconoce que hay cinco tipos mayoritarios de micotoxinas: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, tricotecenos y zearalenona. Las micotoxinas se pueden encontrar en los cereales antes de ser cosechados, en el almacenamiento y en las etapas del procesado. La legislación europea recoge en el Reglamento (CE) nº 1881/2006 los niveles máximos de micotoxinas establecidos en cereales y diversos productos a base de cereales para evitar problemas de salud. Debido al impacto negativo económico que supone la retirada de productos contaminados por el micelio fúngico y por micotoxinas en este tipo de alimentos, es necesario el estudio de las condiciones en las que se forman esos metabolitos con objeto de prevenir su formación. El objetivo de esta revisión bibliográfica fue recoger los principales factores que influyen en la formación, incidencia y concentración de micotoxinas, así como la identificación de las etapas del proceso de panificación en las que se pueden formar estos metabolitos y la investigación de los métodos de detección y cuantificación más recientes y eficaces.

Palabras clave: micotoxinas, mohos, cereales, trigo, pan, campo, almacenamiento, métodos de cuantificación.

Abstract

Staple cereals are very important to human nutrition and being the main ingredient for many cereal-based products like flour and bread. Nevertheless, some cereals could contain toxic compounds produced by microorganisms. Mycotoxins are secondary compounds produced by various filamentous mould species. These metabolites could be found in contaminated cereal grains. Moreover, mycotoxins are capable of causing diseases due to hepatotoxic, genotoxic and carcinogenic potentiality. Five majorities of mycotoxins are known: aflatoxins, fumonisins, ochratoxin, trichothecenes and zearalenone. Mycotoxins could be found in cereal grains before harvest, during storage and processing stages. European legislation summarizes on Regulation nº 1881/2006 that maximum levels of these compounds are established in cereals and cereal-based products to avoid health concerns. Due to a negative economic impact of the retirement of products contaminated by fungal mycelium and mycotoxins in this type of food is needed a deep study of the conditions of its formation to avoid it. This review aimed to cover main formation factors, occurrence and mycotoxin concentrations in bread. Furthermore, this review tries to identify the steps of the breadmaking process in which mycotoxins could be formed.

Keywords: mycotoxins, molds, cereals, wheat, bread, field, storage, quantification methods.

1. Introducción

Los cereales son las primeras plantas cultivadas por los humanos desde hace más de 10000 años. Estos aportan nutrientes esenciales como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos esenciales, fibra, vitaminas del complejo B y E y minerales que se consideran claves en la alimentación humana.

Los cereales son la base de la alimentación humana, por ello, es fundamental asegurar la inocuidad microbiológica de estos y sus derivados, así como prevenir los problemas sanitarios en la población, ya que estos metabolitos secundarios son genotóxicos, hepatotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos.

La presencia de estos metabolitos conlleva un gran impacto económico debido a la retirada de los productos contaminados por micotoxinas haciendo necesario el estudio de las técnicas de análisis de alimentos, así como los métodos de reducción de micotoxinas desde el campo hasta el procesado de estos cereales.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de ciertos tipos de mohos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Yang et al., 2020). Se trata de moléculas de un tamaño menor de 1000 Daltons. El término micotoxina se divide en “mico” cuyo significado es hongo, y “toxina”, que quiere decir veneno. Estas sustancias son catalogadas como los agentes más tóxicos encontrados en alimentos y piensos, siendo una de las amenazas potenciales para la salud de los animales y humanos. Su origen químico radica en estructuras polipeptídicas y derivados de aminoácidos. Esta estructura se caracteriza por la resistencia a operaciones unitarias utilizadas en el procesado en los alimentos, como por ejemplo, los tratamientos con calor, extrusión o nixtamalización. Por esta razón, se consideran un peligro para la salud pública y se han realizado diversas investigaciones y estudios que permitan evitar su presencia en los alimentos (Pereira et al., 2014; Mousavi et al., 2018; El-Sayed et al., 2022).

Las micotoxinas más importantes, atendiendo a su frecuencia de aparición y a su toxicidad, son las aflatoxinas (AF), fumonisinas (FM), tricotecenos (TRC) (deoxynivalenol (DON) y toxinas T2 y HT2), ocratoxinas (OT), patulina (PAT) y zearalenona (ZEN) (Ji et al., 2022; Pereira et al., 2014). Algunos metabolitos derivados de las micotoxinas dan lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) como pueden ser los iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos. Los tres tipos de ROS son los responsables de daños en el ADN con efectos cancerígenos y desregulación celular y

mitótica produciendo efectos nefrotóxicos en el organismo afectado (El-Sayed et al., 2022).

La frecuencia de aparición de las micotoxinas depende del crecimiento de los mohos según la matriz alimentaria que se trate. Los mohos requieren la presencia de carbono y nitrógeno para desarrollarse y derivado de ese crecimiento producen descomposición de la materia orgánica. Por ello, los cereales, debido a su alto contenido en hidratos de carbono y proteínas, son un sustrato adecuado para el desarrollo de los mohos (López-Rodríguez et al., 2008)

En la mayoría de casos, las variantes más tóxicas de micotoxinas se relacionan con el contenido de humedad en el sustrato, temperatura, composición del alimento y de la humedad relativa del entorno (El-Sayed et al., 2022). También, influye la susceptibilidad del hospedador animal o el humano en el momento de la ingesta, siendo factores clave la especie, la edad, la nutrición y la exposición a estas. Además, aunque las micotoxinas se encuentren en cantidades bajas en las muestras de alimentos, la presencia de varias micotoxinas de forma simultánea produce efectos sinérgicos potenciando su toxicidad (Kralj Cigić y Prosen, 2009; Pereira et al., 2014).

La formación de micotoxinas en alimentos a base de cereales comienza en el campo y en el almacenamiento de estos cereales, bajo unas condiciones de temperatura entre los 20-25°C, de pH entre 4 y 8 y una humedad relativa entre 80-90% (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015; Neme y Mohammed, 2017). En el caso del crecimiento de mohos fitopatógenos como los que pertenecen al género *Fusarium*, la formación de micotoxinas y por tanto su contaminación se produce en los granos aún no cosechados debido que invaden su sustrato (Astudillo y Nacipucha, 2010; Terzi et al., 2014; Neme y Mohammed, 2017). Sin embargo, los mohos saprofitos como *Aspergillus* o *Penicillium* crecen y desarrollan su metabolismo en los granos durante la etapa de transporte y almacenamiento, permitiendo así la formación de micotoxinas (Astudillo y Nacipucha, 2010; Neme y Mohammed, 2017).

El objetivo de esta revisión bibliográfica fue hacer una síntesis de los principales factores que influyen en la formación, incidencia y concentración de micotoxinas, así como la identificación de las etapas del proceso de panificación en las que se pueden formar estos metabolitos y los métodos cuantificación de estas.

2. Tipos de micotoxinas

Más de 300 especies de mohos son productores de micotoxinas. Los 5 grupos mayoritarios de micotoxinas son: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, tricotecenos y zearalenona (Kralj Cigić y Prosen, 2009; Neme y Mohammed, 2017; Ji et al. 2022)).

Aflatoxinas

Se conocen 20 tipos de aflatoxinas, entre ellas las cuatro más significativas son: aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) y aflatoxina G2 (AFG2). La especie *Aspergillus flavus* es responsable de la producción del subtipo B, mientras que *Aspergillus parasiticus* forma las toxinas del tipo G (Kumar et al., 2017). Algunos estudios como el de Schmidt-Heydt et al. (2010) y de El-Sayed et al. (2022) afirman que las condiciones del ambiente como el aumento de temperatura y de actividad de agua (a_w) alteran la expresión de los genes relacionados con la producción de AF tanto para *Aspergillus flavus* como para *Aspergillus parasiticus*. Asimismo, autores como Marasas et al. (2008) relacionan la contaminación ambiental con el aumento de temperatura, el aumento de los niveles de CO₂ y unos patrones de lluvia cambiantes. Estos autores mencionan que, estos factores ambientales inducen al aumento de la contaminación por mohos y, en consecuencia, a la producción de AF. Además, la contaminación de los cultivos antes de la cosecha está relacionada con la humedad del cereal y la humedad relativa del ambiente (Klich, 1987).

Las micotoxinas también pueden encontrarse en alimentos de origen animal por ejemplo las AF, específicamente la forma hidroxilada de AFB1 se encuentra en productos lácteos, denominada aflatoxina M1 (AFM1), debido a su biotransformación en el organismo de animales como la vaca y llega a este alimento cuando ingiere piensos contaminados por AFB1 (Neira, 2000; El-Sayed et al., 2022).

Fumonisinias

Estas micotoxinas fueron descritas por primera vez en 1988 por Gelderblom y Col. Los principales mohos formadores de esta toxina son *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y sus especies más cercanas (Rheeder et al., 2002). En ese mismo año, se descubrieron las estructuras de las fumonisinas, más de 15 homólogas (Rheeder et al., 2002; El-Sayed et al., 2022). Se trata de cuatro variedades de fumonisinas: A, B, C y P (Marasas, 1996). La forma más abundante es el subtipo B, entre ellas la fumonisina B1 (FMB1) es la más peligrosa y abundante (70-80% del total de fumonisinas producidas), además de poder actuar de forma sinérgica, potenciando sus

efectos toxicológicos, con fumonisina B2 (FMB2) y fumonisina B3 (FMB3) (Rheeder et al., 2002; El-Sayed et al., 2022).

El maíz y los productos derivados del maíz resultan ser el foco de contaminación del subtipo FMB, pero también se ha observado su presencia en el trigo y en el arroz (Rheeder et al., 2002; Kralj Cigić y Prosen, 2009). Algunos autores como Cao et al. (2013) estudiaron que la baja humedad de los núcleos del grano de maíz favorece la invasión por insectos, a la vez que el desarrollo fúngico y como consecuencia la acumulación de estas micotoxinas.

Ocratoxinas

En 1965, la ocratoxina A (OTA), la ocratoxina más peligrosa entre los tres subtipos (A, B y C), fue aislada y caracterizada químicamente (El-Sayed et al., 2022; Wang et al., 2022). Su formación se atribuye principalmente a las especies *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum*. La mayor especie de mohos productora de OTA es *Aspergillus ochraceus*, cuyas condiciones óptimas de crecimiento son a temperaturas entre 24-31°C, una actividad de agua (a_w) elevada entre 0,95-0,99 y un pH entre 3 y 10. Esta micotoxina se puede encontrar en productos derivados de granos como el pan, cereales de desayuno, muesli, pasta cruda, pasteles y tartas, así como en cereales como el arroz (EFSA, 2021). La presencia de OTA en algunos granos como en el trigo, sorgo y maíz no se ha establecido, algunos autores como Kralj Cigić y Prosen, (2009) encontraron esta micotoxina en el trigo, mientras que El-Sayed et al. (2022) encuentran estos metabolitos en el sorgo y el maíz, pero no en el arroz.

Tricotecenos

Los tricotecenos pertenecen al grupo de micotoxinas que son formados o producidos por un gran número de especies fúngicas. Los géneros más importantes formadores de TRC son *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* y *Myrothecium* (Kumar et al., 2017).

Debido a la gran variedad de las especies formadoras, las condiciones de formación de micotoxinas abarcan grandes rangos como por ejemplo temperaturas de crecimiento fúngico óptimas entre 0-50°C, niveles de humedad relativa hasta del 70%, alcanzándose estos niveles de humedad en temporadas fluviales durante la cosecha. También depende de la zona en la que se encuentren los cultivos, como las zonas tropicales y subtropicales donde las altas temperaturas y la elevada humedad, condiciones ideales para la síntesis de micotoxinas, permiten su formación (El-Sayed et al., 2022).

Zearalenona

Este tipo de micotoxina es principalmente producida por mohos del género *Fusarium* (Evans y Shao, 2022; El-Sayed et al., 2022). La forma de ZEN que muestra una actividad metabólica estrogénica es α -zearalenol (Kuiper-Goodman et al., 1987; Evans y Shao, 2022). ZEN puede soportar temperaturas superiores a 160°C, por lo que su inhibición debe realizarse por métodos alternativos al calor, como por ejemplo la fermentación (Mousavi et al., 2018; Evans y Shao, 2022). Según el informe de la EFSA del 2011, las principales fuentes de ZEN en los países europeos son los granos usados en el consumo humano, productos de molienda de trigo, productos de molienda de maíz, pan, pasta, cereales para el desayuno, galletas y preparados infantiles. Para Kralj Cigić y Prosen (2009), también puede encontrarse ZEN en arroz y soja.

En la Figura 1, se encuentran las distintas estructuras químicas atendiendo al tipo de micotoxina. La presencia de anillo de lactona hace a las aflatoxinas susceptibles a la hidrólisis alcalina (Wogan et al. 1966). Este hecho se ha propuesto como un tratamiento alternativo para hidrolisis de estas micotoxinas. Sin embargo, la EFSA no recomienda este tratamiento debido a la falta de datos sobre los metabolitos formados.

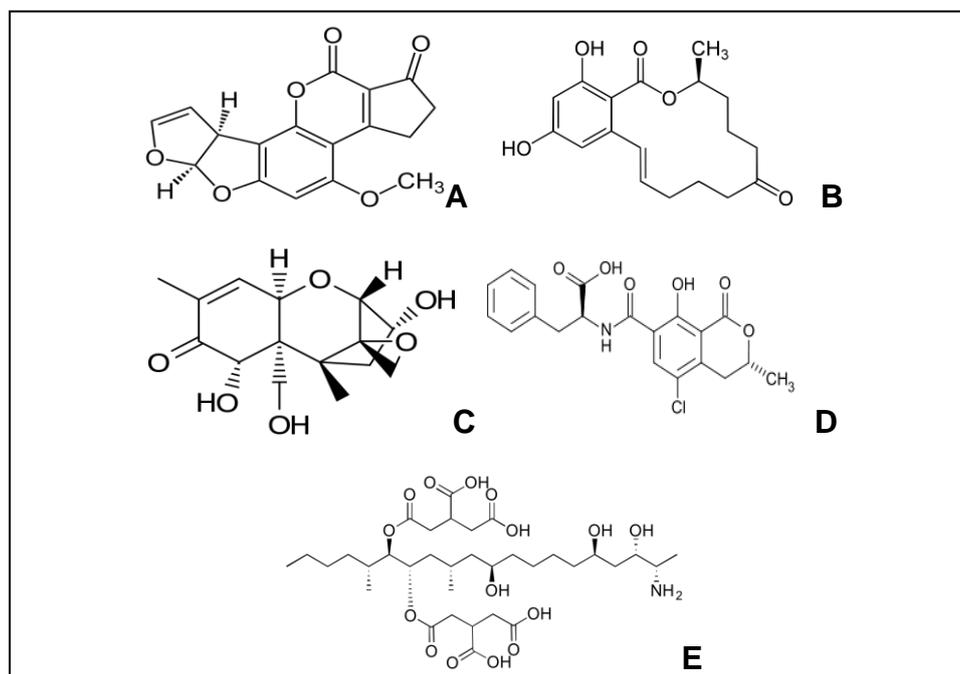


Figura 1. Estructuras químicas de las principales micotoxinas. **A.** AFB1 **B.** ZEN **C.** DON **D.** OTA **E.** FMB1

3. Peligros para la salud

La enfermedad causada por la ingesta de las micotoxinas se denomina micotoxicosis. Los órganos principalmente afectados en una micotoxicosis, dependiendo de la micotoxina, son: hígado, riñones, sistema nervioso y sistema inmune (El-Sayed et al., 2022).

Los problemas de salud producidos por la ingestión de micotoxinas pueden ser episodios agudos o crónicos con efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, hemorrágicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos y/o inmunosupresores (Kralj Cigić y Prosen, 2009). Los episodios agudos se observan cuando huésped se expone a altas dosis de estos compuestos, mientras que a bajas dosis se debe a la exposición durante periodos largos y causa serios problemas al riñón, hígado, sistema inmune y otros tejidos.

De acuerdo con Yang et al. (2020) las micotoxinas se pueden clasificar según su impacto en la salud de las personas:

Grupo 1 (carcinogénicas para los humanos): AFB1 (reconocido por la *International Agency for Reserach on Cancer*).

El mecanismo toxicológico de AFB1 se debe a su radical epóxido, que interactúa con proteínas de conjugación inhibiendo la síntesis de proteínas y generando genotoxicidad, inmunosupresión e inducción de procesos cancerígenos por mutación del gen P53, lugar del genoma donde se produce la transversión de guanina a tiamina (codón 249). La enfermedad causada por esta micotoxina se denomina aflatoxicosis. La aflatoxicosis aguda produce nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y hepatotoxicidad, siendo esta última la más frecuente con episodios de ictericia, vómitos e insuficiencia hepática que puede inducir a la muerte (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

Grupo 2B (posiblemente carcinogénicas para los humanos): AFM1, OTA y FM.

La AFM1 es el resultado del metabolismo de AFB1 en fluidos y tejidos de origen animal (Neira, 2000). Esta micotoxina se puede encontrar como residuo en la leche de vaca, como ya se indicó anteriormente, esta micotoxina es forma hidroxilada (AFM1) y produce episodios de aflatoxicosis aguda y crónica en humanos de forma análoga a la de AFB1 (El-Sayed et al., 2022).

El mecanismo toxicológico de OTA se lleva a cabo por la inhibición del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) y la transcripción de su gen. Así, se genera estrés oxidativo, produciendo ROS que inhiben la síntesis de proteínas, alteran los sistemas

metabólicos, promueven la peroxidación de los lípidos de membranas celulares, desregulan la homeostasis del calcio, inhiben la respiración mitocondrial y producen daños en el ADN creando aductos (El-Sayed et al., 2022). También puede producir fallos en la apoptosis y alteraciones en el gen P53, gen supresor de tumores. Todos estos mecanismos metabólicos se traducen en nefrotoxicidad, teratogénesis e inducción de cáncer renal y hepático (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015)..

Entre las fumonisinas, la más tóxica y la que se encuentra con mayor frecuencia es la fumonisina B1. Su mecanismo de toxicidad consiste en el bloqueo de la síntesis de esfingolípidos, necesarios en las estructuras de las membranas celulares, pero sobre todo esenciales en las células nerviosas que actúan como segundos mensajeros en las etapas de crecimiento, diferenciación y muerte celular. La alteración de la síntesis de esfingolípidos se produce por inhibición de la enzima ceramida sintasa. Esto produce una acumulación de compuestos llamados esfingonina y esfingosina que dan lugar a neurotoxicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

Grupo 3 (no carcinogénicas para los humanos): ZEN, DON, las toxinas T-2 Y HT-2 (TRC).

La micotoxina ZEN presenta actividad estrogénica y anabólica, pues compite con el receptor específico de la unión del estradiol en las células (Neira, 2000). Por ello, tiene efectos hiperestrogénicos que recaen sobre el sistema reproductor, causando problemas hormonales en determinadas especies animales como el cerdo (Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España, 2015).

Entre los TRC se encuentran las micotoxinas DON, T-2 y HT-2. Estas interactúan sobre la unidad ribosomal 60s, separándola de la subunidad rRNA 28s. Esta división bloquea procesos de elongación y activación de proteínas inactivadoras de ribosomas, provocando estrés ribotóxico y daños en el rRNA, inhibiendo la traducción y la síntesis de proteínas. Los efectos se extienden a toxicidad, inhibición de síntesis de ADN y ARN, desregulación en división celular y alteración de la estructura de la membrana.

4. Microorganismos productores de los diferentes tipos de micotoxinas

En los cereales y los alimentos derivados de estos, los principales géneros de mohos capaces de producir o formar micotoxinas son: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Es necesario destacar que una misma especie de mohos es capaz de producir más de

una micotoxina, por ejemplo *Fusarium graminearum* puede producir tanto ZEN como DON. A su vez, también una misma micotoxina puede ser producida por varias especies de mohos, es el caso de OTA, ya que la puede formar tanto por *Aspergillus* spp como por *Penicillium* spp; o bien AFs, que pueden ser formadas por dos especies de *Aspergillus*; *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticum* (Bellver, 2013).

En la tabla 1 se recogen las principales especies de mohos productores de micotoxinas, así como las micotoxinas producidas y los alimentos a base de cereales en los que se puede encontrar esta contaminación.

Además, cabe resaltar que la presencia de un moho en el alimento no conlleva necesariamente la formación de micotoxinas, pues deben darse unas determinadas condiciones de humedad relativa tanto en el alimento como en el ambiente donde se almacena el alimento para que el microorganismo se desarrolle, prolifere y forme las micotoxinas (El-Sayed et al., 2022; Terzi et al., 2014). De forma paralela, la ausencia de mohos en el alimento no significa la ausencia de micotoxinas, ya que el producto puede contaminarse por otras fuentes, como la suciedad en el obrador o por malas prácticas de elaboración de alimentos, por ejemplo, la falta de higiene en el manipulador del alimento (Astudillo y Nacipucha, 2010; Terzi et al., 2014).

Tabla 1. Micotoxinas, mohos responsables de su producción y productos a base de cereales donde puede encontrarse la contaminación (adaptada de Shephard, 2008; Neme y Mohammed, 2017; El-Sayed et al., 2022).

Micotoxinas	Mohos productores	Alimentos a base de cereales
AF B1,B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Cereales (maíz, arroz, trigo, sorgo)
OTA	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Cereales (cebada, maíz, arroz, sorgo, avena, centeno)
DON	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada) Productos a base de estos cereales
Toxina T-2, HT-2	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium poae</i>	Cereales (cebada, maíz, avena) Productos a base de cereales
ZEN	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i>	Cereales (maíz, trigo, sorgo, arroz, cebada, avena) Productos a base de cereales
FM B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>	Maíz Productos del maíz Sorgo

5. Análisis del contenido de micotoxinas

Posiblemente uno de los problemas del estudio de la presencia y cuantificación de las micotoxinas es que las cantidades de estas son muy bajas, por ejemplo, $\mu\text{g}/\text{kg}$ o ng/kg . Este hecho hace necesario técnicas con alta precisión, capaces de determinar cantidades muy pequeñas de micotoxinas y con límites de cuantificación bajos. Otro aspecto a resaltar en cuanto a su análisis, es que la gran mayoría de estos metabolitos deben ser extraídos con un disolvente o retenidos con algún polímero para poder alcanzar concentraciones tan bajas. Las técnicas más utilizadas en el análisis de micotoxinas son las técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC) y la cromatografía de gases (GC), acompañadas de un detector de espectrometría de masas (MS). La cromatografía trata del análisis cuantitativo de micotoxinas en la muestra. Sin embargo, otras técnicas en uso son los inmunoensayos, que a diferencia de las técnicas cromatográficas, dan resultados cualitativos o semicuantitativos (Pereira et al., 2014).

Algunos autores como Kralj Cigić y Prosen (2009) dividen estas técnicas en dos grupos, los métodos de detección para aquellos que sean cualitativos o semicuantitativos, y los métodos analíticos para la determinación exacta, selectiva y sensible de micotoxinas de varias muestras.

En cuanto a los métodos de detección, el más usado en la determinación de micotoxinas es el inmunoensayo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) basado en la competitividad de un anticuerpo primario específico por la micotoxina o un complejo micotoxina-enzima. El resultado de la unión de estos con un sustrato cromogénico produce una reacción medible con un espectrofotómetro (Kralj Cigić y Prosen, 2009; Pereira et al., 2014). Sus ventajas son la rapidez, bajo coste y simplicidad de uso. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentra la reactividad cruzada con estructuras químicas similares a las micotoxinas o bien componentes de la matriz alimentaria. Este inconveniente aumenta el coste del análisis puesto que los kits de ELISA son de un solo uso (Pereira et al., 2014). Asimismo, no permite determinar la cantidad de micotoxina, algunos autores como Pleadin et al. (2012) fijaron el límite de detección en $0,03 \text{ mg}/\text{kg}$ para FM utilizando kits ELISA de diferentes marcas comerciales. Los inmunoensayos con fluoromarcadores (FIA) utilizan el sustrato reactivo fluorogénico con la enzima unida al analito, en este caso, la micotoxina (Kralj Cigić y Prosen, 2009).

Los polímeros molecularmente impresos (MIPs), normalmente ácidos nucleicos pero también péptidos, tienen una determinada selectividad por un analito específico debido

a la incorporación de una plantilla molecular durante su síntesis. Los beneficios de esta técnica es el bajo coste de producción, larga vida útil de las plataformas de biosensores, sus componentes no requieren refrigeración y son aptas para gran cantidad de muestras (Tittlemier et al., 2021).

La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica de bajo coste y rápida, que proporciona estimaciones cualitativas y semicuantitativas, aunque con medidas densitométricas también proporciona resultados cuantitativos. Entre sus ventajas se encuentra la adaptabilidad para el análisis de extractos crudos, gran variedad de fases estacionarias y móviles, procesado de muestras rápido y los límites de cuantificación son menores de lo que establecen los órganos reguladores. Como inconveniente, el propósito de esta técnica está reducido a técnicas de cribado (Kralj Cigić y Prosen, 2009).

La espectroscopía por infrarrojo cercano (NIR) ha sido una técnica desarrollada principalmente para la detección de DON en muestras de trigo (Kralj Cigić y Prosen, 2009; Tittlemier et al., 2021). Según Tittlemier et al. (2021), muchas organizaciones han intentado desarrollar los métodos de NIR para el estudio de las micotoxinas, sin embargo, la especificidad resultó ser baja, aunque no se concluyó la razón, pudiendo ser la señal producida por el moho o cambios en la matriz de la muestra.

Actualmente, los métodos más utilizados para el análisis y detección de micotoxinas son los basados en cromatografía. Entre ellos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) son las técnicas que mayor precisión, selectividad y sensibilidad han demostrado en la determinación de micotoxinas en una gran variedad de muestras (Kralj Cigić y Prosen, 2009; Ong et al., 2021).

El detector de elección en la mayoría de estudios es el espectrómetro de masas. Sin embargo, el detector fluorimétrico es también una opción para la técnica de HPLC debido a su sensibilidad, selectividad, bajo coste y facilidad de uso sobre todo para las aflatoxinas ya que tienen la propiedad de emitir luz azul en el espectro visible B1 y B1 y luz amarilla y verde en espectro fluorescente (G1 y G2). También, aunque las ventajas de este detector sean destacables, su inconveniente es la derivatización necesaria para la mayoría de micotoxinas (Kralj Cigić y Prosen, 2009).

La GC-MS tiene un proceso de extracción similar al de HPLC, aunque las muestras requieren un paso inicial de derivatización para mejorar la volatilidad de las micotoxinas, sobre todo cuando estas se encuentran en cantidades traza. Para

algunas micotoxinas como las del grupo de tricotecenos, la GC-MS es el método más usado; sin embargo, este método está limitado para la detección de AF y OTA (las cuales se consideran las micotoxinas más tóxicas para humanos y animales), puesto que no hay suficientes estudios que obtengan resultados de detección para CG-MS en estas micotoxinas. Por esto y por la obtención de resultados poco precisos, la CG-MS es el método menos recomendable en el ámbito de la cromatografía (Kralj Cigić y Prosen, 2009; Ong et al., 2021).

El método de HPLC-MS permite la determinación simultánea de múltiples micotoxinas, llegando a analizar hasta 20 tipos (Kralj Cigić y Prosen, 2009). Aunque este sistema de detección sea el más avanzado en cuanto a su sensibilidad, necesita un paso de purificación de la muestra ya que las micotoxinas se encuentran en concentraciones muy bajas, para ello se utilizan las columnas de inmunoafinidad. Las ventajas del uso de estas columnas es que permiten el aislamiento de varios tipos de micotoxinas en la muestra a analizar con una eficiencia y sensibilidad de detección elevadas. A pesar de los beneficios que aporta este método, también conlleva una serie de desventajas, como la inversión elevada de tiempo y coste, además del uso de detectores como el espectrómetro de masas para un análisis óptimo en lugar de otros más baratos como el detector de diodos array o el detector de fluorescencia (Ong et al., 2021).

Una de las técnicas que está siendo cada vez más empleada es HPLC-MS cuadrupolo. El analizador de masas cuadrupolo es la parte más importante de un espectrómetro de masas. Existe el cuadrupolo simple, o bien el triple cuadrupolo. Este último está formado por tres cuadrupolos consecutivos, cuyo objetivo consiste en separar los iones en función de su relación masa-carga (m/z). Su aplicación se centra en el análisis de plaguicidas y medicamentos, siendo capaz de analizar con sensibilidad, especificidad y precisión incluso en cantidades traza de la muestra (Fernández, 2012).

6. Legislación en relación con la presencia, máximos niveles de micotoxinas permitidos

La Comisión Europea en 2001 estableció en el Reglamento (CE) 1831/2003 los niveles máximos de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

En este Reglamento, se establecen las concentraciones de AF atendiendo a los tratamientos que permiten su reducción a niveles inferiores de los máximos establecidos para productos destinados al consumo humano directo o considerados

como ingredientes. Además, el Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH) dictaminó el 23 de septiembre de 1994 que las AF son cancerígenos genotóxicos.

Respecto a la micotoxina OTA, la EFSA actualizó el 4 de abril de 2006 un dictamen la información científica sobre esta, además de establecer una ingesta semanal tolerable de 120 ng/kg de peso corporal.

Asimismo, el salvado y germen de los cereales son comercializados para el consumo directo. De esta forma, se ha de establecer un contenido máximo de DON y ZEN en estos productos. El CCAH adoptó varios dictámenes para el grupo de las toxinas producidas por el género *Fusarium* en diciembre de 1999 donde se establecían las siguientes ingestas diarias tolerables (TDI): 1 µg/kg para DON, 0,2 µg/kg para ZEN, 2 µg/kg para FM y 0,06 µg/kg para T-2 y HT-2.

En el Reglamento (CE) 1881/2006, se consideran también las condiciones climáticas como factor clave en la influencia del contenido de toxinas del género *Fusarium*. Por ello, hace referencia a la Recomendación 2006/583/CE de la Comisión sobre la prevención y reducción de toxinas *Fusarium* spp en cereales y productos basados en cereales. En este último documento, se recogen una serie de principios para evitar la contaminación, la proliferación y la producción de toxinas en los cultivos de cereales. Para ello, se describen los factores de riesgo a tener en cuenta en las buenas prácticas agrícolas que son los siguientes: rotación de cultivos, elección de la variedad o híbrido más adecuado para las prácticas de cultivo habituales reduciendo el estrés vegetal, planificación del cultivo para evitar que las condiciones climáticas prolonguen la maduración en el campo antes de la cosecha, gestión del suelo y del cultivo para unas condiciones óptimas de cultivo, condiciones para la cosecha adecuadas como la calidad de grano (por su contenido de humedad) o recursos disponibles para el secado del cultivo y medición del contenido de humedad y el secado inmediato del cultivo hasta llegar a contenidos de humedad inferiores al 15% para su almacenamiento. Por último, otras dos etapas que se consideran factores de riesgo post cosecha son el almacenamiento, por aumentos o variaciones intermitentes de temperaturas y condiciones de poca higiene, y el transporte desde el almacén, controlando el contenido en humedad ni contaminaciones que permitan el crecimiento fúngico ni la formación de micotoxinas.

Asimismo, el mencionado Reglamento establece que se deben tener en cuenta las fases de procesado de los cereales. La fase de transformación es considerada una de las fases más importantes para establecer niveles máximos del contenido en toxinas del género *Fusarium*. Además, recomienda la reducción y/o eliminación de

micotoxinas *Fusarium* spp mediante el uso de operaciones de transformación de alimentos como la fermentación. Desde el punto del control de calidad, esta es la primera etapa que implica un control final en el producto transformado y por lo tanto, es un punto en el que se puedan establecer límites para las concentraciones máximas de estas toxinas en producto a base de cereales destinados al consumidor final.

El Reglamento (CE) 1881/2006, establece los contenidos máximos de micotoxinas según su tipo y el tipo del producto a base de cereales. Los alimentos infantiles de lactancia y para niños de corta edad tienen contenidos máximos inferiores al resto, ya que son grupos poblacionales a los que se debe de proteger de la ingesta de micotoxinas por su vulnerabilidad derivada de la acción de estos compuestos tóxicos en rutas metabólicas claves que afectan a rutas anabólicas del desarrollo de ese grupo de población (anexos 2, 3, 4, 5 y 6).

7. Sistemas para reducir el contenido en micotoxinas (calor, pH, fermentación)

Las primeras fases en las que los granos pueden contaminarse son las etapas de pre cosecha, durante la cosecha y el almacenamiento posterior. Una estrategia clave en la prevención de contaminación por micotoxinas es la rotación de cultivos, evitando así la colonización de los mohos formadores de toxinas en el sustrato. Otro factor importante es el estrés vegetal de la planta, pues se ha de evitar con el fin de que el moho aproveche estas condiciones de debilidad y crezca en ella, controlando las etapas de sequía, el frío, aumentos de temperatura y nutrición de la planta (Roig et al., 2013).

Las micotoxinas son compuestos estables a las operaciones de degradación de alimentos comunes como el calor, extrusión u horneado. En el estudio de Mousavi et al. (2018) reconoce que las operaciones como la clasificación o limpieza son más efectivas, además de la eliminación física de las partes del grano en mal estado.

Existen varios factores de los que dependerá la degradación de las micotoxinas, por ejemplo, la estructura química de estas, la temperatura (150-210°C), la duración (tiempos mayores de 40 minutos) y presencia o ausencia de humedad en el proceso. Sin embargo, la mayoría de los procesos unitarios como el cocinado o el horneado no están diseñados para disminuir los niveles de micotoxinas en los productos alimentarios (Mousavi et al., 2018).

En los resultados del estudio realizado por Mousavi et al. (2018) se observa como la fermentación de las distintas masas utilizadas resultó ser una operación en la que

disminuían los niveles de micotoxinas. En el caso de DON, en el 55% de las muestras utilizadas se produjo una reducción; en el caso de OTA, el porcentaje de muestras con contenido reducido de micotoxinas respecto al inicial fue (62,5%), y para la micotoxina ZEN la fermentación no resultó efectiva en la disminución de micotoxinas.

Por otra parte, el uso del calor como tratamiento de reducción de micotoxinas no consigue la descomposición de estas. En el caso de las AF, se utilizan temperaturas de 150°C para su destrucción parcial, y para disminuciones de entre 78-88% se deben combinar el cocinado y la presión. En el procesado de los alimentos, las temperaturas de los tratamientos térmicos son inferiores a los antes mencionados, aunque para algunos granos como el café se ha demostrado que el tostado degrada la OTA en unos porcentajes de entre 65-100% (Roig et al., 2013). Para OTA, el porcentaje de humedad es importante en la descomposición de esta, ya que a niveles de humedad del 17,5% y temperaturas de 191-196°C se consigue el porcentaje de degradación más alto con un 31%. El mayor porcentaje de reducción en el contenido de ZEN en maíz se consiguió en el estudio de Ryu et al. (1999) con el tratamiento térmico de cocinado combinado con la extrusión, con disminuciones de entre 65-83% de esta, debido a la combinación de dos tratamientos, uno térmico y otro físico. De la misma forma, DON es estable a temperaturas de 120°C, parcialmente estable a 180°C y finalmente degradable a temperaturas de 210°C y durante tiempos de 40 minutos (Mousavi et al., 2018).

Otra forma de evitar la formación de micotoxinas es la prevención del crecimiento de los mohos que las originan. Los factores a tener en cuenta son las condiciones de temperatura, humedad relativa, concentración de oxígeno, tiempo de almacenaje de los cereales, limpieza y pH. Los mohos pueden crecer por debajo de valores de a_w de 0,85, temperaturas de 4°C y en un rango de pH entre 3,5-6,5 (López-Malo et al., 1995; Van den Tempel y Nielsen, 2000).

La degradación de micotoxinas por agentes biológicos es una estrategia basada en la transformación de estas en metabolitos no tóxicos. Entre estas estrategias, la más utilizada es la fermentación, como se ha mencionado con anterioridad. Sin embargo, el uso de microorganismos específicos como la bacteria *Rhodococcus* permite una actividad potencial detoxificante. Esta bacteria es capaz de biotransformar las micotoxinas AFB1, OTA, ZEN, toxina T-2 y FB1. En el caso de AFB1, la bacteria *Rhodococcus* descende su genotoxicidad, mientras que en el caso de ZEN, disminuye su capacidad estrogénica. Para la micotoxinas OTA y ZEA, también se ha observado que la levadura *Trichosporon* es capaz de transformarlas en metabolitos no

tóxicos como OT α o bien inhibe la producción de α -zearalenol o β -zearalenol, respectivamente (Roig et al., 2013).

8. Micotoxinas en cereales

La contaminación fúngica y producción de micotoxinas puede comenzar desde el campo, la cosecha, manipulación del grano, almacenamiento hasta en el procesado. Las condiciones del grano durante el almacenamiento son las que más influyen en la formación de micotoxinas, entre ellas la humedad elevada del grano (16-30%), temperaturas (25-32°C) y humedad relativa elevadas en el ambiente (80-100%) (Neme y Mohammed, 2017).

La formación de micotoxinas se puede llevar a cabo desde el campo o cultivo hasta el procesado. Sin embargo, esto dependerá del tipo de moho, ya que los mohos que crecen en el campo necesitan elevadas cantidades de agua, mientras que los que crecen durante la etapa de almacenamiento requieren menor humedad relativa. Las especies del género *Fusarium* son las que habitualmente crecen en el campo, produciendo micotoxinas como los tricotecenos, fumonisinas y zearalenona. Sin embargo, los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son los mohos que forman micotoxinas durante el almacenamiento, tales como las aflatoxinas y las ocratoxinas (Neme y Mohammed, 2017). El control de la formación de micotoxinas podría enfocarse en establecer parámetros intrínsecos como la a_w y la temperatura de los alimentos que eviten el crecimiento de estos tipos de mohos, especialmente a partir del almacenamiento. En la Tabla 2 se observan las micotoxinas más comunes producidas según la etapa de pre-cosecha y post-cosecha (Bryden, 2012).

El maíz es generalmente contaminado por los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, estos microorganismos producen FM, DON, ZEN y AF. Las especies del género *Fusarium* son capaces de producir una o más micotoxinas en el maíz, y junto con *Aspergillus* spp, contaminan el maíz en etapas de pre-cosecha, aumentando el crecimiento y la contaminación en etapas posteriores como el almacenamiento. Las micotoxinas formadas por el género *Penicillium* se producen durante el almacenamiento del maíz, principalmente o bien cuando la cosecha de este grano se retrasa, produciendo en su mayoría ácido penicílico y ocratoxinas (Neme y Mohammed, 2017).

Respecto al trigo, las micotoxinas que se encuentran con mayor frecuencia son OTA, DON y ZEN, siendo OTA la más común. La contaminación fúngica en el trigo se produce durante la floración, en cosechas retardadas debido a las condiciones de humedad elevadas, así como en el almacenamiento. Los géneros *Fusarium*,

Penicillium y *Alternaria* contaminan el grano en las cosechas retardadas, mientras que *Aspergillus* y *Penicillium* lo hacen durante el almacenamiento si la humedad es suficiente para soportar el crecimiento fúngico (Neme y Mohammed, 2017).

Tabla 2. Principales micotoxinas presentes en los granos de cereales atendiendo a las etapas de pre y post cosecha (tabla adaptada de Bryden, 2012, Neme y Mohamed, 2017).

Cereales	Pre-cosecha	Post-cosecha
Maíz	DON, FM, ZEN	ZEN, AF
Trigo	DON, ZEN, Ergot	AF, OTA, esterigmatocistina
Sorgo	Ergot	AF
Arroz	-	AFB1, AFB2, DON, ZEN OTA, esterigmatocistina

En cuanto al sorgo, puede ser contaminado tanto en el campo como después de la cosecha, siendo las AF las principales toxinas formadas en este grano. En cambio, el arroz es el cereal en el que menos se forman micotoxinas y, estas se forman principalmente durante la post-cosecha (ver Tabla 2) (Bryden, 2012, Neme y Mohammed, 2017). Algunos autores también mencionan la presencia en ese de grano de otras micotoxinas como la citrina, ácido ciclopiazónico, patulina, gliotoxina y algunos tricotecenos (Ferre, 2016; Koesukwiwat et al. 2014; Tanaka et al. 2007). Actualmente, no se conocen las condiciones que afectan la formación de fumonisinas y citrina en el arroz (Ferre, 2016), debido a que no hay suficientes estudios realizados que describan el efecto de las condiciones de almacenamiento después de la cosecha.

El momento de la recogida del grano es un factor importante que influye en la contaminación por los mohos productores de micotoxinas. Los cereales que provienen de cosechas retardadas han mostrado niveles elevados de aflatoxinas en cultivos como el maíz (Kaaya et al. 2005). Este hecho está ligado a la temporada de lluvia, lo que produce un aumento de humedad relativa en el ambiente que estimula el crecimiento fúngico (Neme y Mohammed, 2017). También las herramientas usadas durante la cosecha como los contenedores utilizados en la colecta y en el transporte de cereales desde el campo hasta las operaciones de secado y almacén deben de estar limpios, secos, libres de insectos y sin crecimiento fúngico visible antes del uso y al reutilizarlo (Neme y Mohammed, 2017). Después de la cosecha, el secado de los cereales debe realizarse con la mayor brevedad posible debido a que un secado lento incrementa el tiempo en el que grano tiene una humedad relativa elevada y esto

aumenta la concentración de AF y otras micotoxinas. Los granos secos con un porcentaje de humedad menor al 14% no permiten el crecimiento fúngico y por lo tanto, la producción de micotoxinas. Los porcentajes de humedad relativa seguros, para evitar la formación de micotoxinas, se encuentran entre el 10-13% para cereales y a_w de 0,7. En cambio el porcentaje de humedad relativa para semillas oleaginosas se encuentra entre 7-8% (Neme y Mohammed, 2017).

Otros factores importantes son los factores biológicos entre los que cabe destacar los factores bióticos y principalmente la presencia de insectos y/o la competencia. La infestación del cereal por insectos es un factor clave ya que estos son transportadores de esporas de diversas fuentes vegetales, provenientes de condiciones ambientales distintas y por lo tanto, transportan diversos tipos de mohos (Atanda et al., 2011; Neme y Mohammed, 2017). Los insectos forman roturas en el núcleo del cereal, de tal forma que estos transportan las esporas de los mohos desde las plantas hasta el endospermo del cereal. Una vez inoculada la espora en el núcleo del cereal, debido al calor derivado del metabolismo de los insectos, aumentan la humedad relativa del grano, por el agua condensada que se encuentra en las superficies de los granos almacenados, permitiendo así la esporulación por aumento de temperatura y la humedad. Además, el daño en los núcleos de los cereales los hace más vulnerables a la invasión por mohos, debido a la falta de protección del pericarpio y especialmente en aquellos granos que no estén suficientemente secos (Magan et al., 2003)

9. Presencia de micotoxinas en harinas (blancas e integrales)

La presencia de mohos en harinas se ha estudiado por diversos autores (Weidenborner et al., 2000; Cardoso et al., 2019). Los primeros autores encontraron recuentos de 2,93 Log ufc/g y 2,96 Log ufc/g en harinas de trigo alemanas refinadas e integrales, respectivamente. Recientemente, Cardoso et al. (2019) en el mismo tipo de harina obtuvo similares recuentos para harinas refinadas (2,45 Log ufc/g), aunque encontraron altos recuentos para harinas integrales (5,46 Log ufc/g). Asimismo, estos autores estudiaron harinas refinadas e integrales de arroz, los recuentos obtenidos para estos productos fueron de 2,60 Log ufc/g y 3,0 Log ufc/g, respectivamente.

La mayoría de mohos están presentes en la semilla ya que su micelio se deposita en el pericarpio, mientras que las esporas se depositan en la superficie del grano. Por esta razón, se espera que las harinas integrales tengan mayor contaminación fúngica al obtenerse de la molienda del grano entero, con el salvado, germen y endospermo (Weidenborner et al., 2000). De acuerdo con estos autores, los principales mohos

encontrados en las harinas blancas fueron *A. flavus*, *P. brevicompactum* y *P. griseofulvum*, mientras que la harina integral fue *A. candidus*.

Como se ha mencionado con anterioridad, los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son unos de los mayores productores de micotoxinas y, aunque la mayoría de estos se eliminan en el proceso de horneado, las micotoxinas producidas por estos, resisten a altas temperaturas permaneciendo estables en su actividad tóxica. Por ello, se deben cumplir las condiciones adecuadas de procesado para evitar esta contaminación. Sin embargo, también es importante tener en cuenta la carga microbiana presente en el ambiente del obrador y en el manipulador, ya que estos pueden producir una recontaminación por mohos productores de micotoxinas en la harina u otros ingredientes, durante y después del procesado. Legan (1993) clasifica las panaderías según la presencia de mohos en el pan; en el primer grupo se relacionan con ambientes limpios, mientras que las del segundo se relacionan con ambientes sucios, condiciones higiénicas de los equipos y las pobres prácticas de higiene por parte de los trabajadores. Los productos provenientes de estos obradores mostraron un mayor contenido de micotoxinas.

En cuanto a la concentración de micotoxinas en harinas de trigo, Cardoso et al. (2019), no detectaron ni OTA, ni AFS en harinas refinadas y harinas integrales. Sin embargo, Trombete et al. (2014) encontraron en harina de trigo integral y harinas refinadas de la región Río de Janeiro, Brazil, cantidades de 3-4 y 1,2 µg/kg de AF, respectivamente. Aunque, según esos autores esos niveles eran más bajos que los establecidos por la legislación brasileña. Ghali et al. (2008) en muestras de cereales y productos derivados en Túnez encontraron cantidades de AF de 6,7 µg/kg, 2,2 µg/kg de AFB₁, superando en los niveles establecidos en la Unión Europea. Otros estudios como el de Kara et al. (2015) encontraron en harinas refinadas de origen turco cantidades de OTA de 0,247 µg/kg, mientras que Zinedine et al. (2007) obtenía en panes elaborados con harina de centeno 5,49 µg/kg de OTA.

En otros artículos más recientes como el de Wang et al. (2020), se estudió el efecto de las especies de trigo, el sistema de cultivo y el tipo de harina en el contenido de micotoxinas de la harina de trigo. En este estudio, se observó que la concentración de las micotoxinas T-2 y HT-2 fue significativamente superior en la harina de trigo integral (2,43 µg/kg) en comparación a la harina blanca (0,83 µg/kg), ambas provenientes de Reino Unido. Sin embargo, estos autores no discuten la razón de una mayor contaminación en la harina integral comparada a la harina blanca.

10. Micotoxinas en el pan

Saladino et al. (2017) estudian la presencia de micotoxinas en diversos tipos de panes como pan blanco, pan integral, pan sin corteza y 16 panes especiales como multigrano, maíz, avena, centeno, kamut, con lactosa y sin gluten provenientes de diversos comercios en la ciudad de Valencia, España. Las muestras se analizaron a través de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas. Los resultados de este estudio demostraron la presencia de las micotoxinas AF, ZEN y eniatinas en 20%, 96% y 65% de las muestras testadas, respectivamente. En algunas muestras, los niveles de AFB1, ZEN y la suma de AF excedían los niveles máximos establecidos por la legislación Europea alcanzando unos porcentajes de 5%, 30% y 7,5%, respectivamente. Las cantidades observadas de AF en las muestras fueron: 0,5-7,1 µg/kg para la suma total de AF, 4,2-7,1 µg/kg para AFB1 y 0,5-5,3 µg/kg para AFB2. En cuanto a ZEN, las cantidades obtenidas en los resultados de este estudio se encontraban en un rango de valores entre 27-905 µg/kg.

Sin embargo, en la revisión sistemática realizada por Sarmast et al. (2021) se resume la incidencia, ocurrencia y concentración de micotoxinas y sus metabolitos en diferentes tipos de cereales y productos basados en cereales en estudios que desde el año 2017 hasta el 2020. En resumen, los resultados obtenidos sobre el contenido de micotoxinas en el pan mostraron una mayor incidencia para: OTA 60%, DON 55-58,4%, ZEN 41%, AF 36% y HT-2 6,4%.

En ambos estudios, se observa una alta incidencia para todas las micotoxinas, ya que la mayoría son superiores al 30%, con excepción a la toxina HT-2. Debido a que este tipo de micotoxinas son formadas por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* desarrollados en etapa post-cosecha, estos resultados podrían indicar que la principal formación de micotoxinas se produce durante el almacenamiento y procesado del grano. Sarmast et al. (2021) proponen el uso de la combinación de varios métodos de procesado como la fermentación y el horneado para reducir el contenido de micotoxinas. En este caso, la fermentación larga de los panes podría ayudar a disminuir el contenido de estos compuestos.

11. Conclusiones

Debido a la presente revisión bibliográfica, se evidencia que los principales géneros fúngicos formadores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Así mismo, que las especies fúngicas que pueden contaminar a los cereales serán distintas según el lugar o la etapa donde se encuentre el cereal. La formación de micotoxinas en el campo corresponde al género *Fusarium*, las toxinas formadas por estas especies de mohos son principalmente DON, toxina T2, ZEN y FMB1. Las micotoxinas AFB1 y OTA se forman en la etapa de almacenamiento y los mohos responsables de su formación son *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*.

Las harinas integrales parecen ser las que contienen mayor concentración fúngica y por lo tanto mayor contenido de micotoxinas. La presencia de estos metabolitos en las harinas se debe principalmente a la contaminación ambiental del obrador o a granos que se cosecharon que contenían mohos.

La presencia de micotoxinas en el pan está relacionada con las condiciones de higiene del obrador, equipos y prácticas de higiene de los manipuladores. La implementación de programas de control de calidad en los obradores, posiblemente sea la mejor herramienta para evitar la presencia de estos metabolitos tóxicos en el pan, debido a que permitirán el control de la materia prima previniendo así su aparición en el producto final. Existen algunos métodos de procesado, como la fermentación y el horneado, capaces de reducir el contenido en micotoxinas y estos son posiblemente puntos de control que podrían implementarse durante el procesado.

La mayoría de las investigaciones buscan conocer la presencia y la cantidad de micotoxinas en muestras de cereales analizadas. Sin embargo, se observa una falta de estudios que detallen las concentraciones de micotoxinas en el pan y en los productos a base de cereales. Es posible que a partir de las técnicas como HPLC-MS triple cuadrupolo se desarrollen métodos más accesibles para cuantificar la cantidad de micotoxinas con mayor precisión y eficacia en el pan.

Bibliografía

- Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España. (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas.
https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/textomicotoxinas18122015_completorev_nipo_tcm30-57870.pdf
- Astudillo, G. J., & Nacipucha, A. F. (2010). Aislamiento de hongos productores de micotoxinas presentes en granos de cereales expendidos en la ciudad de Cuenca y grado residual en productos elaborados a partir de dichos cereales. Tesis doctoral. Universidad del Azuay. Cuenca, Ecuador.
- Atanda S. A. (2011). Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25), 4373–4382.
<https://doi.org/10.5897/ajmr11.487>
- Bellver, M. J. (2013). Evaluación del riesgo de exposición a ocratoxina A. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España.
- Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173(12), 134–158.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>
- Cao, A., Santiago, R., Ramos, A. J., Marín, S., Reid, L. M., & Butrón, A. (2013). Environmental factors related to fungal infection and fumonisin accumulation during the development and drying of white maize kernels. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 15–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.012>
- Cardoso, R. V. C., Fernandes, Â., Heleno, S. A., Rodrigues, P., González-Paramás, A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chemistry*, 280, 123–129.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.063>
- Kralj Cigić, I., & Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 62–115.
<https://doi.org/10.3390/ijms10010062>

- EFSA. Aflatoxinas en los alimentos (2021)
<https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/aflatoxins-food>
- El-Sayed, R. A., Jebur, A. B., Kang, W., El-Esawi, M. A., & El-Demerdash, F. M. (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2(2), 91–102.
<https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.002>
- Evans, N. M., & Shao, S. (2022). Mycotoxin metabolism by edible insects. *Toxins*, 14(3), 217.
<https://doi.org/10.3390/toxins14030217>
- Fernández, R. (2012). Aplicación de la cromatografía de líquidos acoplada a analizadores de simple y triple cuadrupolo en análisis alimentario y biológico. Tesis doctoral. Universidad de Almería. Almería, España.
- Ferre, F. S. (2016). Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food Control*, 62, 291–298.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.051>
- Gelderblom, W. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggaar, R., & Kriek, N. P. (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1806–1811.
<https://doi.org/10.1128/aem.54.7.1806-1811.1988>
- Ghali, R., Hmaissia-khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., & Hedili, A. (2008). Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control*, 19(9), 921–924.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.09.003>
- Ji, X., Xiao, Y., Wang, W., Lyu, W., Wang, X., Li, Y., Deng, T., & Yang, H. (2022). Mycotoxins in cereal-based infant foods marketed in China: Occurrence and risk assessment. *Food Control*, 138, 108998.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108998>

- Kaaya, A. N., Warren, H. L., Kyamanywa, S., & Kyamuhangire, W. (2005). The effect of delayed harvest on moisture content, insect damage, moulds and aflatoxin contamination of maize in Mayuge district of Uganda. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2595–2599.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2313>
- Kara, G. N., Ozbey, F., & Kabak, B. (2015). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. *Food Control*, 54, 275–281.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.014>
- Klich, M. A. (1987). Relation of plant water potential at flowering to subsequent cottonseed infection by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 77(5), 739.
<https://doi.org/10.1094/phyto-77-739>
- Koesukkiwat, U., Sanguankaew, K., & Leepipatpiboon, N. (2014). Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chemistry*, 153, 44–51.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.029>
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., & Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 7(3), 253–306.
[https://doi.org/10.1016/0273-2300\(87\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0273-2300(87)90037-7)
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2170.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Legan, J. D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32(1-3), 33–53.
[https://doi.org/10.1016/0964-8305\(93\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90038-4)
- López-Malo, A., Alzamora, S. M., & Argai, A. (1995). Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems. *Food Microbiology*, 12, 213–219.
[https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80100-6](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80100-6)

- López-Rodríguez, C., Hernández-Corredor, R., Suárez-Franco, C., & Borrero, M. (2008). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum*, 13(2), 128–137.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832008000200004
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 723–730.
<https://doi.org/10.1023/a:1026082425177>
- Marasas, W. F. (1996). Fumonisin in Food. En L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman (Eds.), *Advances in Experimental medicine and Biology*. Springer US.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1379-1>
- Marasas, W. F. O., Gelderblom, W. C. A., & Shephard, G. S. (2008). Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade. En J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, & A. Visconti (Eds.). CABI.
<https://doi.org/10.1079/9781845930820.0000>
- Mousavi Khaneghah, A., Fakhri, Y., & Sant'Ana, A. S. (2018). Impact of unit operations during processing of cereal-based products on the levels of deoxynivalenol, total aflatoxin, ochratoxin A, and zearalenone: A systematic review and meta-analysis. *Food Chemistry*, 268, 611–624.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.072>
- Neira, M.S. (2000). Influencia de los procesos de elaboración en el contenido de micotoxinas de alimentos de consumo masivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina [Tesis]
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3225_Neira.pdf
- Neme, K., & Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78, 412–425.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>
- Ong, J. Y., Pike, A., & Tan, L. L. (2021). Recent advances in conventional methods and electrochemical aptasensors for mycotoxin detection. *Foods*, 10(7), 1437.

<https://doi.org/10.3390/foods10071437>

Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96–136.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>

Pleadin, J., Perši, N., Zadavec, M., Sokolović, M., Vulić, A., Jaki, V., & Mitak, M. (2012). Correlation of deoxynivalenol and fumonisin concentration determined in maize by ELISA methods. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 33(4), 414–421.

<https://doi.org/10.1080/15321819.2012.662569>

Recomendación 2006/583/CE de la comisión, de 17 de agosto de 2006, sobre la prevención y la reducción de las toxinas de fusarium en los cereales y los productos a base de cereales.

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.

Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., & Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101–2105.

<https://doi.org/10.1128/aem.68.5.2101-2105.2002>

Roig, M. (2013). Descontaminación de micotoxinas emergentes mediante el procesado de alimentos. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España.

Ryu, D., Hanna, M. A., & Bullerman, L. B. (1999). Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1482–1484.

<https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.12.1482>

Saladino, F., Quiles, J. M., Mañes, J., Fernández-Franzón, M., Luciano, F. B., & Meca, G. (2017). Dietary exposure to mycotoxins through the consumption of commercial bread loaf in Valencia, Spain. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 697–701.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.029>

Sarmast, E., Fallah, A. A., Jafari, T., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). Occurrence and fate of mycotoxins in cereals and cereal-based products: a narrative review of

systematic reviews and meta-analyses studies. *Current Opinion in Food Science*, 39, 68–75.

<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.013>

Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2010). Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *Journal of the Royal Society Interface*, 8(54), 117–126.

<https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0131>

Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Medicina*, 29(1), 143–151.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052015000100012

Shephard, G. S. (2008). Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*, 37(11), 2468–2477.

<https://doi.org/10.1039/b713084h>

Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H., & Kushiro, M. (2007). Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 59–66.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.002>

Terzi, V., Tumino, G., Stanca, A. M., & Morcia, C. (2014). Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science*, 59(3), 284–293.

<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.005>

Tittlemier, S. A., Brunkhorst, J., Cramer, B., DeRosa, M. C., Lattanzio, V. M. T., Malone, R., Maragos, C., Stranska, M., & Sumarah, M. W. (2021). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2019-2020. *World Mycotoxin Journal*, 14(1), 3–26.

<https://doi.org/10.3920/wmj2020.2664>

Trombete, F. M., Moraes, D. de Á., Porto, Y. D., Santos, T. B., Direito, G. M., Fraga, M. E., & Saldanha, T. (2014). Determination of aflatoxins in wheat and wheat by-products intended for human consumption, marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(10), 671–674.

<https://doi.org/10.12691/jfnr-2-10-3>

- van den Tempel, T., & Nielsen, M. S. (2000). Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology*, 57(3), 193–199.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00263-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00263-4)
- Wang, J., Hasanalieva, G., Wood, L., Markellou, E., Iversen, P. O., Bernhoft, A., Seal, C., Baranski, M., Vigar, V., Ernst, L., Willson, A., Barkla, B. J., Leifert, C., & Rempelos, L. (2020). Effect of wheat species (*Triticum aestivum* vs *T. spelta*), farming system (organic vs conventional) and flour type (wholegrain vs white) on composition of wheat flour; results of a retail survey in the UK and Germany –1. Mycotoxin content. *Food Chemistry*, 327, 127011.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127011>
- Wang, L., Hua, X., Shi, J., Jing, N., Ji, T., Lv, B., Liu, L., & Chen, Y. (2022). Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 210, 11–18.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.010>
- Weidenbörner, M., Wieczorek, C., Appel, S., & Kunz, B. (2000). Whole wheat and white wheat flour— the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiology*, 17(1), 103–107.
<https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0279>
- Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews*, 30(2), 460–470.
<https://doi.org/10.1128/br.30.2.460-470.1966>
- Yang, Y., Li, G., Wu, D., Liu, J., Li, X., Luo, P., Hu, N., Wang, H., & Wu, Y. (2020). Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 233–252.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.021>
- Zinedine, A., Juan, C., Idrissi, L., & Mañes, J. (2007). Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. *Microchemical Journal*, 87(2), 154–158.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.07.004>

Anexos

Anexo 1. Tabla de abreviaturas

AF	Aflatoxina
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
a_w	Actividad de agua
CCAH	Comité científico de la alimentación humana
DON	Deoxynivalenol
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assays
FM	Fumonisina
FMB1	Fumonisina B1
FMB2	Fumonisina B2
FMB3	Fumonisina B3
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LC	Cromatografía líquida
MIPS	Polímeros molecularmente impresos
MS	Espectrometría de masas
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano
OT	Ocratoxina
OTA	Ocratoxina A
PAT	Patulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TLC	Cromatografía de capa fina
TRC	Tricotecenos
ZEN	Zearalenona

Anexo 2. Tabla del contenido máximo permitido según el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de AF según los distintos tipos de productos alimenticios (elaboración propia a partir de la información del Reglamento).

Contenido máximo de AF ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
Productos	B1	Suma de B1, B2, G1 y G2
Todos los cereales y productos a base de cereales, incluidos los derivados de la transformación de estos	2	4
Maíz con destino a ser sometido a algún tratamiento físico con el fin de ser apto para su consumo	5	10
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles de lactancia y niños de corta edad	0,1	-

Anexo 3. Tabla del contenido máximo permitido según el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de OTA según los distintos tipos de productos alimenticios (elaboración propia a partir de la información del Reglamento).

Producto	Contenido máximo de OTA µg/kg
Cereales no elaborados	5
Productos derivados de cereales no elaborados, transformados a base de cereales y destinados al consumo humano directo	3
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles de lactancia y niños de corta edad	0,5

Anexo 4. Tabla del contenido máximo permitido según el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de DON según los distintos tipos de productos alimenticios (elaboración propia a partir de la información del Reglamento).

Producto	Contenido máximo de DON µg/kg
Cereales no elaborados que no sean trigo duro, avena y maíz	1250
Trigo duro y avena no elaborados	1750
Maíz no elaborado	1750
Cereales, harina de cereales, salvado y germen destinados al consumo humano directo	750
Pasta seca	750
Pan, pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales de desayuno	500
Alimentos a base de cereales y alimentos infantiles de lactancia y niños de corta edad	200

Anexo 5. Tabla del contenido máximo permitido según el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de ZEN según los distintos tipos de productos alimenticios (elaboración propia a partir de la información del Reglamento).

Producto	Contenido máximo de ZEN µg/kg
Cereales no elaborados distintos al maíz	100
Maíz no elaborado	200
Cereales, harina de cereales, salvado y germen destinados al consumo humano directo	75
Maíz destinado al consumo humano directo, harina de maíz, maíz molido, maíz triturado y aceite de maíz refinado	200
Aperitivos de maíz y cereales para el desayuno a base de maíz	50
Alimentos elaborados a base de cereales (excluidos los alimentos elaborados a base de maíz) y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	20
Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno, excluidos los aperitivos de maíz y los cereales para el desayuno a base de maíz	50
Alimentos elaborados a base de maíz para lactantes y niños de corta edad	20

Anexo 6. Tabla del contenido máximo permitido según el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de FM según los distintos tipos de productos alimenticios (elaboración propia a partir de la información del Reglamento).

Producto	Contenido máximo de FM (suma de FMB1 y FMB2) µg/kg
Maíz no elaborado	2000
Harina de maíz, maíz molido, maíz triturado, germen de maíz y aceite de maíz triturado	1000
Alimentos a base de maíz destinado al consumo humano directo	400
Alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles de lactancia y niños de corta edad	200