



Universidad de Valladolid

Análisis de micotoxinas en panes comerciales

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

PRESENTADO POR: Andrea Casado Fernández

TUTELADO POR: Irma Caro Canales, Manuel Gómez Pallarés



Escuela Técnica Superior
de Ingenierías Agrarias **Palencia**

ÍNDICE

Resumen / Abstract	
1. Introducción	1
1.1 Definición de micotoxinas	1
1.2 Presencia de micotoxinas en cereales y su control	2
1.2.1 Parámetros intrínsecos y extrínsecos que afectan al crecimiento de mohos productores de micotoxinas	3
1.2.2 Legislación alimentaria relacionada con micotoxinas	4
1.3 Tipos de micotoxinas	5
1.4 Análisis de micotoxinas en los alimentos	6
1.5 Objetivos y plan de trabajo	7
2. Materiales y métodos	8
2.1 Muestras de pan	8
2.2 Reactivos y productos químicos	8
2.3 Extracción de micotoxinas	9
2.3.1 Puesta a punto de la extracción / Optimización del método	9
2.3.2 Procedimiento de extracción llevado a cabo en muestras de pan	11
2.4 Análisis LC-MS/MS	12
2.5 Análisis estadístico.	13
3. Resultados y discusión	14
3.1 Ensayos preliminares	14
3.2 Validación del método	17
3.2 Determinación de micotoxinas en barras de pan	18
4. Conclusiones	23
Bibliografía	24
Anexos	31

RESUMEN

En el presente estudio se analizaron 40 muestras de pan, tanto de trigo blanco como integral, procedentes de elaboración industrial y artesanal disponibles en el mercado de Castilla y León (España). El objetivo principal fue identificar la presencia de diferentes micotoxinas: deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), aflatoxina B1 (AFB1) y aflatoxina B2 (AFB2). Para lograr este objetivo, se utilizó la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Las micotoxinas detectadas fueron DON y OTA, mientras que AFB2 fue hallada por debajo del límite de detección, y AFB1 no pudo ser identificada. Tanto DON como OTA, se observaron con mayor frecuencia en las muestras de pan integral en comparación con las de trigo blanco, así como en las muestras de elaboración industrial en contraste con las artesanales. Destacar, que todas las muestras analizadas se encontraron dentro de los límites establecidos por las regulaciones alimentarias, lo que sugiere que los niveles de micotoxinas detectados no presentan un riesgo inmediato para la seguridad alimentaria en relación con los estándares vigentes.

Palabras clave: Micotoxina, LC-MS/MS, Pan, Deoxynivalenol, Ocratoxina A, Aflatoxina B1, Aflatoxina B2.

ABSTRACT

In the present study, 40 samples of bread, both white and whole wheat, from industrial and artisan production available in the market of Castilla y León (Spain) were analysed. The main objective was to identify the presence of different mycotoxins: deoxynivalenol (DON), ochratoxin A (OTA), aflatoxin B1 (AFB1) and aflatoxin B2 (AFB2). To achieve this objective, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used. The mycotoxins detected were DON and OTA, while AFB2 was found below the detection limit, and AFB1 couldn't be identified. Both DON and OTA were more frequently observed in wholemeal bread samples compared to white wheat, as well as in industrially processed samples in contrast to artisan samples. It should be noted that all samples analysed were found to be within the limits set by food regulations, suggesting that the levels of mycotoxins detected don't present an immediate food safety risk in relation to current standards.

Keywords: Mycotoxin, LC-MS/MS, Bread, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin B1, Aflatoxin B2.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de micotoxinas

Las toxinas son sustancias químicas tóxicas que representan una amenaza para la seguridad alimentaria, lo cual conlleva implicaciones significativas tanto para la salud humana como para la salud animal. Por consiguiente, abordar este problema de manera efectiva resulta fundamental para asegurar la calidad y seguridad de los alimentos (Sforza et al., 2006).

El término “micotoxina” proviene de las palabras griegas “mikes” y “toxina”, que significan “hongo” y “veneno”, respectivamente y fue utilizado por primera vez en Inglaterra en 1960. Éstas se producen durante el crecimiento del moho, especialmente en la fase estacionaria y la fase de decrecimiento, es decir, al final de su ciclo de vida, (Goldblatt, 1972). El papel principal de las micotoxinas en la vida de estos mohos es regular la competencia con otros organismos (*Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment*, 1989).

Las micotoxinas, son metabolitos secundarios producidos de forma natural por diversos tipos de mohos, siendo los más importantes en su producción, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* (Yang et al., 2020; Sheng et al., 2022). Actualmente, se han identificado entre 300 y 400 tipos de micotoxinas entre las cuales encontramos a las aflatoxinas (AFB1, AFB2), ocratoxinas (OTA), y deoxinivalenol (DON) (Sheng et al., 2022).

La enfermedad causada por este tipo de compuestos se denomina micotoxicosis, donde los primeros casos documentados se remontan a la Edad Media y se atribuyeron a la contaminación de centeno por *Claviceps purpurea* (GajduSek, 1953). La micotoxicosis puede causar efectos agudos y crónicos en la salud de las personas y animales a través de su ingestión, la inhalación y el contacto con la piel, así como al ingresar al sistema linfático y al torrente sanguíneo (Awuchi et al., 2022).

La ingesta de alimentos contaminados por micotoxinas puede tener graves consecuencias para la salud, incluso llegar a ser mortal, dependiendo de la micotoxina y la cantidad consumida. Entre los efectos nocivos causados destacan la hepatotoxicidad, la nefrotoxicidad, la carcinogénesis, la inmunosupresión y la mutagenicidad (Rocha et al., 2014). Además, se está llevando a cabo una investigación exhaustiva sobre la bioacumulación de las micotoxinas, lo que implica su presencia crónica a lo largo de la cadena alimentaria (Oliveira & Vasconcelos, 2020).

1.2 Presencia de micotoxinas en cereales y su control

La importancia del control de las micotoxinas radica en las condiciones favorables para el desarrollo de mohos en los cultivos, la facilidad con la que los cereales pueden contaminarse durante su manejo y su extenso consumo en la dieta (Kovač et al., 2022). En España, por ejemplo, cada individuo consume en promedio 30,07 kilos de pan al año (*Informe de Consumo Alimentario en España*, 2021). Además, existe una legislación alimentaria que debe ser cumplida para asegurar la seguridad de los piensos y alimentos, tanto en España como en la Unión Europea (AFHSE, 2015; Kovač et al., 2022).

Para controlar la formación y contaminación por micotoxinas, se emplean estrategias preventivas y de descontaminación antes y después de la cosecha. Medidas preventivas incluyen uso de variedades resistentes, reducción de estrés en plantas, manejo de insecticidas y herbicidas, rotación de cultivos, cosecha oportuna y manejo adecuado de residuos. Métodos posteriores abarcan almacenamiento en condiciones adecuadas y fungicidas. Estas acciones están reguladas por el Reglamento (CE) No 1881/2006, y la Recomendación 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.

En la actualidad, se están explorando diversas estrategias con el objetivo de reducir la presencia de micotoxinas en los alimentos. Una estrategia prometedora implica el uso de microorganismos y sus enzimas para biotransformar micotoxinas en condiciones favorables. Aunque tienen potencial debido a su especificidad, es esencial garantizar que no sean patógenos y no afecten la composición del alimento ni la microbiota intestinal (Xu et al., 2022; Y. Zhu et al., 2017).

Diferentes estudios exploran la fermentación y la extrusión para reducir micotoxinas en productos de cereales. Algunos sugieren reducción exitosa, pero otros indican aumento. Dada la discrepancia, es crucial investigar más para determinar condiciones precisas en fermentación y extrusión que reduzcan micotoxinas eficazmente sin aumentar su concentración (Mousavi Khaneghah et al., 2018; Vidal et al., 2014; Wu et al., 2011). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, levadura responsable de la fermentación panaria, se ha demostrado que tiene la capacidad de degradar la patulina, micotoxina producida por *Penicillium* (Moss & Long, 2002). Al metabolizar la patulina durante la fermentación, esta levadura ayuda a reducir su presencia en el pan final, jugando un papel fundamental en la mejora de la seguridad del producto alimentario.

Además, se están estudiando otras estrategias para disminuir la contaminación por micotoxinas en los alimentos, por ejemplo, el empleo de la acidificación, la amonización, la ozonización (Soares Mateus et al., 2021), la irradiación con haz de electrones (Mousavi Khaneghah et al., 2020), y el campo eléctrico pulsado (Aron Maftai et al., 2014). De todas ellas, la ozonización es la técnica más satisfactoria para aplicar a la harina de trigo en la elaboración panaria a la hora de minimizar los cambios en su calidad. Tratamientos suaves de ozono en menos de 9 minutos disminuyen micotoxinas, aumentan el volumen y la esponjosidad de la masa, evitando el endurecimiento del pan. Sin embargo, podría causar un ligero blanqueamiento. En países que aún usan el carcinógeno bromato de potasio en panificación, la ozonización es una alternativa segura y efectiva para mejorar la seguridad alimentaria (Sandhu et al., 2011; F. Zhu, 2018).

1.2.1 Parámetros intrínsecos y extrínsecos que afectan al crecimiento de mohos productores de micotoxinas

Durante el proceso de panificación y en las etapas de producción agrícola del trigo, pueden surgir condiciones favorables o desfavorables para el desarrollo de mohos y la producción de micotoxinas. Este desarrollo está influenciado por tres factores fundamentales: físicos, químicos y biológicos.

Los **factores físicos**, como la humedad, la actividad de agua, la temperatura, las zonas de microflora, la composición de la matriz alimentaria, el grado de su deterioro físico, y la propia presencia de esporas de moho desempeñan un papel crucial en el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas (Romero Donato et al., 2022; Sforza et al., 2006). El crecimiento de mohos productores de micotoxinas ocurre en un rango de actividad de agua (aw) de 0'70 a 0'99, siendo la producción baja por debajo de 0'85. Además, a medida que la humedad aumenta, el crecimiento y la proliferación de mohos se acelera, siendo un nivel bajo en valores <13%, y altos a valores >16%. La temperatura ideal es de 25-30°C, con un límite máximo de 40-45°C. El almacenamiento de cereales crea microambientes en silos debido a cambios de temperatura y humedad, afectando el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas. La integridad de los granos también importa; los granos intactos limitan el acceso de hongos al almidón, mientras que los partidos favorecen la invasión y el desarrollo fúngico (Gimeno, 2002; Gimeno & Ligia Martins, 2003).

Los **factores químicos**, como el pH del medio, la composición del sustrato, los nutrientes minerales y el potencial de reducción-oxidación, tienen un impacto en la disponibilidad de nutrientes para los hongos y en su capacidad para producir

micotoxinas antes de la cosecha. Los mohos son capaces de tolerar un amplio rango de pH (2,5 - 7,5), y se ha observado que la composición del sustrato está estrechamente relacionada con la producción de diferentes tipos de micotoxinas. Hierro y zinc son clave para el crecimiento, mientras que la falta de oxígeno limita el desarrollo y su ausencia causa la muerte de hongos (Gimeno, 2002; Gimeno & Ligia Martins, 2003).

Los **factores biológicos** se refieren a la presencia de invertebrados y especies específicas de mohos. La presencia de insectos ayuda a transportar y dispersar las esporas de mohos, contribuyendo así a la propagación de la contaminación por micotoxinas. Además, ciertas especies de mohos tienen una mayor capacidad para producir micotoxinas (Gimeno, 2002; Gimeno & Ligia Martins, 2003).

Las micotoxinas pueden generarse en diferentes etapas: cultivo, cosecha, almacenamiento, procesamiento y consumo, siendo diferentes vías de contaminación (Sforza et al., 2006).

El mayor desafío reside en que, una vez presentes en los alimentos, las micotoxinas no se pueden eliminar por completo, incluso después de procesos como secado y molienda. Si las esporas siguen presentes y los protocolos preventivos no se cumplen, pueden multiplicarse. Además, las micotoxinas resisten el calor, persistiendo en procesos de cocción (AESAN, 2022).

En España, apenas existen estudios sobre la cuantificación de micotoxinas en el pan (Burdaspal Pérez & Legarda, 2001; Cano-Sancho et al., 2011; Osnaya et al., 2006; Saladino et al., 2017), y según la bibliografía consultada no existen estudios sobre la presencia o cuantificación de micotoxinas en panes de Castilla y León. Además, nos preguntamos si hay mayor riesgo de encontrar niveles más altos de micotoxinas en el pan integral en comparación con el pan blanco, y si el proceso de elaboración ya sea industrial o artesanal, también puede influir en este aspecto.

1.2.2 Legislación alimentaria relacionada con micotoxinas

La legislación alimentaria en Europa y en España establece límites máximos permitidos de micotoxinas en los alimentos, así como requisitos de buenas prácticas agrícolas, almacenamiento y procesamiento para prevenir o reducir la contaminación por micotoxinas. Estos límites se basan en evaluaciones de riesgo llevadas a cabo con evidencias científicas y se actualizan periódicamente para reflejar los avances en la investigación y la comprensión de los efectos de las micotoxinas en la salud. En el *Anexo 1* se detallan los contenidos máximos de DON, AFs y OTA permitidos en los alimentos

relacionados con los cereales, siendo en el caso del pan, 500, 2, y 3 µg/kg para DON, AFB1 y OTA, respectivamente.

1.3 Tipos de micotoxinas

Las micotoxinas más destacadas en términos de su impacto en la salud humana y animal son las aflatoxinas (AFs), la ocratoxina A (OTA) y las toxinas pertenecientes al género *Fusarium*, como el deoxinivalenol (DON) entre otras.

La investigación de las micotoxinas, los mohos productores, las enfermedades asociadas y los alimentos implicados es esencial para comprender los riesgos relacionados con la contaminación alimentaria. Con el objetivo de proporcionar una visión clara y concisa de esta problemática, el *Anexo 2*, destaca algunas de las micotoxinas más comunes, junto con los principales géneros y especies de mohos que pueden producirlas, así como los síntomas más destacados de la micotoxicosis asociada.

La aflatoxina B1 (AFB1) es el compuesto más tóxico de este grupo, siendo uno de los hepato-carcinógenos conocidos más potentes. Además, se ha observado que puede causar efectos teratogénicos y mutagénicos, así como provocar carcinomas en otros órganos como los pulmones, el miocardio y los riñones (Cao et al., 2022). Actualmente se están investigando sus posibles efectos en el deterioro del crecimiento infantil (McMillan et al., 2018).

En relación con la ocratoxina A (OTA), se ha identificado que su principal órgano diana para causar efectos adversos es el riñón, lo que la convierte en un compuesto nefrotóxico. Además, se ha comprobado que es una sustancia carcinogénica, teratogénica, inmunotóxica y neurotóxica (Schrenk et al., 2020).

El deoxinivalenol (DON), conocido como “vomitoxina”, causa brotes por exposición aguda con síntomas que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, dolores de cabeza, mareos, fiebre, y en casos graves, rectorragia. Puede unirse a los ribosomas, inhibiendo la síntesis de proteínas y, posteriormente, también la síntesis de ARN y ADN. Esta unión induce estrés ribotóxico y activa diferentes proteínas quinasas activadas por mitógenos, provocando una respuesta inflamatoria y estrés oxidativo (Knutsen et al., 2017). A dosis bajas, estimula el sistema inmunológico, pero a altas dosis, causa inmunosupresión (Vatzia et al., 2020; W. Yang et al., 2019).

Debido a esto, la presencia de micotoxinas en los alimentos es un riesgo a largo plazo para la salud humana, y por ello, se han llevado a cabo numerosas investigaciones dedicadas a su estudio.

1.4 Análisis de micotoxinas en los alimentos

El análisis de micotoxinas en alimentos implica diversas etapas, que incluyen la preparación de la muestra, la extracción de las micotoxinas de la matriz y la posterior identificación y cuantificación de éstas.

Actualmente, existen diversos métodos analíticos para determinar su presencia en los alimentos, el HPLC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem), es el método más utilizado actualmente para el análisis de micotoxinas (Agriopoulou et al., 2020; Bi et al., 2022). Además, también suele emplearse la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía de gases (CG), y ensayos inmunológicos (ELISA) (Krska et al., 2008).

Respecto al método de extracción, las técnicas más tradicionalmente empleadas para el análisis LC-MS/MS y micotoxinas son la extracción en fase sólida (SPE), la extracción sólido-líquido (SLE) y la extracción líquido-líquido (LLE) (Turner et al., 2009). Actualmente, ha surgido el método que combina la extracción y el uso de una mezcla de sales que tienen como función retener compuestos del alimento que puedan interferir en la identificación y cuantificación de micotoxinas, denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), que, de acuerdo con la búsqueda en PubMed (junio 2023), existen más de 200 artículos científicos que cubren aspectos o usan QuEChERS combinados con procedimientos de extracción. Otro aspecto a resaltar en la cuantificación de estos compuestos es el porcentaje de recuperación, en este sentido, es importante tener en cuenta que, si bien algunos alimentos pueden mostrar altas tasas de recuperación de micotoxinas con ese método, esto puede variar dependiendo de la matriz alimentaria (Facorro et al., 2020). Los pasos comunes del método QuEChERS son la extracción líquido-líquido o líquido-sólido entre una fase orgánica e inorgánica, la adición de sales, la agitación de la muestra, y la limpieza empleando una fase sólida dispersiva (Musarurwa et al., 2019).

El desafío de los análisis de las micotoxinas, es que estas difieren en su estructura química y en su polaridad (AFHSE, 2015) por lo tanto, la elección correcta del método de extracción es bastante complicado.

La técnica HPLC-MS/MS es una técnica analítica que combina la separación de compuestos mediante cromatografía líquida (LC) con la capacidad de identificar y

cuantificar con precisión compuestos individuales que proporciona la espectrometría de masas (MS/MS) (SCIEX, 2021). Se usa principalmente para la cuantificación de microcomponentes capaces de formar iones, como proteínas y péptidos (Xudong, 2022), fármacos (Freeman et al., 2015), o micotoxinas.

El principio básico de funcionamiento se basa en la ionización de las moléculas de la muestra, seguida por la separación y detección de los iones resultantes según su relación masa-carga (m/z).

El espectrómetro de masas cuenta con una serie de componentes, incluyendo la placa de chapa y placa del orificio (fuente de iones) (1), la guía de iones IonDrive QJet (2), los cuadrupolos Q0 (3), Q1 (4), Q2 (5) y Q3 (6), y el detector (7) (Figura 1).

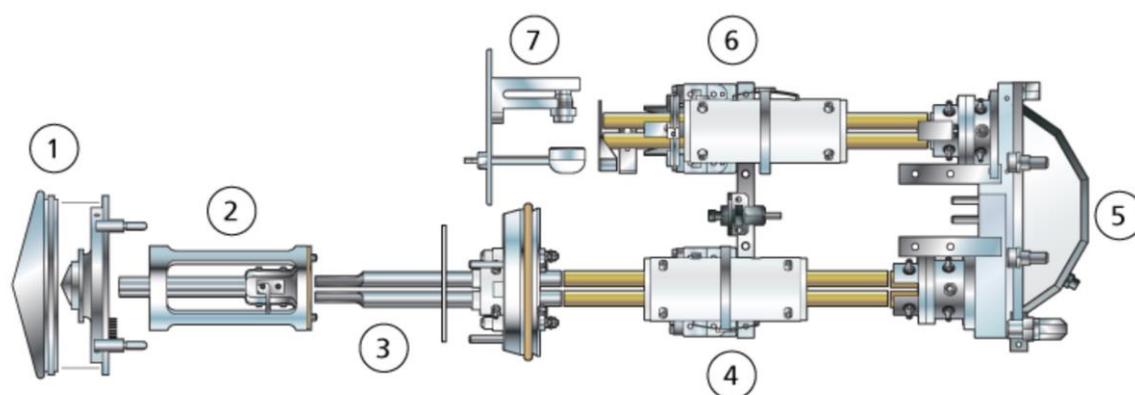


Figura 1 Ruta iónica del espectrómetro de masas (SCIEX, 2021).

En la placa de chapa se ioniza la muestra líquida, y los iones son transferidos a través de la guía de iones IonDrive QJet hacia los cuadrupolos Q0, Q1 y Q2. El cuadrupolo Q2 es una celda de colisión que se utiliza para fragmentar los iones y separarlos según su proporción m/z . Los iones fragmentados son transferidos al cuadrupolo final, Q3, donde se filtran según su proporción m/z antes de ser detectados por el detector. El detector convierte las señales eléctricas en una señal analógica que representa la intensidad relativa de los iones detectados en función del tiempo.

HPLC-MS/MS es una técnica altamente efectiva para analizar micotoxinas debido a su alta sensibilidad, especificidad y capacidad de cuantificación precisa, aunque puede tener limitaciones en términos de costo y tiempo de análisis (SCIEX, 2021).

1.5 Objetivos y plan de trabajo

La presente investigación sobre la detección de micotoxinas en el pan tiene tres objetivos fundamentales: a) establecer un método de análisis de micotoxinas en el pan b) cuantificar las principales micotoxinas (AFB1, AFB2, OTA, DON) presentes en el pan

blanco e integral, ya sea de producción industrial o artesanal, c) evaluar si los niveles de micotoxinas encontrados cumplen con los estándares establecidos por la legislación alimentaria vigente.

Para llevar a cabo este proceso, primero validaremos un método de extracción adecuado para la matriz del pan. A continuación, procederemos a realizar un muestreo de 20 muestras de pan blanco y 20 muestras de pan integral provenientes de 20 panaderías distintas, que incluirán 10 panaderías artesanales y 10 superficies comerciales en las que terminan de hornear panes precocidos, a los que denominaremos industriales. Nos aseguraremos obtener el mismo número de muestras de cada tipo y elaboración, realizando posteriormente un duplicado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras de pan

Un total de 40 muestras de pan, por duplicado y 4 semanas de diferencia, fueron obtenidas de 20 establecimientos; 10 de venta de panes de elaboración industrial, y 10 de elaboración artesanal. En total, se analizaron 80 barras de pan; 40 barras de elaboración industrial y 40 barras de obradores artesanales ubicados en León, Palencia y Valladolid (España), durante el periodo comprendido entre abril y junio de 2023. De cada establecimiento se obtuvo una barra blanca y una integral haciendo un total de 20 barras de cada tipo: pan artesanal blanco, pan artesanal integral, pan industrial blanco y pan industrial integral. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en el envase provisto por el elaborador y procesadas antes de 24 horas. La mitad de cada barra de pan se molió con ayuda de un procesador de cocina (Cecotec1000; Valencia, España), incluyendo tanto la miga como la corteza, se colocó en una bolsa de plástico y se almacenó a -20°C hasta el momento del análisis.

2.2 Reactivos y productos químicos

Los patrones de AFB1, AFB2, DON, OTA (pureza de micotoxinas > 99 %), se obtuvieron de Romer Labs (EE. UU.). El metanol (grado LC-MS, pureza $\geq 99,9\%$), y el acetonitrilo (Grado HPLC) se adquirieron de VWR International LLC (BDH CHEMICALS, EE. UU.) El agua desionizada (<18 M Ω ·cm de resistividad) se obtuvo de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Alemania).

Para disponer de los patrones de micotoxinas de DON, OTA, y AFB1, se prepararon soluciones madre disolviendo 1 mg de cada micotoxina en 1 mL de metanol puro. Sin embargo, en el caso de AFB2, se utilizó 1 mL de acetonitrilo en lugar de metanol, ya

que la micotoxina no se disolvía adecuadamente. Estas diluciones, resultaron en una solución de 1 mg/mL (1000 ppm). Posteriormente, estas soluciones madre se diluyeron en metanol puro para obtener las diluciones de trabajo adecuadas para DON, OTA, AFB1 y AFB2. Éstas se almacenaron a -20 °C en ausencia de luz antes de su uso.

2.3 Extracción de micotoxinas

2.3.1 Puesta a punto de la extracción / Optimización del método

Este estudio se realizó en parte en las instalaciones de investigación del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. El proceso de optimización se centró en la selección de los disolventes de extracción más adecuados junto con un proceso de limpieza. Se buscó garantizar la eficiencia de recuperación de las micotoxinas, al tiempo que se minimizaba la interferencia de otros componentes presentes en los panes, como lípidos o aminoácidos. Se realizaron pruebas de validación del método, evaluando parámetros como los límites de detección y cuantificación.

Se llevaron a cabo diversas combinaciones de disolventes orgánicos para la extracción de micotoxinas, siguiendo las recomendaciones descritas por Saladino et al. (2017), Serrano et al. (2013), Phenomenex, (2023), y Vaclavikova et al. (2013):

En primer lugar, se emplearon los métodos descritos por Saladino et al. (2017) y Serrano et al. (2013) con algunas modificaciones como se describe brevemente a continuación. Se utilizó una muestra homogénea representativa de 5 g de pan, que se depositó en un vaso de precipitados de 100 mL. Para la extracción, se utilizaron 50 mL de ACN-MeOH (1:1), y se agregó un multipatrón de micotoxinas de una concentración conocida que contenía DON, AFB1 y OTA. Ésta, se homogenizó utilizando un ultraturrax (Micra D-9, Alemania) durante 3 minutos a 12000 rpm. A continuación, la muestra se depositó en dos tubos de 50 mL a partes iguales, y se centrifugó durante 15 minutos a 4000 rpm a 5°C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se llevó a sequedad utilizando un Rotavapor R-200 Büchi (Postfach, Suiza), a 35°C. Durante los primeros 10 minutos de secado, se utilizó una velocidad de rotación de 30 rpm, y luego se aumentó progresivamente hasta 280 rpm. Para determinar el método óptimo de disolución de las muestras desecadas, se utilizaron 5 mL de diferentes combinaciones de disolventes orgánicos: a) MeOH b) ACN, c) MeOH-H₂O (1:1), d) ACN-H₂O (1:1). Dado que la combinación ACN-H₂O fue la que mejor disolvió la muestra seca, fue el disolvente seleccionado. Posteriormente, la muestra se evaporó hasta sequedad con gas nitrógeno a 35°C utilizando un evaporador Reacti-Therm™ #TS-18822 Thermo Scientific™ (EE.UU). Finalmente, la muestra se reconstituyó con 1 mL de MeOH-H₂O (1:1), y se

filtró con un filtro de jeringa de nylon de 13mm/0,22µm (SFNY-122-100, BRANCHIA). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

El segundo método usado para la extracción fue el recomendado por Phenomenex, (2023) para alimentos a base de cereales, con ligeras modificaciones que se describen brevemente a continuación. Se depositaron 5 g de una muestra de pan previamente molida en un tubo de ensayo de 50 mL. Para realizar la extracción, se emplearon diferentes combinaciones de disolventes orgánicos: a) 10 mL de ACN-Ac.Fórmico (99:1) y 10 mL de H₂O b) 20 mL de ACN-H₂O (1:1), c) 20 mL de MeOH, d) 20 mL de ACN. Tras añadir los disolventes, se agregó un multipatrón de micotoxinas de una concentración conocida que contenía DON, AFB1 y OTA. La mezcla muestra-disolvente fue homogenizada agitándola vigorosamente con la mano durante 3 minutos. Seguidamente las muestras fueron limpiadas empleando la fase sólida de extracción roQ QuEChERS kits (4g de sulfato de magnesio, 1g de cloruro de sodio, 1g de citrato sódico tribásico dihidratado, y 0,5g de citrato sódico dibásico sesquihidratado) (Phenomenex), posteriormente se agitó con ayuda de un ultraturrax durante 3 minutos. Se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm a 5°C. La fase orgánica se depositó en un tubo de ensayo, y se recogió una alícuota de 1 mL que se llevó hasta sequedad mediante nitrógeno, reconstituyéndose y filtrándose en las condiciones descritas anteriormente. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

Dado que las muestras presentaron residuos o cierto grado de turbidez, se decidió emplear adicionalmente, dos métodos de limpieza; columnas de limpieza Myco-MS: TC-MT3000 PuriTox (Escocia, Inglaterra), y tubos de limpieza de 2 mL que contenían 0,15 g de sulfato de magnesio y 25 mg de PSA (Sorbents tested for dispersive-SPE included primary secondary amine). Cuando se empleó una columna de limpieza la muestra fue filtrada a través de la columna hasta obtener 1 mL, posteriormente esa misma cantidad fue llevada a sequedad con nitrógeno gaseoso, reconstituido, y filtrado siguiendo condiciones descritas anteriormente.

En el segundo caso, 1 mL del sobrenadante obtenido de la primera limpieza se depositó en el tubo de limpieza PSA. La mezcla se agitó y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se secó con nitrógeno, fue reconstituido y filtrado a través de las condiciones descritas anteriormente.

Debido a que la señal obtenida en el cromatógrafo a partir de las muestras obtenidas por ambos métodos no fue lo suficientemente satisfactoria, además de que presentaban problemas de disolución e impurezas, se decidió llevar a cabo el procedimiento de Vaclavikova et al., 2013 con ligeras modificaciones descritas a continuación.

Se tomó una muestra homogénea representativa de 2 gramos, y se colocó en un tubo de ensayo de 50 mL. Después, se agregaron 7,5 mL de H₂O y 10 mL de acetonitrilo y agregó un multipatrón de micotoxinas de una concentración conocida que contenía DON, AFB1 y OTA, posteriormente se agitó vigorosamente con la mano durante 3 minutos. Para proceder a la limpieza, se añadió 1 g de NaCl y 4 g de MgSO₄ anhidro, agitando nuevamente durante otros 3 minutos con ayuda de un ultraturrax para su homogenización. A continuación, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm y 5°C para separar la fase acuosa de la orgánica. El sobrenadante que se encontraba en la fase orgánica se depositó en un tubo de ensayo, y se recogió una alícuota de 1 mL que se llevó hasta sequedad mediante nitrógeno, reconstituyéndose y filtrándose en las condiciones descritas anteriormente. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis. Se analizaron por LC-MS/MS únicamente, las muestras que no presentaron turbidez después del filtrado. En base en los resultados obtenidos, nuestro objetivo fue mejorar aún más este proceso, centrándonos en los métodos de limpieza recomendados por Phenomenex, (2023) empleando 20 mL ACN-MET (1:1) como disolventes de extracción, y el de Vaclavikova et al. (2013), ya que demostraron los mejores resultados.

En este segundo experimento, se comparó la eficacia de dos tipos de sulfato de magnesio: el sulfato de magnesio anhidro y el sulfato de magnesio monohidratado. Además, evaluamos dos métodos de agitación diferentes: la agitación manual y la agitación utilizando un ultraturrax. En el *Anexo 3* se recogen las operaciones básicas de la preparación de la muestra, así como, la mezcla de disolventes utilizados, los tipos de compuestos utilizados para la limpieza de muestra y el tipo de agitación utilizada.

2.3.2 Procedimiento de extracción llevado a cabo en muestras de pan

Se siguió el procedimiento descrito por Vaclavikova et al. (2013), con algunas modificaciones (*Figura 2*). Se validó el procedimiento y se encontró que era efectivo en el pan de barra. Para llevarlo a cabo, se tomó una muestra homogénea representativa de 2 gramos y se colocó en un tubo de ensayo cónico graduado de 50 mL. Luego, se agregaron 7,5 mL de H₂O Milli-Q y 10 mL de acetonitrilo, y se agitó vigorosamente con la mano durante 3 minutos. Se añadió 1 g de NaCl y 4 g de MgSO₄·1H₂O, agitando nuevamente con la mano durante otros 3 minutos. Seguidamente, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm a 5°C para separar la fase acuosa de la orgánica. Al finalizar la centrifugación, se observaron 2 fases, acuosa y orgánica (*Anexo 4*). Con ayuda de una pipeta Pasteur se recogió la fase orgánica que se encontraba en la parte superior, y se depositó en un tubo Falcon de 15 mL. A continuación, se agitó adecuadamente con ayuda de un vortex. Posteriormente, se recogió una alícuota de 1

mL en un tubo *Eppendorf* que se evaporó hasta sequedad con ayuda de gas nitrógeno a 35°C usando un evaporador Thermo Scientific™ (Reacti-Therm™, #TS-18822). Después de la evaporación del solvente, se reconstituyó con 1 mL de MeOH-H₂O (1:1) y se filtró con un filtro de jeringa de nylon de 13mm/0,22µm (SFNY-122-100, BRANCHIA) antes de ser almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

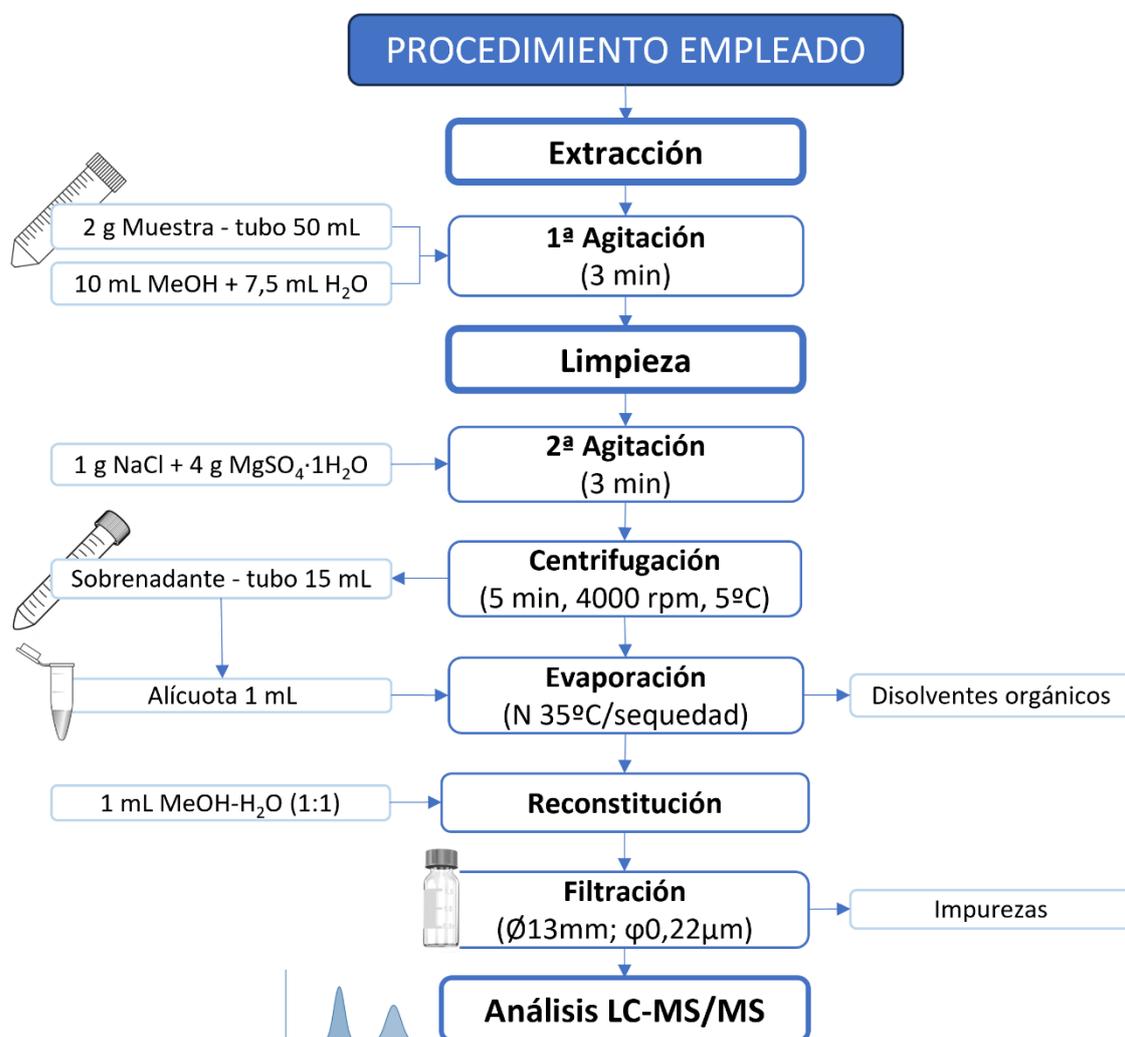


Figura 2 Procedimiento de extracción llevado a cabo en este estudio.

2.4 Análisis LC-MS/MS

Los análisis de LC se realizaron empleando fuentes de Ionización por electro-espray (ESI). Las condiciones óptimas de LC para la separación cromatográfica de las 4 micotoxinas se obtuvieron utilizando una columna Luna Omega Polar C18 de Phenomenex (1,6 µm; 100 x 2.1 mm), bajo una elución en gradiente, termostatada a 40°C. Las fases móviles estaban constituidas por agua con 0,1% de ácido fórmico (disolvente A), y acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico (disolvente B). Se estableció un programa en gradiente: 0-1 min con 80% de A; un gradiente lineal entre los 1-6 min hasta 10% de A; un mantenimiento en 10% de A entre los 6-8 min; retorno a 80% de A

en el minuto 8,1; y mantenimiento en 80% de A entre 8,1-14 min. El tiempo total de ejecución del cromatograma fue de 14 minutos. El flujo fue de 0,4 ml/min, y el volumen de inyección de 10 μ L.

La detección MS se realizó con un espectrómetro de masas Triple Quad 6500+ de SCIEX acoplado a 2D-UHPL de la serie EXION LC de SCIEX (California, EE.UU). Los parámetros del equipo fueron los siguientes: la temperatura de la fuente, 300°C; el voltaje de pulverización de iones, 4500 V; la presión de la cortina de gas, 35 psi; y las presiones del primer y segundo gas de la fuente de iones, 45 psi en ambas. La adquisición de los datos se realizó con el software Analyst® (Versión 1.7.3; Sciex), y su procesamiento se analizó con el software SciexOS (Versión 1.4.1; Sciex). Las transiciones de iones precursores a productos se reflejan en la *Tabla 1*.

Tabla 1 Parámetros del LC-MS/MS para la identificación y confirmación de DON, AFB2, AFB1 y OTA.

<i>Iones Micotoxinas</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>	<i>Q1 (m/z)</i>	<i>Q3 (m/z)</i>	<i>Dwell (ms)</i>	<i>CE</i>	<i>CXP</i>	<i>DP</i>
OTA pos 1	8,55	404,10	239,00	50,00	28,00	19,00	45,00
OTA pos 4		404,10	221,00	50,00	60,00	19,00	45,00
AFB2 pos 1	6,81	315,02	287,10	50,00	37,00	10,00	116,00
AFB2 pos 2		315,02	259,10	50,00	43,00	8,00	116,00
AFB1 pos 2	7,18	312,97	241,00	50,00	53,00	18,00	106,00
AFB1 pos 1		312,97	285,20	50,00	35,00	10,00	106,00
DON pos 1	1,08	297,11	249,20	50,00	15,00	10,00	46,00
DON pos 3		297,11	203,20	50,00	25,00	22,00	46,00

***Tiempo de retención**, tiempo en el que la micotoxina viaja a través del LC-MS/MS antes de ser detectada; **Q1**, cuadrupolo 1 permite la selección del ion precursor o "parent ion"; **Q3**, cuadrupolo 3 permite la selección de dos iones producto o "daughter ions"; **Dwell (ms)**, tiempo de permanencia; **CE**, energía de colisión; **CXP**, potencial de energía de colisión; **DP**, potencial de deriva.

La presencia de micotoxinas se consideró positiva en la muestra cuando se cumplieron los criterios de confirmación definidos en el documento SANTE/12089/2016: a) se observó una señal visible en al menos dos transiciones seleccionadas para cada micotoxina y su correspondiente estándar interno (IS); b) el tiempo de retención del extracto de la muestra coincidió con la media de los patrones de calibración medidos en la misma secuencia, con una tolerancia de $\pm 0,2$ minutos; c) el tiempo de retención del analito coincidió con el patrón con una tolerancia de $\pm 0,05$ minutos; d) la relación del área de pico entre las diferentes reacciones de transición registradas para cada analito fue de al menos $\pm 30\%$ (relativamente).

2.5 Análisis estadístico.

A partir de los datos experimentales, previamente calculados empleando la recta patrón, se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) de medidas repetidas donde las

variables dependientes fueron cada una de las micotoxinas, y el factor fijo fue el tratamiento “tipo de pan” o “tipo de elaboración”. En las micotoxinas donde el análisis de varianza dio diferencias significativas para el factor tratamiento con un valor de $p < 0,05$ se llevó a cabo la prueba de Tukey, comparando el contenido de micotoxinas de la procedencia del pan y tipo de pan, considerando efecto significativo a un $p < 0,05$. Para determinar si existe una asociación lineal significativa entre las variables, se realizó un modelo de regresión simple para examinar la relación entre DON y OTA en un estudio correlacional. Para llevar a cabo el análisis estadístico, se utilizó el programa Statgraphics Centurión (Versión 19.3.03; Statgraphics Technologies, Inc).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Ensayos preliminares

En ensayos preliminares, se han evaluado los procedimientos de extracción de micotoxinas descritos por Saladino et al. (2017), y Serrano et al. (2013). Estos métodos de extracción mostraron principalmente dos problemas analíticos: pérdidas de muestra, y presencia de turbidez en la disolución final. La pérdida de muestra fue observada durante la agitación con el ultraturrax, parte de ella quedó adherida al vástago del equipo; y durante el secado empleando el rotavapor, parte de ésta también quedó adherida al matraz (*Anexo 5*). Además, una vez reconstituida y filtrada la muestra, ésta presentaba turbidez, lo que dificultó su análisis y cuantificación en el equipo LC-MS/MS. En las muestras que pudieron ser analizadas a través del LC-MS/MS fue posible observar la presencia de AFB1 y OTA, pero la intensidad de los picos obtenidos de estas micotoxinas fue muy baja. Diversos autores han demostrado un efecto de matriz-analito (micotoxina), y efecto matriz-disolvente, influenciado principalmente por la cantidad de agua presente en la mezcla de extracción, debido a la absorción de ésta por la matriz (Spanjer et al., 2008; Stroka et al., 1999). Sulyok et al. (2010), observaron una pérdida del analito debido a una incompleta extracción en algunas matrices, incluyendo cereales y pan, cuando usaron una combinación acetonitrilo-agua + 0,1% de ácido fórmico como disolvente de extracción. La extracción incompleta y el efecto matriz dan lugar a una subestimación de las concentraciones reales de micotoxinas. Aun así, este ensayo preliminar permitió observar que los disolventes propuestos en los procedimientos de extracción citados permitían extraer AFB1 y OTA.

A partir de los resultados mencionados, se decidieron llevar a cabo dos procedimientos diferentes de extracción descritos por: a) Phenomenex (2023), b) Vaclavikova et al. (2013), cada uno de estos métodos incluía un procedimiento de limpieza de muestra diferente. Los resultados de la presencia de micotoxinas obtenidos a partir de estos

procedimientos se recogen en la *Tabla 2*. En el primer método de extracción, usando como matriz el pan, la combinación ACN-H₂O con y sin ácido fórmico, y limpieza mediante QuEChERS, no mostró la presencia de OTA, ni permitió su cuantificación. El uso de QuEChERS ha sido utilizado por diversos autores en la extracción de micotoxinas (Facorro et al., 2020; Zachariasova et al., 2010). Esta mezcla de compuestos remueve los azúcares, los ácidos orgánicos y los ácidos grasos presentes en la muestra y que interfieren en la cuantificación de las micotoxinas. Sin embargo, Zachariasova et al., (2010) mencionan que la extracción llevada a cabo con fase sólida dispersa por la adición de PSA, las micotoxinas de naturaleza ácida como es el caso de OTA, se une al solvente que contiene aminas primarias y secundarias, quedando atrapada y evitando su detección y cuantificación en las muestras de pan. En este estudio (ver *Tabla 2*) cuando se utilizó acetonitrilo, la mezcla ACN-H₂O + ácido fórmico como disolventes para la extracción de micotoxinas combinado con QuEChERS y PSA, OTA no estuvo presente. Aunque, esta unión no la hemos observado para otras micotoxinas, la intensidad de los picos obtenidos a partir de los patrones fue muy baja teniendo en cuenta la concentración agregada, lo que indica una unión PSA+AFB₁, estos resultados fueron similares a los encontrados por Zachariasova et al., (2010), quienes observaron la unión de AFB con PSA.

Tabla 2 Comparación de resultados mediante presencia/ausencia empleando los diferentes métodos.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA***		DON	AFB ₁	OTA
Disolventes	Limpieza			
20 mL ACN-MeOH (1:1)	QuEChERS + CL*	NO	SI ↓	SI
	QuEChERS + PSA**	SI ↓↓	SI	SI
20 mL ACN-MeOH (1:1) (Sin muestra)	QuEChERS + PSA**	NO	SI	SI ↓
1 mL ACN-MeOH (1:1) (Patrón, sin muestra)	-	SI ↓↓	SI	SI
20 mL ACN	QuEChERS + CL*	SI ↓↓	SI ↓	SI
	QuEChERS + PSA**	SI ↓↓	SI	NO
20 mL ACN (1% Ac.Form) - H ₂ O (1:1)	QuEChERS + CL*	SI ↓↓	SI	NO
	QuEChERS + PSA**	SI ↓↓	SI	NO
1 mL ACN (1% Ac.Form) - H ₂ O (1:1) (Patrón, sin muestra)	-	SI ↓↓	SI	SI
20 mL ACN - H ₂ O (1:1)	QuEChERS + PSA**	SI ↓↓	SI	NO
10 mL ACN + 7,5 mL H ₂ O	1g NaCl + 4g MgSO ₄	SI ↓	SI	SI

* CL, Columna de limpieza; ** PSA, Tubo de limpieza de sulfato de magnesio; *** A todas las muestras se agregaron los estándares. Todos los experimentos se hicieron al menos por duplicado.

Así mismo, se observó una pérdida o ausencia de DON al emplear ACN-MeOH como disolvente + QuEChERS combinado con la columna de limpieza y PSA. Esto puede ser debido a un desplazamiento de DON a la fase acuosa o la unión de DON con las aminas primarias y secundarias presentes en el PSA y QuEChERS. El procedimiento de Vaclavikova et al. (2013), en el que se emplean ACN-H₂O como disolventes, y NaCl +

MgSO₄ en la limpieza, mostró los mejores resultados en términos de recuperación de micotoxinas, siendo elegido, junto con la extracción ACN-MeOH + QuEChERS + PSA para realizar la optimización del método en el siguiente experimento.

Los porcentajes de recuperación de las diferentes micotoxinas se muestran en la *Figura 3*, donde se emplearon los procedimientos recomendados por Phenomenex, (2023) y Vaclavikova et al. (2013). El método de Vaclavikova et al. (2013), que emplea MgSO₄ monohidratado y agitación manual, destacó al presentar el mayor porcentaje de extracción y recuperación de las micotoxinas.

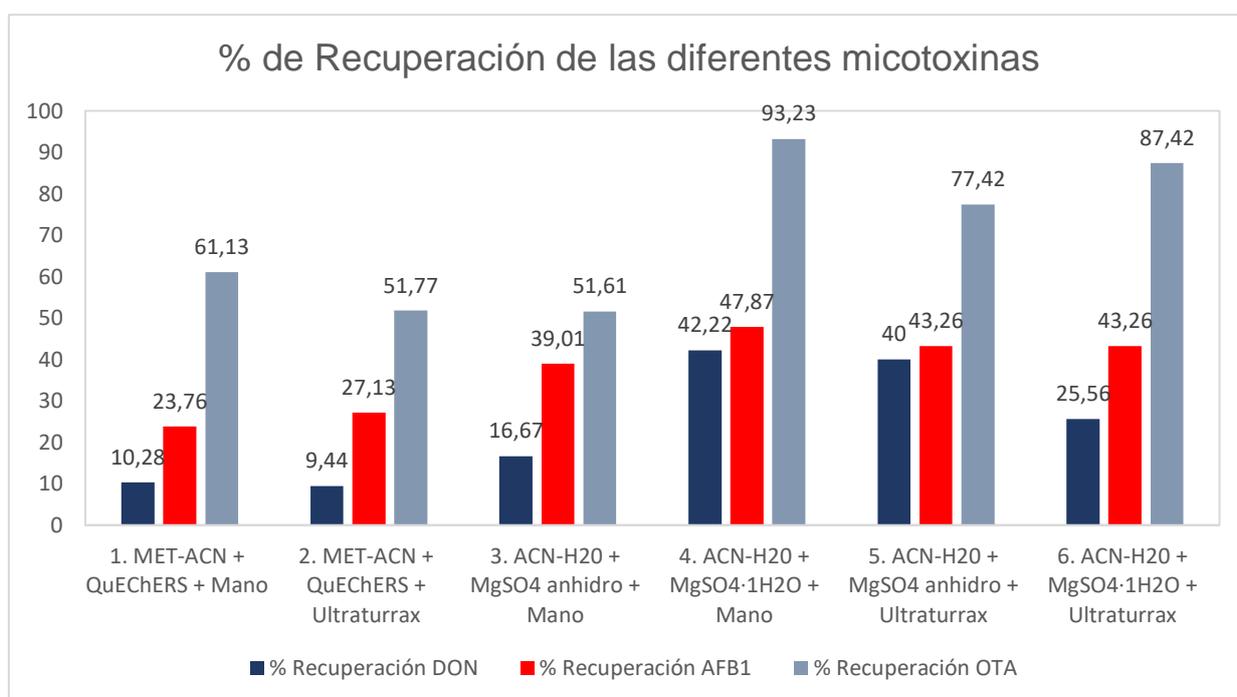


Figura 3 Optimización de los parámetros de los disolventes. Porcentaje de recuperación de las diferentes micotoxinas.

En las extracciones en las que se emplearon los QuEChERS como método de limpieza, los mejores resultados de recuperación obtenidos fueron 10,28% de DON, 27,13% de AFB1, y 61,13% de OTA. Estos resultados fueron inferiores a los encontrados por Paíga et al. (2012), quienes obtuvieron un porcentaje de recuperación de $96,4 \pm 2,0\%$ para OTA cuando usaron QuEChERS en el procedimiento de limpieza. Esta diferencia, puede deberse al tipo de pan estudiado y a los disolventes de extracción, ya que los mencionados autores, emplearon solamente acetonitrilo, y la matriz estudiada fue arroz. Como se mencionó anteriormente, en este estudio se optó por los disolventes ACN-H₂O, ya que estudiamos diferentes micotoxinas con diferente polaridad y, además, en el estudio preliminar se observó que con la mezcla usada de ACN-H₂O, OTA no se recuperaba con QuEChERS.

Respecto a la recuperación de aflatoxinas, diversos autores (Romero-Sánchez et al., 2022; Spanjer et al., 2008) obtuvieron una recuperación de 76 y 92% respectivamente. Las diferencias observadas pueden ser debidas a que los primeros autores utilizan columnas de inmovilización de afinidad (IAC), que permiten una limpieza más exhaustiva de los extractos y matrices de alimentos distintas al pan. Otro aspecto que puede afectar a la recuperación de esta micotoxina es el ratio solvente-muestra utilizado en la extracción, ya que diferentes proporciones de solventes pueden influir significativamente en la eficiencia de recuperación de aflatoxinas.

El bajo rendimiento en la recuperación de micotoxinas utilizando un método de limpieza específico, como QuEChERS, puede explicarse por cuatro factores principales: a) parte de las micotoxinas pueden quedar retenidas a las aminas primarias y cuaternarias que contienen los QuEChERS usando la mezcla ACN-agua, b) la baja concentración de micotoxinas en el pan, c) la diversidad de sus estructuras químicas complica la extracción eficiente al depender de un sola mezcla de disolvente y c) el efecto matriz. Por lo tanto, es crucial seleccionar el método de extracción adecuado, considerando las micotoxinas específicas y las matrices alimentarias a analizar, con el fin de mejorar los resultados y la precisión en el análisis.

3.2 Validación del método

La validación del método consistió en estudios de linealidad, recuperación, repetibilidad, y reproducibilidad para cada micotoxina.

Para la estimación de la linealidad, se realizaron las curvas de calibración estándar trazando la intensidad de la señal frente a la concentración de micotoxina. Todas las micotoxinas mostraron una buena linealidad, los coeficientes de determinación (R^2) resultantes fueron siempre superiores a 0,9990. Se evaluó utilizando calibraciones por duplicado a concentraciones entre 0,025 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Tabla 3, Anexo 6*). Los límites de detección (LOD), y los límites de cuantificación (LOQ) se determinaron como la concentración más baja de los compuestos seleccionados que producen un pico cromatográfico a una relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10 para LOD y LOQ, respectivamente como en el estudio de Saladino et al. 2017.

También se realizaron pruebas de enriquecimiento de la muestra para comprobar el efecto matriz y verificar el leve desplazamiento de los tiempos de retención de las micotoxinas ($\pm 0,05$ minutos), concretamente para OTA.

Tabla 3 Ecuaciones de regresión obtenidas con la solución patrón, LOD, y LOQ de las cuatro micotoxinas estudiadas: DON, AFB1, AFB2 y OTA.

Micotoxina	Ecuación de la recta ^a	R ²	LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
DON	$y = 13960x + 2018,3$	0,9990	0,5	5
OTA	$y = 406095x + 29126$	0,9993	0,018	0,055
AFB1	$y = 197753x + 9640,7$	0,9996	0,038	0,115
AFB2	$y = 321252x + 13443$	0,9994	0,025	0,075

^a Líneas de regresión no ponderadas; y = área pico, x = cantidad de analito

3.2 Determinación de micotoxinas en barras de pan

Se determinó la presencia de las micotoxinas mencionadas en 80 barras de pan. Las micotoxinas detectadas fueron DON y OTA. AFB2 se encontró por debajo del límite de detección de las muestras de pan analizadas (<0,025 µg/kg), y su segunda transición era muy leve. Esta segunda transición aumentaba a medida que se incrementaba la concentración en los patrones, lo que sugiere una presencia potencial de la micotoxina. Sin embargo, debido a que la cantidad de AFB2 fue baja o prácticamente inexistente en las muestras estudiadas, se recomienda realizar una comprobación adicional mediante el aumento de la cantidad de muestra extraída en futuros análisis para obtener resultados más precisos. Esto mejorará la sensibilidad del método de detección, permitiendo una identificación más certera de la presencia o ausencia de AFB2 en el pan analizado. Es importante señalar que este estudio se enfoca en la evaluación del contenido de micotoxinas que podrían representar un riesgo para la salud de los consumidores, por lo tanto, alcanzar un alto grado de precisión no es el objetivo principal de esta investigación. AFB1 no estuvo presente ya que no se pudo visualizar su segunda transición durante el análisis.

Tabla 4 Valores medios \pm DS de la cuantificación de OTA y DON según tipo de barras de pan y elaboración.

Tipo de barra	n	Media (µg/kg)	
		OTA	DON
Blanca	40	0,08 \pm 0,09 ^b	21,54 \pm 29,16 ^a
Integral	40	0,14 \pm 0,15 ^a	28,14 \pm 23,99 ^a
Tipo de elaboración			
Artisanal	40	0,09 \pm 0,12 ^b	12,75 \pm 17,99 ^b
Industrial	40	0,13 \pm 0,13 ^a	36,92 \pm 28,78 ^a

^{a,b}, columnas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey. n, número de barras

Los resultados obtenidos para DON y OTA se reflejan en la *Tabla 4*. Respecto a DON, los panes artesanales presentaron menores niveles que los industriales, sin diferencias entre el tipo de barra. Por su parte, el contenido de OTA fue mayor en los panes integrales y en los de elaboración industrial.

También existe una correlación positiva o negativa entre las concentraciones de OTA y DON, lo que significa que a medida que aumenta la presencia de OTA, es más probable que aumente la de DON, y viceversa. Esto quiere decir que los factores en el proceso de panificación que favorecen la presencia de OTA también parecen hacerlo con DON. Esta información es relevante para comprender la influencia de los factores que facilitan el crecimiento de los mohos productores de micotoxinas, así como su interacción en el pan.

La variación en la presencia de micotoxinas entre los panes blancos e integrales, así como entre los panes de elaboración artesanal e industrial, podría atribuirse a diferentes factores. Pan blanco vs. integral: El pan integral se elabora con granos de trigo enteros que conservan la cascarilla y el germen, donde los mohos pueden adherirse y producir micotoxinas. Por lo tanto, es posible que los granos enteros en el pan integral contribuyan a una mayor concentración de micotoxinas en comparación con el pan blanco. En el proceso de refinamiento del trigo blanco, estas partes con mayor potencial de contaminación suelen eliminarse, reduciendo la posibilidad de micotoxinas en el pan resultante. Pan artesanal vs. industrial: En la producción industrial, se recurre a la importación de trigo debido a la necesidad de utilizar harina de trigo con una mayor fuerza que la que se encuentra disponible en el mercado español. A diferencia de España, en otros países, las condiciones de humedad durante la cosecha y un inadecuado almacenamiento y transporte pueden propiciar el crecimiento de mohos, lo que resultaría en un aumento en la presencia de micotoxinas. Además, en la elaboración de panes precocidos es común reintroducir masas o panes defectuosos provenientes de lotes anteriores, ya que en estos casos no se ha desarrollado la corteza, lo que podría afectar al color del producto final. No obstante, las condiciones de almacenamiento de estos productos, dada su alta humedad, pueden propiciar el crecimiento de mohos y aumentar el contenido de micotoxinas, que luego se sumarían al pan final.

En la *Tabla 5* se presentan los resultados de la contaminación por DON en las muestras de pan analizadas. Esta micotoxina se detectó en 52 de las 80 barras de pan estudiadas (65%), con un rango de 5,87 a 99,5 µg/kg en las muestras positivas. Todos los panes contaminados con DON presentaron valores inferiores al límite máximo (500 µg/kg) establecido por la legislación europea para esta micotoxina en el pan. La frecuencia de contaminación en las barras de pan con DON fue del 40, 70, 50 y 100% en el pan blanco artesanal, blanco industrial, integral artesanal e integral industrial respectivamente. En el caso de los panes blancos artesanales e integrales artesanales, no se observaron diferencias significativas en la concentración de esta micotoxina, y ambas variantes presentaron la concentración más baja en comparación con el pan blanco industrial y el

pan integral industrial. Estos dos últimos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, siendo los panes que presentaron la mayor concentración de DON. En el caso del pan integral industrial, DON estuvo presente en todas las muestras.

Tabla 5 Medias y desviaciones estándar para DON en las muestras analizadas.

Muestras	n	Deoxinivalenol ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		Muestras positivas y frecuencia (%)	Media	Nivel max.	Nivel min.
Blanco Artesanal	20	8 (40%)	12,02 \pm 19,58 ^b	73,84	<LOD
Blanco Industrial	20	14 (70%)	31,05 \pm 33,96 ^a	99,52	<LOD
Integral Artesanal	20	10 (50%)	13,49 \pm 16,45 ^b	50,29	<LOD
Integral Industrial	20	20 (100%)	42,80 \pm 21,32 ^a	91,19	5,87

^{a,b}, columnas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.
n, número de barras

Examinar y contrastar los resultados de distintos estudios nos brinda la oportunidad de descubrir patrones y tendencias que caracterizan la presencia de micotoxinas en panes de origen español. González-Osnaya et al. (2011), reportaron la presencia de DON en menos muestras que en nuestra investigación, concretamente en el 28,0%. Estudiaron varios tipos de pan provenientes de Valencia (España), donde los niveles de DON variaron en un rango $<7,3$ (LOD) hasta $146,6 \mu\text{g}/\text{kg}$, ligeramente superior a nuestros resultados. A diferencia de nuestro estudio, los autores no distinguieron entre panes de origen artesanal e industrial, pero si analizaron diferentes tipos de pan integral y pan blanco. En su investigación, se identificó la presencia de DON en 6 de las 19 muestras de pan integral evaluadas (31,56%), y en 15 de las 56 muestras de pan blanco evaluadas (26,8%). Aunque es importante notar que en este estudio la proporción de muestras de pan blanco y pan integral no es equitativa, se observa una tendencia hacia una mayor incidencia de DON en el pan integral, lo cual también concuerda con nuestros hallazgos. Cano-Sancho et al. (2011) reportaron la presencia de DON en todas las muestras de pan analizadas provenientes de Cataluña (España), con un valor medio de $246 \pm 158 \mu\text{g}/\text{kg}$, dato superior a nuestros resultados. En el estudio de Saladino et al. (2017), no se encontró DON en ninguna de las muestras. Podría deberse a problemas en el procedimiento de extracción, como nos ocurrió a nosotros al emplear su método en los ensayos preliminares, dónde no identificamos DON. A diferencia de nuestra investigación, si lograron detectar AFB2 y AFB1. Esto podría deberse, a la influencia de los factores ambientales y climáticos de Valencia, dónde se realizó el estudio. El 5% de sus muestras contaminadas con AFB1 excedieron el límite máximo ($2,0 \mu\text{g}/\text{kg}$) establecido por la legislación europea para esta micotoxina en el pan, en el caso de AFB2, el 7,5% de las muestras superaron una suma de AFs que excedía el límite permitido ($4,0 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Fuera de España, las investigaciones realizadas también son escasas. Jiang et al. (2018) informaron de la presencia de DON en el 94,1% de panes de trigo de origen chino, con un rango de 11-148 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras positivas, ligeramente superior a nuestros resultados. Hay que tener en cuenta, que estos panes suelen cocerse al vapor, por lo que no se origina corteza, y el contenido de humedad es mayor, lo que favorece el desarrollo de moho. Schollenberger et al. (2005) detectaron DON en el 92% de las muestras de pan de origen alemán, con un rango de 15-690 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras positivas. Los únicos panes que superaron al límite máximo (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) establecido por la legislación europea fueron los denominados “Pan de mezcla de harinas de trigo”. En este caso destacar el uso común de harina de centeno en estos panes, asociado a granos húmedos y riesgo microbiano en el cultivo de centeno en el norte de Europa, junto con una mayor presencia de partes externas del grano en las harinas. Sirot et al. (2013) encontraron un nivel medio de DON de 132,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en pan y productos a base de pan seco en Francia. Este estudio vincula a DON y OTA como las micotoxinas más predominantes en el pan, mientras que no se detectó la presencia de AFB1 en las muestras analizadas, como en nuestro caso. Al comparar con otros estudios, podemos concluir que el nivel de DON en nuestros panes es bajo. Esto refleja positivamente la calidad de la panadería de Castilla y León, y cómo ha evolucionado a lo largo de los años de manera favorable.

En la *Tabla 6* se presentan los resultados de la contaminación por OTA en las muestras de pan estudiadas. Esta micotoxina se detectó en 49 de las 80 barras de pan analizadas (61,25%), con un rango de 0,05-0,64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras positivas. Todas las muestras contaminadas con OTA presentaron valores muy inferiores al límite máximo (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) establecido por la legislación europea para esta micotoxina en el pan. La frecuencia de contaminación en las barras de pan con OTA fue superior al 50% en todos los tipos de pan analizados. El pan integral industrial presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con los otros grupos, presentando la concentración más alta de OTA.

Tabla 6 Medias y desviaciones estándar para OTA en las muestras analizadas.

Muestras	n	Ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		Muestras positivas y frecuencia (%)	Media	Nivel max.	Nivel min.
Blanco Artesanal	20	11 (55%)	0,093 \pm 0,10 ^b	0,370	<LOD
Blanco Industrial	20	11 (55%)	0,073 \pm 0,07 ^b	0,198	<LOD
Integral Artesanal	20	11 (55%)	0,083 \pm 0,13 ^b	0,769	<LOD
Integral Industrial	20	16 (80%)	0,187 \pm 0,15 ^a	0,641	<LOD

^{a,b}, columnas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey.
n, número de barras

González-Osnaya et al. (2007) estudiaron múltiples tipos y derivados del pan de origen español, registrando una incidencia del 20,3%, menor que en nuestro estudio, pero con mayores valores y dispersión entre muestras, 0,04-19,61 µg/kg. Estos valores excedieron los límites legales debido principalmente a la inclusión de pan de molde, pan con mayor humedad y fecha de caducidad; y pan rallado, mezcla de diferentes panes que presenta una mayor superficie de contacto, facilitando una mayor exposición al aire y humedad ambiental. Estas características favorecen la aparición de mohos. Si es cierto, que el subgrupo “pan precocido”, con solo 4 muestras, presentó una incidencia del 75% de OTA, y por tanto mayor que otros subgrupos, lo que coincide con nuestros resultados, aunque presentaron mayor rango (2,51-3,75 µg/kg). Al igual que con DON, Saladino et al. (2017) no identificaron OTA en sus muestras de pan, debido posiblemente a problemas en la extracción. Burdaspal Pérez & Legarda (2001) llevaron a cabo un análisis de muestras de pan comercializado en España, así como muestras procedentes de otros doce países, con un total de 255 muestras y una incidencia de OTA del 100%, superior a nuestros resultados. Los niveles medios de OTA fueron de 0,276 (España), 0,222 (Francia), 0,355 (Holanda), 0,142 (Bélgica), 0,271 (Italia), 0,225 (Alemania), 0,446 (Irlanda), 0,081 (Austria), 0,047 (Suiza), 0,022 (Hungría), 0,347 (EE. UU.), 0,259 (Túnez) y 0,040 (Brasil) µg/kg en muestras de pan de trigo, datos similares a los de nuestro estudio generalmente. Blesa et al. (2004) identificaron OTA en niveles inferiores al LOD (0,25 µg/kg) en cuatro muestras de pan de origen español, Sirot et al. (2013) en un nivel medio de 0,13 µg/kg en pan y productos a base de pan seco francés, y Juan et al. (2008) en un nivel medio de 0.02 ± 0.07 µg/kg en pan de trigo portugués en el 12% de sus muestras, presentando niveles de micotoxina similares a nuestra investigación.

La *Tabla 7* resume las diferencias entre las barras de los diferentes establecimientos. Aunque no disponemos de información sobre como elaboran el pan cada una de ellas para poder estudiarlo en profundidad, se sigue observando una clara tendencia tanto en OTA como en DON, de su predominancia en las barras de origen industrial e integrales.

Al comparar estos hallazgos con el resto de las investigaciones mencionadas anteriormente, donde en casos puntuales se superan los límites establecidos por la legislación, revelan la importancia de un monitoreo constante de los niveles de DON y OTA en productos alimenticios, como el pan. Esta vigilancia continua se vuelve crucial para asegurar la conformidad con los estándares regulativos y salvaguardar la seguridad alimentaria. Además, es fundamental considerar el contexto agrícola y las prácticas de manufactura, ya que estos factores pueden influir en la presencia de micotoxinas, como se ha visto en nuestro estudio al comparar los panes de origen artesanal e industrial, o

en el origen del trigo en el estudio de González-Osnaya et al. (2007). En esta investigación se compararon panes elaborados a partir de trigo ecológico con los elaborados con trigo convencional, y se vio que existe una incidencia ligeramente superior de OTA en el pan de producción ecológica. Asimismo, es fundamental que productores y consumidores sean conscientes de estos temas. Mayor conciencia sobre los riesgos de las micotoxinas en los alimentos y la adopción de buenas prácticas en la agricultura y producción pueden reducir la exposición a estas sustancias, asegurando la seguridad de los alimentos.

Tabla 7 Valores medios de OTA y DON para cada uno de los establecimientos estudiados.

Establecimientos	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	Blanco	Integral	Blanco	Integral
I1	<LOD	0,250 \pm 0,06 ^{ABC}	16,55 \pm 11,93 ^{CD}	88,77 \pm 3,08 ^A
I2	0,088 \pm 0,10 ^{BC}	0,142 \pm 0,01 ^{BCD}	8,56 \pm 1,33 ^{CD}	54,46 \pm 1,83 ^{BC}
I3	0,114 \pm 0,01 ^B	0,158 \pm 0,01 ^{BCD}	23,02 \pm 8,07 ^C	33,69 \pm 1,50 ^{DEF}
I4	0,162 \pm 0,04 ^B	0,249 \pm 0,09 ^{ABC}	<LOD	56,63 \pm 11,42 ^B
I5	0,118 \pm 0,01 ^B	0,310 \pm 0,01 ^{AB}	90,14 \pm 6,95 ^A	50,07 \pm 3,52 ^{BCD}
I6	<LOD	<LOD	<LOD	35,10 \pm 6,46 ^{CDEF}
I7	0,129 \pm 0,04 ^B	0,469 \pm 0,19 ^A	71,66 \pm 15,31 ^{AB}	34,70 \pm 6,18 ^{CDEF}
I8	<LOD	<LOD	<LOD	12,07 \pm 8,02 ^{GHI}
I9	0,122 \pm 0,01 ^B	0,195 \pm 0,11 ^{BCD}	25,63 \pm 0,98 ^C	40,85 \pm 11,39 ^{BCDE}
I10	<LOD	0,105 \pm 0,01 ^{BCD}	74,93 \pm 11,73 ^{AB}	21,55 \pm 3,21 ^{EFGH}
A2	0,331 \pm 0,05 ^A	0,285 \pm 0,32 ^{ABC}	61,31 \pm 10,05 ^B	6,25 \pm 7,23 ^{HI}
A3	0,080 \pm 0,09 ^{BC}	<LOD	13,10 \pm 15,18 ^{CD}	41,05 \pm 1,17 ^{BCDE}
A4	<LOD	0,132 \pm 0,07 ^{BCD}	14,61 \pm 5,29 ^{CD}	15,54 \pm 17,98 ^{Fghi}
A5	<LOD	0,132 \pm 0,04 ^{BCD}	<LOD	26,73 \pm 2,74 ^{EFg}
A6	0,079 \pm 0,03 ^{BC}	<LOD	14,63 \pm 1,27 ^{CD}	34,16 \pm 16,42 ^{DEF}
A7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
A8	<LOD	0,062 \pm 0,07 ^{CD}	<LOD	<LOD
A9	0,163 \pm 0,01 ^B	<LOD	<LOD	5,21 \pm 6,01 ^{HI}
A10	0,141 \pm 0,03 ^B	0,086 \pm 0,03 ^{BCD}	<LOD	5,93 \pm 6,85 ^{HI}
A11	0,140 \pm 0,01 ^B	0,136 \pm 0,02 ^{BCD}	16,57 \pm 19,37 ^{CD}	<LOD

* I, muestras procedentes de elaboración industrial; A, muestras procedentes de obradores artesanales.

^{A,B}: columnas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre establecimientos; mediante el test de Tukey.

<LOD, menor que el límite de detección.

4. CONCLUSIONES

Los panes adquiridos en Castilla y León dieron positivo en DON y OTA con una frecuencia del 65 y 61,25% respectivamente. Se observó que el pan integral industrial mostró las concentraciones más altas de DON y OTA en comparación con otros tipos de pan. Sin embargo, es importante destacar que todas las muestras cumplieron adecuadamente con los límites legales establecidos para las micotoxinas en el pan. Además, se encontraron diferencias significativas en las concentraciones entre panes artesanales y elaborados a partir de precocidos (o industriales), al igual que entre las distintas panaderías evaluadas, sugiriendo la influencia de prácticas de producción y almacenamiento en la contaminación del pan.

Es importante destacar que, al cumplir con la legislación vigente, los panes pueden reutilizarse de forma responsable para crear subproductos como pan rallado. Esto no solo disminuiría el desperdicio de alimentos, sino que también optimizaría los recursos y fomentaría la sostenibilidad en la industria alimentaria. A pesar de esto, es necesario continuar investigando la presencia de estos compuestos en toda la cadena alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Aesan—Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2022). https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm
- AFHSE. (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/textomicotoxinas18122015_completorev_nipo_tcm30-57870.pdf
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. *Foods*, 9(4), 518. <https://doi.org/10.3390/foods9040518>
- Aron Maftei, N., Ramos-Villarroel, A. Y., Nicolau, A. I., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2014). Pulsed light inactivation of naturally occurring moulds on wheat grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 721-726. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6324>
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Nwozo, S., Odongo, G. A., Eseoghene, I. J., Twinomuhwezi, H., Ogbonna, C. U., Upadhyay, A. K., Adeleye, A. O., & Okpala, C. O. R. (2022). Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review. *Toxins*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/toxins14030167>
- Bi, S., Xu, J., Yang, X., Zhang, P., Lian, K., & Ma, L. (2022). An HPLC-MS/MS Method Using a Multitoxin Clean up Column for Analysis of Seven Mycotoxins in Aquafeeds. *Journal of AOAC International*, 105(1), 107-114. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab101>
- Blesa, J., Berrada, H., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2004). Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1046(1), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.086>

- Burdaspal Pérez, P. Á., & Legarda, T. M. (2001). Presencia de ocratoxina A en muestras de pan comercializado en España y en muestras procedentes de doce países extranjeros. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 32(1), 89-96.
- Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., Burdaspal, P., Legarda, T. M., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2011). Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control*, 22(3), 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.033>
- Cao, W., Yu, P., Yang, K., & Cao, D. (2022). Aflatoxin B1: Metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 32(6), 395-419. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.2021339>
- Facorro, R., Llompart, M., & Dagnac, T. (2020). Combined (d)SPE-QuEChERS Extraction of Mycotoxins in Mixed Feed Rations and Analysis by High Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxins*, 12(3), 206. <https://doi.org/10.3390/toxins12030206>
- Freeman, K., Connock, M., Cummins, E., Gurung, T., Taylor-Phillips, S., Court, R., Saunders, M., Clarke, A., & Sutcliffe, P. (2015). Fluorouracil plasma monitoring: Systematic review and economic evaluation of the My5-FU assay for guiding dose adjustment in patients receiving fluorouracil chemotherapy by continuous infusion. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 19(91), 1-321, v-vi. <https://doi.org/10.3310/hta19910>
- GajduSek, D. C. (1953). Acute infectious hemorrhagic fevers and mycotoxicoses in the Union of Soviet Socialist Republics. Medical Science Publication No. 2.
- Gimeno, A. (2002). Los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal; Conceptos, Problemas, Control y Recomendaciones. 1-49.
- Gimeno, A., & Ligia Martins, M. (2003). Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans. *Special Nutrients, INC.* <https://www.specialnutrients.com/pdf/book/Mycotoxins%20and%20mycotoxicosis%20in%20humans%20and%20animals%20Book%20Gimeno%20security.pdf>
- Goldblatt, L. A. (1972). Implications of Mycotoxins. *Clinical Toxicology*, 5(4), 453-464. <https://doi.org/10.3109/15563657208991026>
- González-Osnaya, L., Cortés, C., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2011). Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. *Food Chemistry*, 124(1), 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.002>

- González-Osnaya, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. *International Journal of Food Microbiology*, 118(1), 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.011>
- Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment. (1989). American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- Informe de Consumo Alimentario en España. (2021). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-alimentario-2021-baja-res_tcm30-624017.pdf
- Jiang, D., Chen, J., Li, F., Li, W., Yu, L., Zheng, F., & Wang, X. (2018). Deoxynivalenol and its acetyl derivatives in bread and biscuits in Shandong province of China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(1), 43-48. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1402824>
- Juan, C., Pena, A., Lino, C., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2008). Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.018>
- Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A.-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., ... Edler, L. (2017). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal*, 15(9), e04718. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
- Kovač, M., Bulaić, M., Nevistić, A., Rot, T., Babić, J., Panjičko, M., Kovač, T., & Šarkanji, B. (2022). Regulated Mycotoxin Occurrence and Co-Occurrence in Croatian Cereals. *Toxins*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/toxins14020112>
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(2), 152-163. <https://doi.org/10.1080/02652030701765723>
- Li, L., Zhang, T., Ren, X., Li, B., & Wang, S. (2021). Male reproductive toxicity of zearalenone-meta-analysis with mechanism review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 221, 112457. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112457>
- McMillan, A., Renaud, J. B., Burgess, K. M. N., Orimadegun, A. E., Akinyinka, O. O., Allen, S. J., Miller, J. D., Reid, G., & Sumarah, M. W. (2018). Aflatoxin exposure in Nigerian children with severe acute malnutrition. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.030>

- Moss, M. O., & Long, M. T. (2002). Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants*, 19(4), 387-399. <https://doi.org/10.1080/02652030110091163>
- 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>
- Mousavi Khaneghah, A., Hashemi Moosavi, M., Oliveira, C. A. F., Vanin, F., & Sant'Ana, A. S. (2020). Electron beam irradiation to reduce the mycotoxin and microbial contaminations of cereal-based products: An overview. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 143, 111557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111557>
- Musarurwa, H., Chimuka, L., Pakade, V. E., & Tavengwa, N. T. (2019). Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84, 103314. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103314>
- National Center for Biotechnology Information. (2023a). PubChem Compound Summary for CID 4696, Patulin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4696>
- National Center for Biotechnology Information. (2023b). PubChem Compound Summary for CID 40024, Deoxynivalenol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40024>
- National Center for Biotechnology Information. (2023c). PubChem Compound Summary for CID 186907, Aflatoxin B1. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907>
- National Center for Biotechnology Information. (2023d). PubChem Compound Summary for CID 442530, Ochratoxin A. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442530>
- National Center for Biotechnology Information. (2023e). PubChem Compound Summary for CID 2733487, fumonisin B(1). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2733487>
- National Center for Biotechnology Information. (2023f). PubChem Compound Summary for CID5281576, Zearalenone. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281576>
- Oliveira, M., & Vasconcelos, V. (2020). Occurrence of Mycotoxins in Fish Feed and Its Effects: A Review. *Toxins*, 12(3), 160. <https://doi.org/10.3390/toxins12030160>
- Osnaya, L. G., Castillo, J. M. S. del, Cortés, J. C. M., & Vinuesa, J. M. (2006). Extraction and analysis of ochratoxin A in bread using pressurised liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1113(1), 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.130>
- Paíga, P., Morais, S., Oliva-Teles, T., Correia, M., Delerue-Matos, C., Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2012). Extraction of ochratoxin A in bread samples by the

- QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 135(4), 2522-2528. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.045>
- Phenomenex. (2023). An Improved Solution for Multi-Residue Analysis from Food. <https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/roQ%20QuEChERS/>
- Recomendación 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. (2006). En OJ L (Vol. 234). <http://data.europa.eu/eli/reco/2006/583/oj/spa>
- Reglamento (CE) No 1881/2006, 364 OJ L (2006). <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj/spa>
- Rocha, M. E. B., Freire, F. da C. O., Erlan Feitosa Maia, F., Izabel Florindo Guedes, M., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Romero Donato, C. J., Cendoya, E., Demonte, L. D., Repetti, M. R., Chulze, S. N., & Ramirez, M. L. (2022). Influence of abiotic factors (water activity and temperature) on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in a chickpea-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109841. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109841>
- Romero-Sánchez, I., Ramírez-García, L., Gracia-Lor, E., & Madrid-Albarrán, Y. (2022). Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 395, 133611. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133611>
- 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*, 75, 697-701. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.029>
- Sandhu, H. P. S., Manthey, F. A., Simsek, S., & Ohm, J.-B. (2011). Comparison Between Potassium Bromate and Ozone as Flour Oxidants in Breadmaking. *Cereal Chemistry*, 88(1), 103-108. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-10-0085>
- Schollenberger, M., Drochner, W., Rühle, M., Suchy, S., Terry-Jara, H., & Müller, H.-M. (2005). Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the German market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.009>
- Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Leblanc, J.-C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Wallace, H., Alexander, J., Dall'Asta, C., Mally, A., ... Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 18(5), e06113. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>

- SCIEX. (2021). Serie de instrumentos 6500, guía de usuario del sistema. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/6500-system-user-guide-es.pdf>
- Serrano, A. B., Font, G., Mañes, J., & Ferrer, E. (2013). Emerging Fusarium mycotoxins in organic and conventional pasta collected in Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.034>
- Sforza, S., Dall'Asta, C., & Marchelli, R. (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(1), 54-76. <https://doi.org/10.1002/mas.20052>
- Sirot, V., Fremy, J.-M., & Leblanc, J.-C. (2013). Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.036>
- Soares Mateus, A. R., Barros, S., Pena, A., & Sanches Silva, A. (2021). Mycotoxins in Pistachios (*Pistacia vera* L.): Methods for Determination, Occurrence, Decontamination. *Toxins*, 13(10), 682. <https://doi.org/10.3390/toxins13100682>
- Spanjer, M. C., Rensen, P. M., & Scholten, J. M. (2008). LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(4), 472-489. <https://doi.org/10.1080/02652030701552964>
- Stroka, J., Petz, M., Joerissen, U., & Anklam, E. (1999). Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B1 in different food and feed matrices. *Food Additives and Contaminants*, 16(8), 331-338. <https://doi.org/10.1080/026520399283902>
- Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry*, 119(1), 408-416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.042>
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168-180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>
- Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2013). 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry*, 136(2), 750-757. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.031>

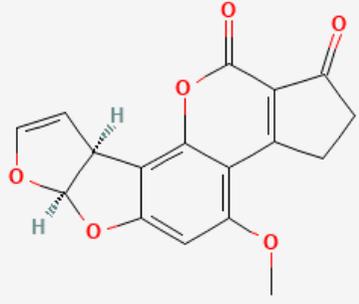
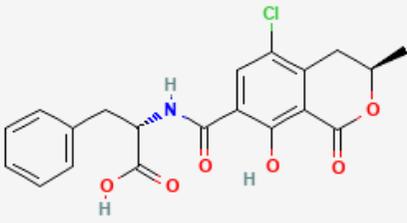
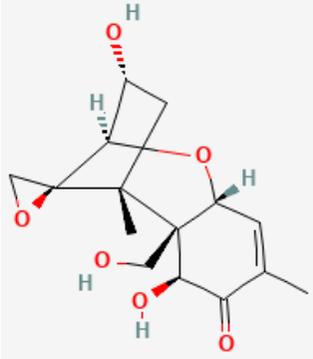
- Vatzia, E., Pierron, A., Hoog, A. M., Saalmüller, A., Mayer, E., & Gerner, W. (2020). Deoxynivalenol Has the Capacity to Increase Transcription Factor Expression and Cytokine Production in Porcine T Cells. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.02009>
- Vidal, A., Morales, H., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2014). Stability of DON and OTA during the breadmaking process and determination of process and performance criteria. *Food Control*, 40, 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.044>
- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. (2000). Fumonisin B1. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42269>
- Wu, Q., Lohrey, L., Cramer, B., Yuan, Z., & Humpf, H.-U. (2011). Impact of Physicochemical Parameters on the Decomposition of Deoxynivalenol during Extrusion Cooking of Wheat Grits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12480-12485. <https://doi.org/10.1021/jf2038604>
- Xu, H., Wang, L., Sun, J., Wang, L., Guo, H., Ye, Y., & Sun, X. (2022). Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(18), 4951-4969. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1879730>
- Xudong, Y. (2022). *Advances in Chemical Proteomics*. Elsevier.
- Yang, W., Huang, L., Wang, P., Wu, Z., Li, F., & Wang, C. (2019). The Effect of Low and High Dose Deoxynivalenol on Intestinal Morphology, Distribution, and Expression of Inflammatory Cytokines of Weaning Rabbits. *Toxins*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/toxins11080473>
- 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>
- Zachariasova, M., Lacina, O., Malachova, A., Kostelanska, M., Poustka, J., Godula, M., & Hajslova, J. (2010). Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 662(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.034>
- Zhu, F. (2018). Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chemistry*, 264, 358-366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.047>
- Zhu, Y., Hassan, Y. I., Lepp, D., Shao, S., & Zhou, T. (2017). Strategies and Methodologies for Developing Microbial Detoxification Systems to Mitigate Mycotoxins. *Toxins*, 9(4), 130. <https://doi.org/10.3390/toxins9040130>

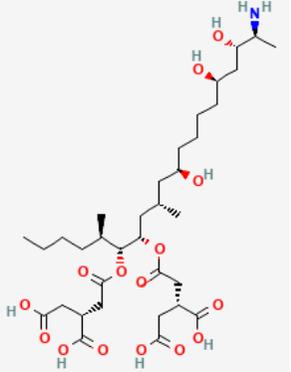
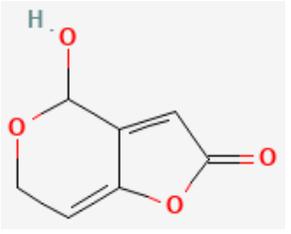
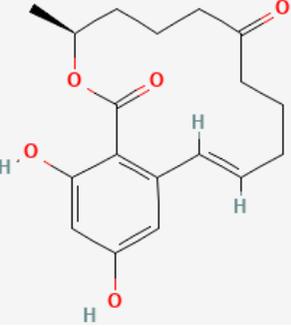
ANEXOS

Anexo 1. Tabla del contenido máximo permitido según el Reglamento (CE) n° 1881/2006 de DON, AF y OTA en productos alimentarios relacionados con el pan (elaboración propia a partir del del Reglamento).

Deoxinivalenol (DON)		
Productos alimentarios	Contenidos máximos (µg/kg) (ppb)	
Cereales destinados al consumo humano directo, <u>harina de cereales</u> , salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen.	750	
<u>Pan</u> (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno.	500	
Aflatoxinas (AF)		
Productos alimentarios	Contenidos máximos (µg/kg) (ppb)	
	B ₁	Suma de B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂
Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos derivados de la transformación de cereales.	2	4
Ocratoxinas (OTA)		
Productos alimenticios	Contenidos máximos (µg/kg) (ppb)	
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	

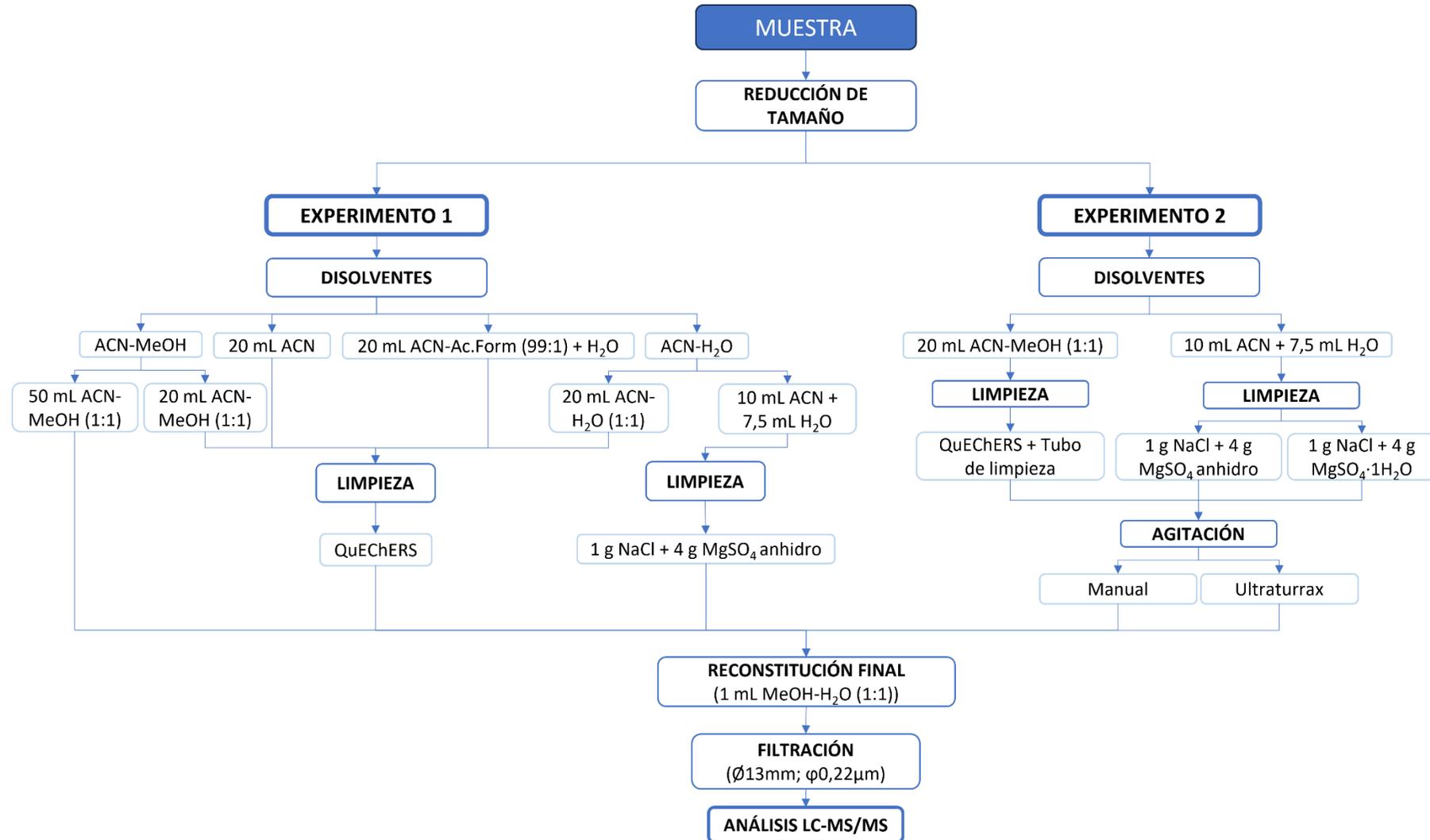
Anexo 2. Principales micotoxinas producidas por hongos junto con sus efectos tóxicos.

Toxinas	Estructura	Hongos que las producen	Alimentos	Efectos tóxicos	Referencia/s
Aflatoxinas (<u>AFB1</u> , <u>AFB2</u> , <u>AFG1</u> , <u>AFG2</u>)		<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. Parasiticus</i> <i>A. nonius</i> <i>Penicillium</i> <i>Streptomyces roseolus</i>	Cereales (maíz, arroz...), semillas oleaginosas, coco...	Carcinogénico, hepatotóxico, teratogénico, inmunosupresión, alteración de la estructura del ADN, hepatitis, hemorragias, lesiones renales, deterioro del crecimiento infantil. Grupo 1 (IARC)*.	(Cao et al., 2022) (McMillan et al., 2018) (National Center for Biotechnology Information, 2023c)
Ocratoxina A		<i>Aspergillus melleus</i> <i>A. ochraceus</i> <i>Penicillium nordicum</i> <i>P. verrucosum</i>	Cereales (maíz, arroz, avena...), frijoles, semillas oleaginosas, higos, cecina de vaca, frutas, vino...	Nefrotóxico, pérdida de apetito, náuseas y vómitos, inmunosupresión, carcinogénica, teratogénica, inmunotóxica, neurotóxica. Grupo 2B (IARC)*.	(Schrenk et al., 2020) (National Center for Biotechnology Information, 2023d)
Tricotecenos (T2, <u>Deoxinivalenol</u> (<u>DON</u>), DAS, HT2)		<i>Fusarium</i> <i>Cephalosporium</i> <i>Trichoderma</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Cereales (maíz, arroz, trigo...), semillas, legumbres, frutas, vegetales...	Vómitos, diarrea, dolor abdominal, cefaleas, mareos, fiebre, rectorragia, estrés oxidativo, inmunosupresión, citotoxicidad, necrosis dérmica, anemia, granulocitopenia, lesiones epiteliales orales, aleucia tóxica alimentaria (ATA), hipotensión, coagulopatías. Grupo 3 (IARC)*.	(National Center for Biotechnology Information, 2023b) (Knutsen et al., 2017) (Vatzia et al., 2020) (W. Yang et al., 2019)

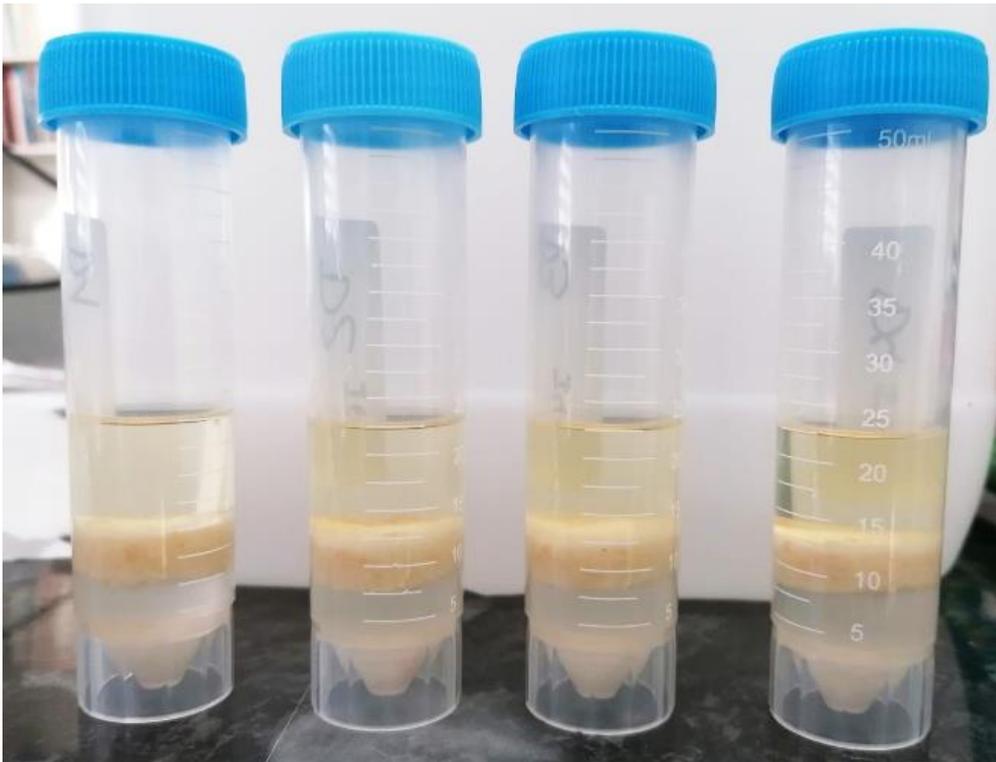
<p>Fumonisina</p>		<p><i>Fusarium moniliforme</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. culmorum</i></p>	<p>Cereales (maíz, arroz...).</p>	<p>Cáncer de esófago, encefalomalacia, edema pulmonar, carcinogénico, neurotóxico, hepatotóxico, fallo cardiaco. Grupo 2B (IARC)*.</p>	<p>(World Health Organization & International Programme on Chemical Safety, 2000) (National Center for Biotechnology Information, 2023e)</p>
<p>Patulina</p>		<p><i>Aspergillus terreus</i> <i>A. clavatus</i> <i>Penicillium carneum</i> <i>P. clavigerum</i> <i>P. griseofulvum</i></p>	<p>Cereales (trigo...), manzanas, uvas, melocotones, peras, albaricoques, olivas...</p>	<p>Hemorragia cerebral, trastornos neuronales (neurotóxico), lesiones tóxicas, cáncer de piel, mutagenicidad, náuseas, vómitos. Grupo 3 (IARC)*.</p>	<p>(National Center for Biotechnology Information, 2023a)</p>
<p>Zearalenona</p>		<p><i>Fusarium</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i></p>	<p>Cereales (maíz, trigo, sorgo, arroz...).</p>	<p>Carcinogénico, desequilibrio hormonal efecto estrogénico, problemas reproductivos, teratogénico, estrés oxidativo. Grupo 3 (IARC)*.</p>	<p>(National Center for Biotechnology Information, 2023f) (Li et al., 2021)</p>

*Según la clasificación del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC): Grupo 1, cancerígeno para los seres humanos; Grupo 2A, probablemente cancerígeno para los seres humanos; Grupo 2B, posiblemente cancerígeno para los seres humanos; Grupo 3, no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para los seres humanos.

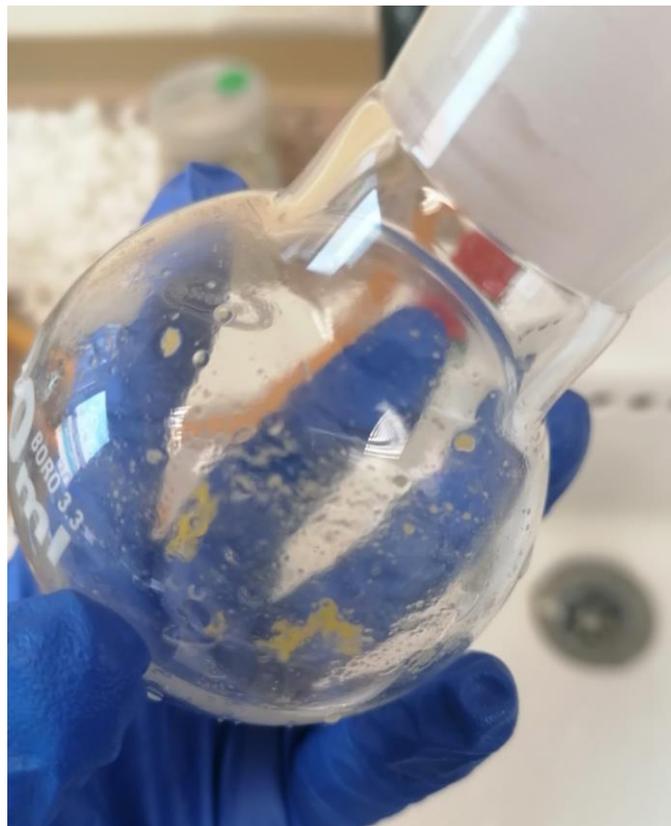
Anexo 3. Principales etapas de preparación de la muestra usando diferentes disolventes, tipos de limpieza y agitación.



Anexo 4. Muestras tras la centrifugación.



Anexo 5. Muestra adherida al matraz.



Anexo 6. Cromatogramas de los patrones a diferentes concentraciones.

