



Universidad de Valladolid

Micotoxinas en salvados de cereales

Autora: María Llorente Garrán

Tutoras: Laura Román Rivas, Irma Caro Canales

Trabajo de Fin de Máster

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera, Palencia

Curso 2023/24



**Escuela Técnica Superior
de Ingenierías Agrarias Palencia**

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Definición de micotoxina	1
1.2.	Factores que afectan a la presencia de hongos en los alimentos	2
1.3.	Tipos de micotoxinas	3
1.4.	Marco legal	4
1.5.	Análisis de micotoxinas en cereales	5
1.6.	Proceso de molienda	6
2.	OBJETIVOS	7
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1.	Muestras.....	8
3.2.	Determinación de micotoxinas	9
	Proceso de extracción de micotoxinas	9
	Análisis de micotoxinas por LC-MS/MS.....	10
3.3.	Efecto matriz.....	11
3.4.	Análisis microbiológico	11
	Preparación de las muestras	11
	Siembra de muestras	12
3.5.	Análisis fisicoquímico.....	12
	Medición de pH	12
	Actividad de agua	12
	Humedad	12
3.6.	Análisis estadístico	13
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1.	Análisis microbiológico y fisicoquímico.....	13
4.2.	Análisis de micotoxinas	21
4.3.	Porcentaje recuperación.....	26
5.	CONCLUSIONES	26
6.	BIBLIOGRAFÍA	26
	ANEXOS	32
	Anexo I.....	32
	Anexo II.....	34
	Anexo III.....	39

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por distintas especies de hongos, que pueden estar presentes en muchos alimentos y presentar un riesgo para la salud, tanto humana como animal. Por esta razón, hay gran cantidad de estudios centrados en su detección y cuantificación. En este estudio se detectaron y cuantificaron las toxinas AFB1, AFB2, OTA, ZEN mediante HPLC-MS/MS en muestras de distintas fracciones procedentes de la molienda de cereales: trigo centeno y cebada. También se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica: pH, actividad de agua y humedad; y microbiológica: flora aerobia mesófila, mohos y levaduras de las muestras, con el objetivo de relacionar los valores de estos parámetros con la presencia de micotoxinas. Los resultados mostraron que las muestras que más contaminación microbiológica y cantidad de micotoxinas presentaban eran las fracciones extraídas de las capas externas del cereal, siendo el trigo el cereal que más micotoxinas contenía.

PALABRAS CLAVE: micotoxinas, salvados de cereales, mohos, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by different species of fungi, which may be present in many foods and present a health risk to both human and animal health. For this reason, there are a large number of studies focused on their detection and quantification. In this study, AFB1, AFB2, OTA, ZEN toxins were detected and quantified by HPLC-MS/MS in samples of different cereal milling fractions: wheat, rye and barley. A physicochemical characterization was also carried out: pH, water activity and humidity; and microbiological characterization: mesophilic aerobic flora, molds and yeasts of the samples, in order to relate the values of these parameters to the presence of mycotoxins. The results showed that the samples with the highest microbiological contamination and quantity of mycotoxins were the fractions extracted from the outer layers of the cereal, with wheat containing the most mycotoxins.

KEY WORDS: mycotoxins, cereal bran, molds, LC-MS/MS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de micotoxina

La palabra micotoxina proviene de los términos griegos “mikes” y “toxina”, que significan hongo y veneno respectivamente (García Olivares, 2019). Se definen como metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por diversos géneros de mohos. Entre estos géneros encontramos algunos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Claviceps* como los productores de toxinas más importantes (N'zi et al., 2023).

Es importante señalar que se han identificado varios centenares de micotoxinas (>300), aunque solamente 30 de ellas son importantes y, de estas 30 micotoxinas las que representan más riesgo para salud de los humanos y animales son aflatoxinas, ocratoxinas, fumosinas, zearalenona, patulina y tricotecenos (N'zi et al., 2023). Estas sustancias de naturaleza química pueden afectar a la salud humana y animal, ya que, podrían estar presentes en los alimentos y en los piensos de los animales que han ser consumidos por los humanos, causando enfermedades crónicas e intoxicaciones (MAPA, 2015). La presencia o ausencia de estas micotoxinas va a depender de una gran variedad de factores como la temperatura, la humedad y el tipo de alimento que permitan o favorezcan el crecimiento de las especies de mohos productores de micotoxinas. Algunos de estos metabolitos pueden formarse en los cultivos, mientras que otros pueden aparecer en operaciones como la cosecha o el almacenamiento en función de las condiciones empleadas (AESAN, 2024).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas pueden observarse en distintos órganos y sistemas del cuerpo humano. A estos metabolitos, se les atribuyen efectos neurotóxicos, genotóxicos, hepatotóxicos, teratogénicos, inmunosupresores (Romero-Sánchez et al., 2022a) y problemas asociados con el crecimiento en la infancia. Estos problemas se pueden ver acentuados en la población infantil, debido a su mayor exposición por la mayor ingesta en relación con el peso corporal, mayor ritmo de crecimiento y un sistema metabólico inmaduro, aspectos que, les hace más susceptibles de sufrir problemas de salud. Esto pone en el foco la preocupación por la creciente necesidad de intentar prevenir la presencia de estas toxinas en los alimentos (Ismail et al., 2021).

Por estas razones, se intenta reducir al máximo la posible aparición de mohos en los alimentos, mediante la aplicación de distintas estrategias físicas, químicas, biológicas y legales, encaminadas a asegurar la calidad y seguridad alimentaria (Naeem et al., 2024). Estas estrategias preventivas se pueden y deben aplicar desde la

producción de materias primas hasta la obtención del alimento final, incluyendo, por ejemplo, buenas prácticas agrícolas, empleo de cultivos resistentes a la invasión por hongos, limpieza de la cosecha, mejora de las condiciones de transporte y almacenamiento, etc. (Ismail et al., 2021).

1.2. Factores que afectan a la presencia de hongos en los alimentos

Como se ha mencionado anteriormente, tanto los factores intrínsecos dependientes de la matriz, como los factores extrínsecos asociados al ambiente, incluyendo los periodos previo y posterior a la cosecha, van a influir en la aparición de hongos, y, por tanto, en la síntesis de micotoxinas (García Olivares, 2019). En este sentido, los factores intrínsecos van a ir relacionados con la composición fisicoquímica de los cereales, que contienen aproximadamente 70-75 % de carbohidratos, 8-15 % de proteínas, y porcentajes variables de fibra, grasas, vitaminas y minerales dependiendo de la especie, así como de su humedad y pH. Los factores extrínsecos van a relacionarse con el manejo del cultivo y las condiciones climáticas de la zona donde se lleve a cabo la producción del cereal (Alegbeleye et al., 2022). Algunos de estos factores son:

Temperatura: la temperatura es un factor importante que influye en la supervivencia de microorganismos alterantes de alimentos. Es un factor que está muy relacionado con la zona de cultivo y condiciones de almacenamiento. Dependiendo de la temperatura en estas etapas cultivo y almacenamiento, se pueden desarrollar unas especies u otras: *Penicillium* spp prevalecen a temperaturas más bajas llegando incluso a crecer a 4°C, aunque a ritmo más bajo, mientras que, a temperatura ambiente (20-25 °C) proliferan especies de algunos géneros como *Aspergillus* y *Eurotium* (Khan, 2024). La velocidad de producción de micotoxinas por los hongos, también va a verse influenciada por la temperatura, alcanzando su pico entre los 24-28 °C. A 4°C, es decir, en refrigeración se ralentiza tanto la proliferación de microorganismos, como la producción de toxinas (AESAN, 2024; Alegbeleye et al., 2022).

pH: el rango de pH en el que nos encontremos va a condicionar el crecimiento de distintos tipos de microorganismos. Las bacterias se multiplican en un rango de pH de 5-7, mientras que los mohos crecen en un amplio rango de pH 3-8, aproximadamente. Otros microorganismos como las levaduras van a tolerar pHs ácidos de hasta 1,5 (Alegbeleye et al., 2022).

Humedad y actividad de agua: la humedad, porcentaje de agua presente en el cereal, va a condicionar lo rápido que éste se deteriore, si la humedad del ambiente es mayor a la del sustrato, se favorecerá el crecimiento fúngico. Este, también se ve favorecido cuanto más actividad de agua (a_w) posea el alimento. La a_w es el agua

disponible que pueden emplear los microorganismos para crecer y cubrir sus funciones vitales (García Olivares, 2019).

Niveles de humedad de 12-13% y a_w 0,94-0,97 se consideran adecuados para el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, los mohos pueden crecer desde a_w de 0,70; lo que hace más fácil su aparición en el campo de cultivo en estaciones lluviosas. Aunque algunos géneros denominados xerofíticos son capaces de crecer a baja a_w se reconoce que por debajo de 0.6 de a_w los mohos no son capaces de crecer. Dentro de este grupo encontramos xerófitos moderados, capaces de crecer por debajo de 0,85 de actividad de agua como especies de *Penicillium* o *Aspergillus* (Alegbeleye et al., 2022; Rico-Munoz et al., 2019).

Oxígeno: todos los mohos requieren presencia de oxígeno en la producción de adenosina trifosfato (ATP) mediante fosforilación oxidativa para poder llevar cabo su desarrollo de forma óptima. Sin embargo, el crecimiento de muchos de ellos se ve mínimamente afectado por el contenido de oxígeno y pueden crecer en ambientes que tengan hasta 10 veces por debajo del oxígeno (2,1%) presente en la atmósfera (Khan, 2024).

Por ello, es muy importante el buen almacenamiento de los alimentos, tanto para evitar la aparición de microorganismos no deseados, como para aumentar su vida útil (Alegbeleye et al., 2022; Rico-Munoz et al., 2019). Otra alternativa aparte del buen almacenamiento de los productos es el uso de envases con atmósfera modificada (MAP) menor de 0,1% de O_2 y nitrógeno, que pueden inhibir el crecimiento de mohos como *Penicillium* (Rico-Munoz et al., 2019).

1.3. Tipos de micotoxinas

Las micotoxinas pueden agruparse atendiendo al género de moho que las produzca o a su estructura química. Así, podemos encontrar las producidas por el género *Aspergillus* (aflatoxinas, ocratoxina A, patulina), las que produce el género *Fusarium* (zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol, fumosinas, etc.) y otras micotoxinas como la citrinina, o las toxinas producidas por especies de *Claviceps* o *Alternaria* (AESAN, 2024). Una misma especie de moho puede producir varias micotoxinas, y la misma toxina puede ser producida por distintas especies (Khan, 2024).

Este trabajo se va a centrar en las aflatoxinas B1 y B2 (AFB1 y AFB2 respectivamente), zearalenona (ZEN), y ocratoxina A (OTA), debido a su importancia en la salud humana, siendo las aflatoxinas las consideradas más tóxicas (Romero-Sánchez

et al., 2022b). Se detallarán de las toxinas mencionadas algunos aspectos a continuación.

AFB1 y AFB2 son producidas por algunas cepas de especies como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estos proliferan predominantemente en climas tropicales gracias al clima húmedo y cálido. Pueden proliferar en gran cantidad de alimentos, incluyendo cereales, frutos secos, frutas desecadas, etc. Las aflatoxinas son cancerígenas, considerándose la B1 la más tóxica. La exposición a las aflatoxinas debe mantenerse tan baja como sea posible según la EFSA (AESAN, 2023c)

ZEN y sus metabolitos son producidos por especies del género *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* y *F. verticillioides*). Este género es un patógeno que ataca comúnmente a los cultivos causando daños importantes. Se encuentra de forma común en trigo y maíz, pero se puede encontrar también en otros cereales como avena, mijo, cebada, centeno y soja (Khan, 2024). Se ha observado que es capaz de activar o desactivar rutas metabólicas relacionadas con los estrógenos, causado por mecanismos de competitividad al interactuar con los receptores de dicha hormona (AESAN, 2023a). e incluso se ha relacionado con la causa de abortos (Rai et al., 2020).

OTA es una micotoxina que pueden producir especies de distintos géneros como *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*. Presenta una peculiaridad estructural con respecto a las otras toxinas, debido a que contiene un átomo de cloro. Es una toxina estable frente a las altas temperaturas, por lo que se puede encontrar en alimentos procesados aparte de en cereales y derivados como café, frutos secos, uvas, vino, etc. (Khan, 2024) produciéndose mayoritariamente durante el almacenamiento. Se le asocian efectos nefrotóxicos, teratógenos, inmunotóxicos, y posiblemente, neurotóxicos y carcinógenos (AESAN, 2023b).

1.4. Marco legal

La legislación europea establece niveles máximos de micotoxinas permitidos que varían dependiendo del alimento. En el caso de cereales y productos derivados se establece como límite máximo 2 µg/kg para AFB1, y 4 µg/kg para la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. En el caso de ZEN, el límite es 75 µg/kg y 3 µg/kg en el caso de OTA (Reglamento 2023/915; Reglamento 2024/1022).

También existen recomendaciones por parte de la Comisión Europea para intentar prevenir y reducir la cantidad de micotoxinas en los cereales, donde se proponen distintas medidas como rotar y planificar los cultivos, y se detallan factores de riesgo a

tener en cuenta en las buenas prácticas agrícolas y en operaciones como cosecha, secado, almacenamiento y transporte (Recomendación 2006/583).

1.5. Análisis de micotoxinas en cereales

Los cereales constituyen la base de energía de la dieta en prácticamente todas las poblaciones del mundo, representando aproximadamente el 60 % de la energía que se obtiene a nivel mundial. Los más empleados son arroz, maíz y trigo, seguidos de otros como avena, centeno y cebada (Hervert-Hernández, 2022). Varía el tipo de cereal mayoritario en función del continente, siendo el trigo el empleado en Europa principalmente, y el centeno en el norte de este continente (FAO). En consonancia con estos datos, la FAO (2024) sitúa la producción de 2024 en 2.854 millones de toneladas, cifra ligeramente superior a la de 2023.

Debido a la alta producción y consumo de cereales, es importante mantener la inocuidad alimentaria, desde el mantenimiento de los cultivos sanos, hasta el producto final, pasando por el proceso productivo. Por esta razón, se realizan distintas pruebas y análisis para la determinación y cuantificación de distintas micotoxinas en cereales.

El primer paso a realizar para determinar y cuantificar micotoxinas es extraerlas de la matriz. Para ello, debemos tener en cuenta distintos factores como el volumen de la muestra, el tipo de matriz, la cantidad de agua y solventes que se van a utilizar, etc. (Naeem et al., 2024).

Otro factor a considerar es el tipo de análisis que vamos a llevar a cabo. Podemos realizar diferentes tipos de cromatografía para identificar y cuantificar micotoxinas. Para su determinación podemos usar cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC). Pero en la mayoría de estudios, se emplean cromatografías líquidas del tipo High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), pudiendo este ir acoplado a distintos tipos de detectores, como un detector de fluorescencia (HPLC-FD), un espectrómetro de masas (HPLC-MS), o incluso a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) (Naeem et al., 2024; S. Zhou et al., 2024).

Además de las técnicas cromatográficas, también se pueden emplear técnicas inmunocromatográficas, que contienen los anticuerpos necesarios para unirse a las moléculas de interés (antígenos), en este caso las micotoxinas. Este tipo de análisis también pueden tener asociados mecanismos como fluorescencia para la lectura de los resultados. Este tipo de análisis nos permite una rápida y eficiente detección de

micotoxinas sin gastar tantos solventes orgánicos como en el caso de las cromatografías de gases o líquidos (Zhou et al., 2024).

A pesar de la multitud de posibilidades, una de las técnicas más eficientes detectando, identificando y cuantificando micotoxinas es la cromatografía de líquidos de alta presión acoplado a un detector de espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS). La espectrometría de masas mide la relación masa/carga de los iones para identificar compuestos que desconocemos, cuantificar compuestos conocidos y proporcionar información sobre distintas propiedades estructurales y químicas de las moléculas. El equipo cuenta con una serie de filtros mediante cuadrupolos que transfieren los iones en función de su proporción de masa y carga (m/z). Tras pasar por los filtros, las moléculas se rompen en algunos de sus enlaces en una celda de colisión, creando iones producto. Estos iones producto se vuelve a filtrar y es lo que se va a convertir en impulsos que detecta el detector, dándonos una señal que se muestra en el sistema como un espectro de masas (N'zi et al., 2023; SCIEX, 2021).

Esta técnica se puede aplicar para detectar y cuantificar gran variedad de toxinas en un mismo análisis con gran precisión y en gran variedad de matrices alimentarias aparte de cereales, por ejemplo, es aplicable a leche o a otras matrices con el tratamiento adecuado previo al análisis (González-Jartín et al., 2021; Kovač et al., 2022; Zhang et al., 2023).

1.6. Proceso de molienda

En el proceso de molienda de los cereales, las distintas fracciones de salvado se obtienen tras separar las capas externas del cereal del endospermo, de donde se obtiene la harina blanca. El resto de las fracciones se obtienen de proporciones variables del resto de las partes del grano del cereal (tegumentos, germen, capa de aleurona y endospermo harinoso). Estas fracciones obtenidas se nombran de diferentes formas en función de la zona geográfica, los más comúnmente empleados son: salvado de hoja, cuartas, tercerillas, segundas, harinillas y harina baja, y se suelen emplear en alimentación animal (FEDNA, 2019). En este estudio se incluyen salvado de hoja, cuarta, tercerilla, harina y salvado completo reconstituido con distintos porcentajes indicado por los fabricantes de las fracciones anteriores. El proceso de molienda, también conocido como molturación, se lleva a cabo después de las etapas de limpieza y acondicionamiento de los granos (Zamora & Rodiles, 2022). La molienda para obtener harina blanca (libre de salvado) se realiza en distintas etapas donde el grano se ve sometido a un proceso de molienda con molinos de rodillos, que proporcionan gran eficacia energética, sometiendo al grano a fuerzas de compresión y cizalla gracias a las

estrías presentes en los rodillos y las diferentes velocidades entre ellos (Román, 2009). En las primeras etapas de la molienda se utilizan molinos con estrías para producir la fragmentación del grano y liberar las capas más externas del grano, mientras que en las etapas posteriores se utilizan molinos lisos, para la reducción del tamaño de partícula del endospermo más o menos libre del salvado y la producción de la harina. Para evaluar el rendimiento del proceso se mide el porcentaje de extracción, que se refiere a la cantidad de harina obtenida de 100 Kg de cereal, encontrándose normalmente en un 78%, aproximadamente el porcentaje de endospermo que tiene el grano. Los subproductos representarían aproximadamente un 25% del peso del grano (FEDNA, 2019; Zamora & Rodiles, 2022) correspondiente a las capas externas indicadas anteriormente, donde se incluirían las fracciones de hoja, cuarta y tercerilla. Además, en las harinas obtenidas de trigo, dependiendo de la proporción y calidad de la proteína de gluten que contengan, se pueden clasificar en fuerza, media fuerza, panificable o débil, teniendo el mayor porcentaje de proteína la de fuerza (10-12 %). Cuanta más fuerza tenga la materia prima, mayor capacidad de formar una red de gluten con la hidratación y el trabajo mecánico de la masa formada por harina y agua, con gran habilidad de retención de agua y gas (Sifre et al., 2019).

Se han realizado estudios de presencia y cuantificación de micotoxinas en diferentes piensos de alimentación animal, incluyendo distintas técnicas tanto inmunológicas como cromatográficas, en los que se han encontrado micotoxinas (Pereira et al., 2019; Tian et al., 2022). También se han estudiado las cantidades de micotoxinas en harinas elaboradas con las distintas fracciones de la molienda de cereales por técnicas cromatográficas, encontrando de algunas toxinas mayor cantidad en las harinas que incluían capas externas del cereal en comparación con las que no (Wang et al., 2020). Haga clic o pulse aquí para escribir texto. De acuerdo con la bibliografía revisada hasta el momento, no se han realizado estudios que evalúen si varía la cantidad de micotoxinas en función de la fuerza de las harinas, siendo este trabajo de investigación uno de los primeros en llevarlo a cabo.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo de investigación es conocer los niveles de micotoxinas existentes en los salvados de los principales cereales para su incorporación segura en la industria alimentaria. Por ello, los objetivos específicos son:

- Establecer los niveles de micotoxinas AFB1, AFB2, ZEN y OTA en diversas fracciones de salvados y harinas obtenidas de la molienda de diversos cereales.

- Relacionar los niveles de mohos y levaduras y los microorganismos mesófilos aerobios con la presencia de micotoxinas en diversos cereales.
- Estudiar los factores intrínsecos de las distintas fracciones obtenidas de los cereales que van a permitir el crecimiento de mohos formadores de toxinas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Para el estudio de micotoxinas, un total de 65 muestras procedentes de distintas fracciones de trigo, centeno y cebada fueron obtenidas de 3 empresas distintas, 2 de ellas situadas en la provincia de Valladolid y una de ellas situada en la provincia de Zamora. Estas empresas se codificaron como 1, 2 y 3, respectivamente. Para cada grano de los distintos cereales, se obtuvieron tanto salvados como harinas para su análisis. Para los salvados, se obtuvieron las fracciones de hoja, cuarta y tercerilla procedentes de la separación del salvado en el proceso de molienda del grano, y el salvado del grano completo (hoja, cuarta, tercerilla y harina) se reconstituyó con las proporciones indicadas por cada empresa. Así, se obtuvieron las siguientes muestras:

- 40 muestras de trigo: 8 fracciones de hoja, 8 fracciones de cuarta, 8 fracciones de tercerilla, 8 de harina y los 8 salvados completos correspondientes. Las muestras de trigo se obtuvieron de las 3 empresas; 15 de la empresa 1, 10 de la empresa 2 y 15 de la 3.
- 20 muestras de centeno: 4 fracciones de hoja, 4 de cuarta, 4 de tercerilla, 4 harinas y sus 4 salvados completos. 10 muestras de la empresa 1 y 10 muestras de la empresa 2.
- 5 muestras de cebada: 1 fracción de hoja, 1 de cuarta, 1 de tercerilla, 1 harina y 1 salvado completo correspondiente. Estas muestras se obtuvieron de la empresa 2.

La codificación de muestras se llevó a cabo de la siguiente manera: Nº de empresa-Cereal-Fracción. Los números asignados a las empresas van del 1 al 3. Los cereales se designaron con la letra T para el trigo, C para el centeno y Cb para la cebada. Las fracciones se nombraron Hoja, Cta (cuarta), Tlla (tercerilla), Harina y Salvado, y en el caso de las muestras de trigo, seguido de F (fuerza), MF (media fuerza) y Pan (panificable). En el caso de las muestras de centeno, tras la fracción se indicó 1 o 2 para diferenciar entre los dos conjuntos de muestras de cada empresa.

Las muestras se almacenaron en bolsas cerradas semipermeables al oxígeno dentro de cajas y a una temperatura de 25 °C y fueron procesadas en un tiempo no mayor de 5 días desde su recepción.

3.2. Determinación de micotoxinas

Proceso de extracción de micotoxinas

Para conocer las condiciones óptimas de extracción del analito en la matriz que queremos analizar fue necesario optimizar el proceso. Para ello, se estudiaron y analizaron tres opciones de extracción:

- a) Acetonitrilo y agua con 57,14 % de acetonitrilo de grado HPLC (VWR International LLC, BDH CHEMICALS, EE. UU.) y 42,86 % de agua desionizada obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Alemania) 57,14:42,86 (v/v) (Gómez et al., 2023).
- b) Acetonitrilo, agua Mili-Q y ácido acético glacial (99,5-100,5 % de riqueza, PanReac AppliChem, Barcelona) 79:20:1 (v/v/v) (Sulyok et al., 2010).
- c) Acetonitrilo y agua Mili-Q 80:20 (v/v) (Romero-Sánchez et al., 2022a).

Se analizaron los porcentajes de recuperación de las micotoxinas que se habían añadido a las muestras en una concentración conocida, y se observó que el mayor porcentaje se obtenía en las muestras con acetonitrilo y agua Mili-Q 80:20. Los patrones de micotoxinas (pureza de micotoxinas > 99 %), se obtuvieron de Romer Labs (EE. UU.), estos se disolvieron en metanol de grado LC-MS, pureza $\geq 99,9\%$ de VWR International LLC (BDH CHEMICALS, EE. UU.). Exceptuando los cambios en las proporciones de acetonitrilo y agua Mili-Q, se siguió el mismo método de extracción y se usaron los mismos reactivos que Gómez et al. (2023). También, se introdujo un cambio previo a comenzar la extracción para reducir el tamaño de las muestras de salvado de hoja, debido a su mayor tamaño. Estas, se molieron durante 2 min con un molinillo Super Junior (Moulinex, Francia). Posteriormente se procedió a la extracción de dos gramos de cada muestra, como se indica anteriormente. Cada extracción se realizó por duplicado y se extrajo el sobrenadante tras la centrifugación, del cual se extrajo una alícuota de 1 mL. Esta alícuota se secó a 37 °C y con nitrógeno con un evaporador Reacti-Therm™ #TS-18822 (Thermo Scientific™, EE. UU.). Posteriormente, se conservó tras el secado a -20 °C hasta el momento de su análisis. El resto del sobrenadante sin secar se mantuvo también a -20 °C. Para comprobar que el material empleado en la extracción no estaba contaminado por micotoxinas, se realizaron blancos en cada extracción, es decir, se reprodujo el mismo procedimiento, pero sin agregar muestra.

Previo al análisis de muestras por UHPLC-MS/MS, se reconstituyeron con metanol y agua Mili-Q 50:50 (v/v) se resuspendieron con ayuda de un vortex a 2000 rpm durante 0,5 min y se filtraron dos veces para eliminar la turbidez y proceder a su análisis en el cromatógrafo. La filtración se realizó con filtros de jeringa de nylon, primero con un filtro de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de poro (SFNY-145-100, BRANCHIA) y posteriormente con un filtro de 13 mm de diámetro y 0,22 μm de tamaño de poro (SFNY-122-100, BRANCHIA). Tras esto, las muestras ya estaban listas para ser analizadas, como se muestra en la Figura 1.

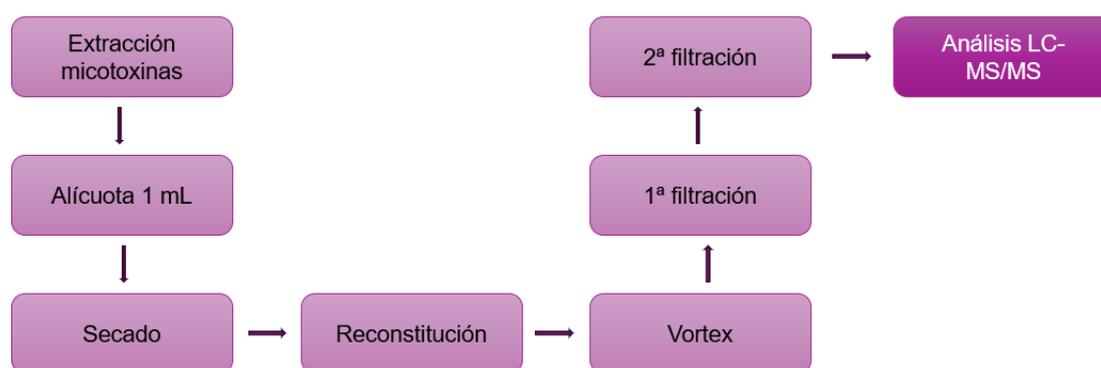


Figura 1: Esquema general del flujo de trabajo del proceso de extracción y análisis de micotoxinas.

Análisis de micotoxinas por LC-MS/MS

El análisis de las micotoxinas se realizó empleando fuentes de Ionización por electro-espray (ESI). La columna utilizada para la separación cromatográfica fue Luna Omega Polar C18 de Phenomenex (1,6 μm ; 100 x 2.1 mm). Se midieron las toxinas AFB1, AFB2, OTA y ZEN. La detección 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 método empleado son los mismos que en el caso de Gómez et al. (2023), con la excepción del tiempo de cromatograma, que se acortó en este caso a 9 minutos, por lo que el gradiente de las fases móviles sufrió algunas modificaciones. Las fases móviles A y B están constituidas por agua con 0,1% de ácido fórmico y acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico respectivamente. El programa de gradiente establecido era el siguiente: 0-1 min con 80% de A y 20% de B; un gradiente lineal entre 1-5 min hasta 10% de A y 90% de B; manteniendo estas proporciones del min 5 al 6. Posteriormente, de 6,10-9 min retorno y mantenimiento a las proporciones iniciales de 80% A y 20% B.

La adquisición de los datos se realizó con el software Analyst® (Versión 1.7.3; Sciex), y se procesaron con el software SciexOS (Versión 1.4.1; Sciex).

Tabla 1: Parámetros del LC-MS/MS para la identificación de las distintas micotoxinas.

Iones micotoxinas	Tiempo retención (min)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell (ms)	CE (V)	CXP (V)	DP (V)
OTA pos 1	5,61	404,10	293,00	45,00	28,00	19,00	45,00
OTA pos 4		404,10	221,00	45,00	60,00	19,00	45,00
OTA pos 5		404,10	193,00	45,00	60,00	19,00	45,00
AFB2 pos 1	4,46	315,02	287,10	45,00	37,00	10,00	116,00
AFB2 pos 2		315,02	259,10	45,00	43,00	8,00	116,00
AFB1 pos 2	4,66	312,97	241,00	45,00	53,00	18,00	106,00
AFB1 pos 1		312,97	285,20	45,00	35,00	10,00	106,00
ZEN 1	5,65	316,91	174,90	45,00	-32,00	-19,00	-80,00
ZEN 2		316,91	174,90	45,00	-42,00	-9,00	-80,00

Tiempo de retención: tiempo en el que la micotoxina viaja a través del LC-MS/MS antes de ser detectada; **OTA:** ocratoxina A; **AFB2:** aflatoxina B2; **AFB1:** aflatoxina B1; **ZEN:** zearalenona; **pos n°:** distintos iones de una misma molécula; **Q1:** cuadrupolo 1 permite la selección del ion precursor; **Q3:** cuadrupolo 3 permite la selección de dos iones producto; **Dwell time:** tiempo de permanencia; **CE:** energía de colisión; **CXP:** potencial de energía de colisión; **DP:** potencial de deriva.

3.3. Efecto matriz

Para estudiar cómo afecta la matriz, en este caso cereales, en el rendimiento del proceso de extracción de micotoxinas, se realizaron tres curvas patrón con tres matrices diferentes: salvado completo de trigo, salvado completo de centeno y harina de trigo. El proceso de extracción se realizó igual que para el resto de las muestras y con los mismos reactivos y equipos, añadiendo la concentración conocida de toxinas tras la primera agitación manual. Se estableció un tiempo de espera de 30 min para que las toxinas interaccionaran con la matriz antes de adicionar las sales y continuar con el proceso de extracción.

Las muestras con toxina adicionada se secaron, reconstituyeron y analizaron igual que el conjunto de muestras. Cada punto de la recta patrón se realizó por duplicado.

3.4. Análisis microbiológico

Preparación de las muestras

Se pesaron 25 g de muestra y se homogeneizaron con 225 mL de agua de peptona durante 2 min en un Stomacher siguiendo el método de Caro et al. (2023). El agua de peptona se preparó con agua destilada con un 0,1 % de proteasa peptona (Condalab, Madrid) y un 0,85 % de NaCl (PanReac AppliChem, Barcelona). Tras realizar las diluciones necesarias, las placas fueron sembradas por duplicado.

Siembra de muestras

En el caso de Flora aerobia mesófila viable, 1 mL de la dilución correspondiente se sembró en profundidad en plate count agar (PCA, VWR Chemicals, EE. UU.). Las placas se incubaron durante 48 h a 30° C y se procedió a su conteo.

Para el recuento de mohos y levaduras, 0,2 mL de las diluciones adecuadas se sembraron en superficie en Agar Base Dichloran-Glycerol (DG18, Thermo Fisher Diagnostics: CM0729), suplementado con Cloranfenicol (VWR Chemicals: 928260NL) siguiendo las recomendaciones de Cardoso et al, (2019). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 25 °C durante 120 h para el recuento de mohos a las 72 h y levaduras a las 120 h.

3.5. Análisis fisicoquímico

Para llevar a cabo el análisis fisicoquímico se llevaron a cabo varias medidas, incluyendo pH, actividad de agua y humedad:

Medición de pH

Las medidas de pH de cada muestra se realizaron por duplicado a temperatura ambiente, aproximadamente 20 °C. Para ello, se pesaron 5 g de la muestra y se mezclaron con 25 mL de agua Mili-Q mediante agitación manual durante 30 s. Tras dejar reposar la muestra por 5 min, se procedió a su medición con un potenciómetro digital Crison (modelo Basic 20) conectado a un electrodo Crison (modelo 52-02).

Actividad de agua

La medida de la actividad de agua se determinó en un aparato Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Inc.). En una cubeta de plástico se depositaron aproximadamente 2 g de muestra y se procedió a realizar dos mediciones de cada muestra. Las medidas fueron efectuadas a temperatura ambiente.

Humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó por desecación en estufa de aire forzado caliente hasta peso constante siguiendo las recomendaciones de AOAC y como se describe a continuación. 5 g de cada muestra fueron pesados en cápsulas de acero inoxidable que fueron previamente secadas a 130 °C durante 2 h. La muestra en la cápsula se introdujo en una estufa de aire forzado durante 3,5 h a 130 °C, seguidamente las muestras fueron trasladadas a un desecador, dónde se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente, pesándolas a continuación con una balanza $\pm 0,001$ g de precisión.

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurion XIX (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.). Se estudiaron las diferencias estadísticas realizando distintos análisis de varianza simple (ANOVA) empleando el método estadístico de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estudiar la presencia de micotoxina en los cereales, se analizaron parámetros microbiológicos y propiedades físico-químicas. La posible influencia de esos parámetros se analizó a través del Análisis de la Varianza de una vía, como se muestra en las Tablas 2 y 3, comparando el efecto del tipo de cereal, empresa, y las diferentes fracciones de la molienda.

4.1. Análisis microbiológico y fisicoquímico

El análisis microbiológico para la flora aerobia mesófila viable (FAMV), mohos y levaduras, así como las propiedades fisicoquímicas de los cereales estudiados se recogen en la Tabla 2. En el estudio de la FAMV se muestran los recuentos medios en Log UFC/g, estos recuentos representan las bacterias presentes en el alimento que son capaces de crecer entre 30 y 37 °C en presencia de oxígeno. Este grupo microbiano es considerado, desde el punto de vista inocuidad alimentario, un indicador de la higiene de un alimento durante su manipulación (González Rodríguez, 2018). No se encontraron diferencias significativas entre los distintos cereales ni entre las empresas, pero sí entre las distintas fracciones de los cereales. Los valores más altos pertenecieron a las fracciones de hoja, cuarta y tercerilla, sin diferencias significativas entre ellas, seguidas de la fracción de salvado completo, y finalmente la harina, con 4,82 Log UFC/g de media, siendo la fracción donde se encontró una menor cantidad de FAMV. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios que encontraron alrededor de 4 Log UFC/g de FAMV en harinas (Ennadir et al., 2012). También, coinciden con diversas investigaciones que han encontrado una mayor contaminación microbiológica en las fracciones de la molienda, con excepción de la harina, que fue la que presentó un menor recuento de bacterias aerobias mesófilas (Berghofer et al., 2003; Eglezos, 2010). Los elevados recuentos observados en este estudio de FAMV en las distintas fracciones de la molienda de los cereales, exceptuando la harina, pueden ser debido a que estas fracciones son las partes más externas de los cereales y por lo tanto, las partes del trigo que mayor interacción tienen con medio ambiente, entre ellas las bacterias. En la

actualidad no hay legislación sobre los criterios microbiológicos sobre el recuento de FAMV en los cereales y los productos derivados de estos, sin embargo, la Comisión Internacional de Especificaciones para Alimentos (ICMSF) indica que este grupo de microorganismos es un criterio importante en la calidad de estos productos (Rehagel, 2022) e indica como límites para $m=1$ entre 3-3,7 Log UFC/g y para $M=1$ entre 4-4,7 Log UFC/g. En este trabajo de investigación, todas las muestras excedieron esos límites, incluyendo las harinas, este hecho indica que los productos obtenidos de estas fracciones podrían tener una calidad microbiológica comprometida y que los productores e industriales deberían mejorar las prácticas higiénicas durante la producción y procesado de los cereales estudiados en este trabajo para mejorar la calidad microbiológica de las fracciones obtenidas en la molienda.

En el caso de mohos y levaduras, también se expresan los valores medios en Log UFC/g. Se encontraron diferencias significativas para el tipo de cereal y la empresa en el caso de los mohos, a diferencia de las levaduras que no presentan diferencias significativas ni para el tipo de cereal ni entre las distintas empresas analizadas. Además, se observó que el promedio más bajo de mohos se encontró en centeno con 2,45 Log UFC/g, y el promedio más alto de mohos fue en la cebada con 3,15 Log UFC/g, los valores obtenidos en el trigo fueron intermedios. En cuanto a levaduras, los distintos cereales presentaron valores alrededor de 3,50 Log UFC/g, no se observaron diferencias significativas entre los distintos cereales. Con respecto a las empresas, se observó que las muestras provenientes de la empresa 3 mostraron recuentos de mohos significativamente más altos con respecto a las empresas 1 y 2. El promedio de levaduras no presentó diferencias significativas entre empresas.

Las distintas fracciones de cereal también presentaron diferencias significativas entre ellas para mohos y levaduras. Las fracciones que presentaron los valores medios de mohos más elevados son la hoja, seguida de tercerilla, salvado y harina, y, por último, la cuarta que presentó la media más baja con 2,50 Log UFC/g. Los promedios de levaduras se encontraron diferenciados en dos grupos: harina y salvado con 2,30 Log UFC/g y hoja, cuarta y tercerilla con promedios próximos a 3,50 Log UFC/g. Distintos estudios observaron valores similares de mohos y levaduras entre 3 y 4 Log UFC/g, además, encontraron que el salvado fue la fracción que mayor cantidad de mohos y levaduras presentaba, y la harina la que menos cantidad contenía (Eglezos, 2010; Gonzalez Pereyra et al., 2011).

La recopilación de normas microbiológicas de alimentos y asimilados recoge el límite para harinas 4 Log UFC/g (2017) y en cereales entre 1 y 4 Log UFC/g. (UPV, 2022).

Todas las muestras analizadas en este estudio mostraron una unidad logarítmica menor al máximo nivel de mohos permitido, este hecho sugiere que un control adecuado a lo largo de la cadena alimentaria para este tipo de microorganismos.

Tabla 2: Flora Aerobia Mesófila Viable (FAMV), mohos, levaduras, pH, actividad de agua y humedad para las harinas y salvados procedentes de diversos cereales y empresas.

	FAMV	Mohos	Levaduras	pH	a _w	Humedad
Cereal						
Trigo	5,26 ± 0,52 ^a	2,74 ± 0,49 ^b	3,35 ± 1,29 ^a	6,13 ± 0,28 ^b	0,58 ± 0,04 ^a	10,48 ± 0,71 ^a
Centeno	5,40 ± 0,25 ^a	2,45 ± 0,44 ^a	3,25 ± 0,62 ^a	6,29 ± 0,23 ^c	0,59 ± 0,04 ^a	10,90 ± 0,73 ^b
Cebada	5,47 ± 0,46 ^a	3,15 ± 0,74 ^c	3,77 ± 0,69 ^a	5,28 ± 0,30 ^a	0,59 ± 0,05 ^a	10,52 ± 0,60 ^{ab}
Empresa						
1	5,25 ± 0,53 ^a	2,68 ± 0,52 ^a	3,15 ± 0,82 ^a	6,25 ± 0,29 ^b	0,60 ± 0,03 ^b	10,63 ± 0,86 ^a
2	5,33 ± 0,39 ^a	2,53 ± 0,59 ^a	3,08 ± 1,17 ^a	5,93 ± 0,44 ^a	0,59 ± 0,05 ^b	10,68 ± 0,55 ^a
3	5,43 ± 0,41 ^a	2,94 ± 0,32 ^b	2,96 ± 0,90 ^a	6,19 ± 0,23 ^b	0,56 ± 0,03 ^a	10,46 ± 0,75 ^a
Fracción						
Hoja	5,43 ± 0,33 ^c	2,81 ± 0,58 ^b	3,42 ± 0,38 ^b	6,40 ± 0,31 ^c	0,60 ± 0,04 ^b	10,41 ± 0,60 ^a
Cuarta	5,51 ± 0,20 ^c	2,50 ± 0,35 ^a	3,56 ± 0,36 ^b	6,13 ± 0,35 ^b	0,61 ± 0,05 ^b	10,72 ± 0,67 ^{ab}
Tercerilla	5,62 ± 0,23 ^c	2,78 ± 0,58 ^{ab}	3,69 ± 0,26 ^b	6,14 ± 0,25 ^b	0,57 ± 0,04 ^a	10,37 ± 0,78 ^a
Harina	4,82 ± 0,52 ^a	2,61 ± 0,50 ^{ab}	2,30 ± 1,08 ^a	5,84 ± 0,38 ^a	0,57 ± 0,03 ^a	10,87 ± 0,86 ^b
Salvado	5,23 ± 0,41 ^b	2,75 ± 0,57 ^{ab}	2,30 ± 1,25 ^a	6,04 ± 0,34 ^b	0,57 ± 0,03 ^a	10,68 ± 0,62 ^{ab}

Valores medios ± desviación estándar. Columnas seguidas de diferentes letras para el mismo tipo de cereal, empresa o fracción de cereal indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. **FAMV:** Flora Aerobia Mesófila Viable; **a_w:** actividad de agua. Los valores medios de FAMV, Mohos y Levaduras se muestran en Log UFC/g. Los valores medios de humedad se muestran en %.

Los niveles de pH presentaron diferencias significativas en todos los casos. En cuanto al tipo de cereal, presentan valores medios desde 5,28 en la cebada a 6,29 en el trigo. En relación con las empresas, se encontraron las medias más altas en la empresa 2, y los valores más altos en la empresa 1. La fracción harina es la que menor pH presenta, con una media de 5,84 seguida de salvado, cuarta y tercerilla respectivamente. Los pHs medios más altos pertenecen a la fracción de hoja, con un valor de 6,40. Estos valores se ajustan a los valores normales de pH de cereales (Casaubon-Garcín et al., 2018).

Los valores de actividad de agua no presentaron diferencias significativas en cuanto al tipo de cereal. Se encontraron diferencias significativas entre la empresa 3 y la 1 y 2, teniendo estas empresas valores medios de a_w significativamente más altos que la primera. Las fracciones del cereal también presentaron diferencias significativas en dos grupos, por un lado, harina, tercerilla y salvado con una media de a_w de 0,57, y, por otro lado, cuarta y hoja con valores de 0,60 y 0,61. Estos valores coincidieron con la presencia de microorganismos en las muestras, ya que, a partir de valores de actividad de agua de 0,6; los microorganismos, como los mohos son capaces de empezar a desarrollarse en los alimentos (Cardona Serrate, 2019).

La humedad de las muestras presentó diferencias significativas en el tipo de cereal y en sus fracciones, pero no diferencias entre las empresas. Los valores medios se encuentran en todos los casos entre 10 y 11 %, valores inferiores del límite legal en harinas (<15%). Entre las muestras de trigo y centeno si existieron diferencias significativas, con mayor humedad en el centeno, pero no entre estos cereales y las muestras de cebada. Las fracciones que menos porcentaje de humedad presentaron fueron la tercerilla y hoja, que mostraron diferencias significativas con la harina, la fracción que más humedad presentó. Las fracciones de cuarta y salvado no presentaron diferencias significativas con el resto de las fracciones. El porcentaje de humedad en los cereales oscila entre un 8 y 18 %, por lo que, generalmente se precisa una etapa de secado para asegurar su correcta estabilidad del alimento y la prevención del crecimiento de microorganismos alterantes (Ferrerias, 2009). Normalmente, del 13 al 15 % de humedad es lo indicado para llevar a cabo el almacenamiento adecuado de los cereales para periodos de hasta un año, y para periodos más extensos se requiere bajar los niveles del 11 al 13% de humedad aproximadamente. Por otro lado, el Código Alimentario Español establece que el porcentaje de humedad de las harinas no debe exceder el 15 %, niveles que no se han alcanzado en ninguna de las muestras (Código Alimentario Español, 1967).

En el caso del trigo, cereal para el cual se estudiaron la mayor cantidad de muestras, los resultados obtenidos también se presentan en forma de Figuras (ver Figuras 2-7) para su mejor comprensión. También, se presentan los resultados obtenidos de cada fracción y empresa para centeno y cebada (ver Figuras 1-11 del Anexo II).

Como se observa en la Figura 2, las muestras de trigo con mayores Log UFC/g de flora aerobia mesófila viable fueron muestras de tercerilla, salvado, cuarta y hoja, mientras que las muestras que menos cantidad de FAMV tenían son las muestras de harina y algunas de salvado. Esta tendencia podría estar relacionada con el manejo y

almacenaje de las muestras y mayor interacción de estas fracciones con el medio ambiente durante la producción y transporte del grano. En el caso de la harina, con mayor valor comercial, es posible que las muestra sean almacenadas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. La muestra que más Log UFC/g fue una muestra de tercerilla con 6,17; y la muestra que menos cantidad presentó fue una muestra de harina con 3,91 Log UFC/g. También se observó que las muestras procedentes de trigo de fuerza presentaron, por lo general, menores recuentos de FAMV que las muestras de media fuerza o panificables. Así mismo, se puede observar que las muestras de salvado tienen un contenido de FAMV superior a las harinas y, además, que las muestras provenientes de la empresa tres tuvieron un mayor recuento de este grupo microbiano. Estas diferencias podrían ser debidas a dos situaciones: una ellas es que cada empresa elabora la mezcla de salvado con porcentajes de fracciones diferentes y según la fracción usada aportará mayor o menor cantidad de bacterias, otra de ellas es que el control de calidad durante la molienda sea más restrictivo en algunas empresas, por ejemplo, la empresa tres debería mejorar las buenas prácticas de la molienda porque presenta un mayor recuento de todos grupos microbianos estudiados.

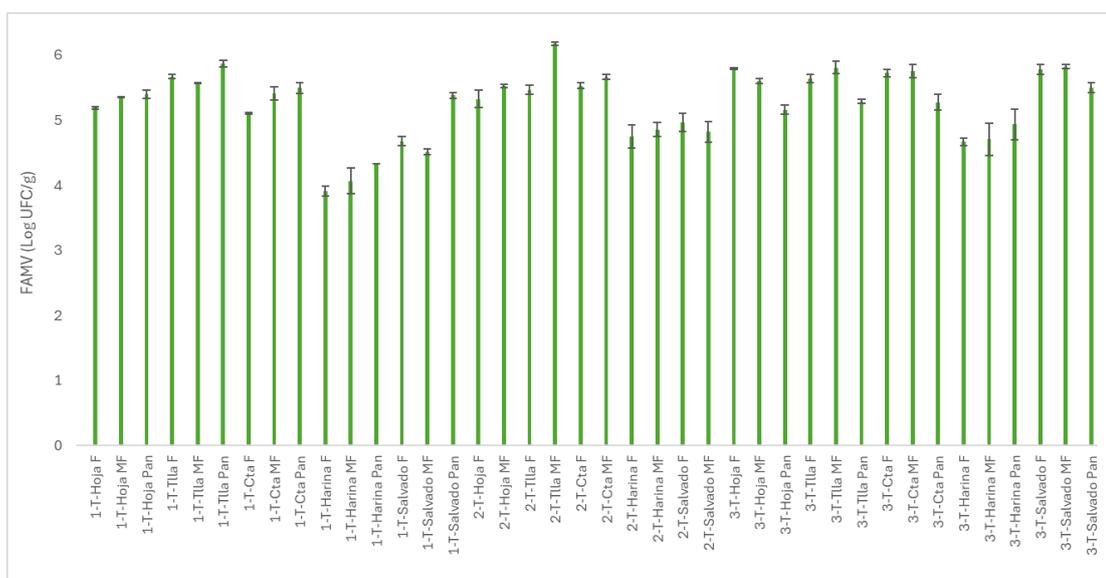


Figura 2: Flora Aerobia Mesófila Viable (FAMV) expresado en Log UFC/g presente en las muestras de trigo (T) procedentes de las empresas 1, 2 y 3. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

No obstante, en centeno (Anexo II, Figura 1) no se observó la tendencia que observamos en el trigo en las distintas fracciones. En el caso del resto de fracciones tampoco se observó una tendencia clara. En cebada (Anexo II, Figura 2) la muestra que más aerobios mesófilos presentó fue la de hoja, y la que menos la de salvado.

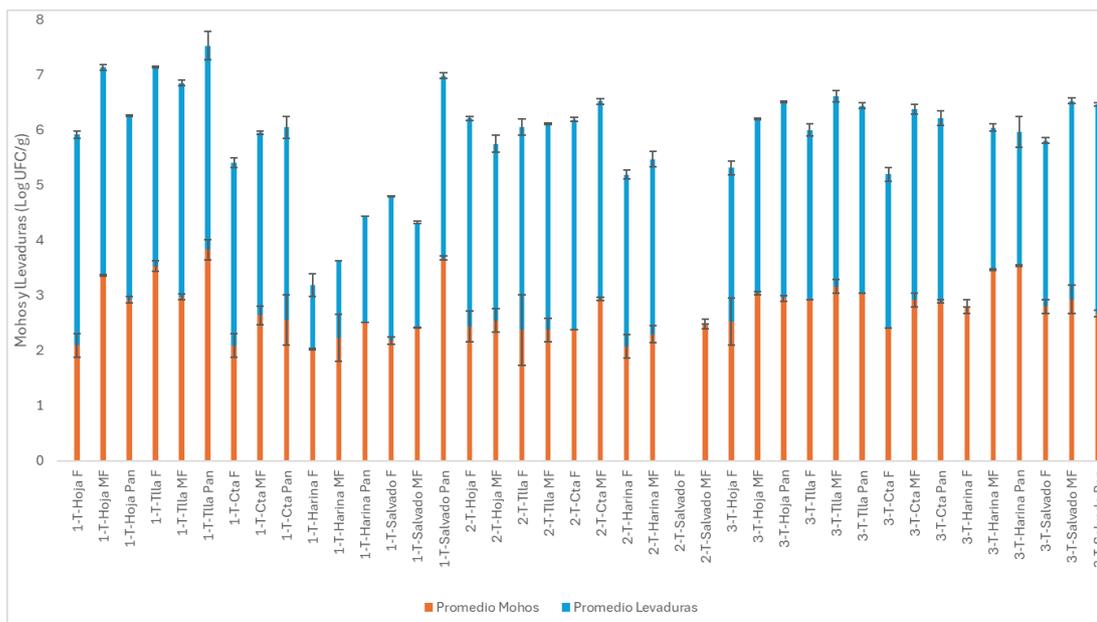


Figura 3: Presencia de mohos (naranja) y levaduras (azul) expresado en Log UFC/g presentes en las muestras de trigo (T) procedentes de las empresas 1, 2 y 3. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; Tlla: tercerilla; Cta: cuarta; F: fuerza; MF: media fuerza; Pan: panificable.

En la Figura 3 se muestran los recuentos de mohos y levaduras en Log UFC/g de tercerilla, hoja, salvado y cuarta ya que fueron las muestras que mayor presentaron nivel de esos grupos microbianos. Las fracciones procedentes de trigos de fuerza fueron las que presentaron menores recuentos mientras que las más contaminadas fueron las panificables. Sin embargo, los recuentos de mohos y levaduras para las muestras 2-T-Salvado F y 2-T-Salvado MF fueron superiores a 3 Log UFC/g, mientras la muestra 3-T-Hoja F presentó recuento > 3 Log UFC/g de levaduras. Las muestras que menos contaminación por mohos y levaduras presentaron fueron las fracciones de harina, por lo que podemos deducir que son las muestras con mayor calidad microbiológica, este hecho se debe a diversas razones; i) esta fracción se encuentra en la parte interna de grano menos susceptibles de ser contaminadas por microorganismos y atacadas por insectos que las zonas más externas del grano, ii) esta fracción es el producto principal de la molienda mientras que el salvado, es el subproducto y iii) durante el proceso se incluya un control de calidad más estricto en el momento de obtener esta fracción.

En cuanto a la cantidad de mohos y levaduras en centeno (Anexo II, Figura 3), se encontraron mayores recuentos en las fracciones de tercerilla, salvado y cuarta como en el caso del trigo, y las muestras que presentaron menores recuentos cantidad fueron algunas harinas. En cebada (Anexo II, Figura 4) se observó que la muestra más contaminada fue la de hoja, seguida de la de cuarta y tercerilla, y la menos contaminada

fue la de salvado, ya que, únicamente se encontraron mohos, pero no se detectó crecimiento de levaduras en esta muestra.

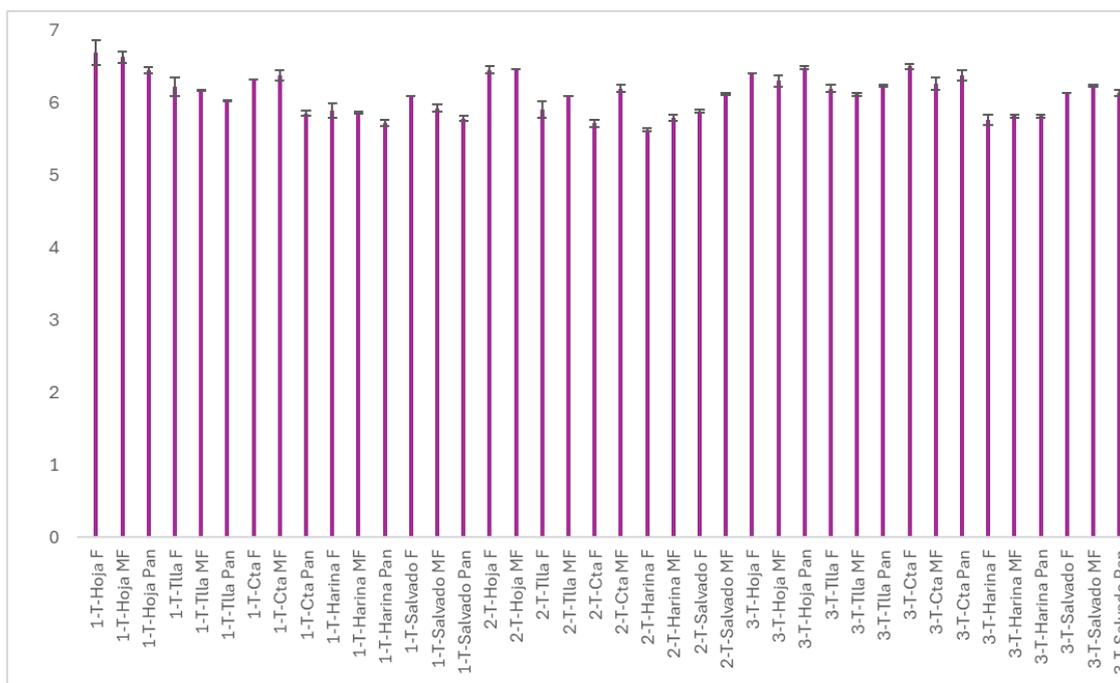


Figura 4: Valores de pH en las muestras de trigo (T) procedentes de las empresas 1, 2 y 3. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; Tlla: tercerilla; Cta: cuarta; F: fuerza; MF: media fuerza; Pan: panificable.

En el trigo, los pHs de las muestras oscilaron entre 5 y 7 (Figura 4). Las muestras que valores más altos presentaron fueron las fracciones de hoja y cuarta, las fracciones salvado y tercerilla presentaron valores medios, y los valores de harina presentaron los valores más bajos. La muestra con pH más alto fue hoja de fuerza con 6,69 y la muestra con pH más bajo es harina de fuerza con 5,62. En este caso no se encuentra relación entre los valores de pH y la cantidad de proteína (fuerza, media fuerza y panificable) como en los casos de recuento de FAMV y mohos y levaduras. El pH es considerado un factor intrínseco de los alimentos y está condicionado dos aspectos fundamentales, la composición del alimento y el crecimiento microbiano. El menor pH observado en la harina se puede explicar porque la harina contiene mayor cantidad de proteínas y por lo tanto, contiene aminoácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico que le proporcionan un pH ligeramente ácido.

Los valores de pH en las muestras de centeno (Anexo II, Figura 5) también oscilaron entre el máximo de 6,64 en una muestra de hoja y el mínimo de 5,64 en una muestra de cuarta. No se observaron tendencias entre las distintas fracciones debido a la poca variación en los valores. Por el contrario, en la cebada (Anexo II, Figura 6) encontramos gran variación, con el pH más alto en la muestra de hoja, y el más bajo en

la muestra de harina, con valores de 5,55 y 4,77; valores en conjunto más bajos que los de centeno y trigo.

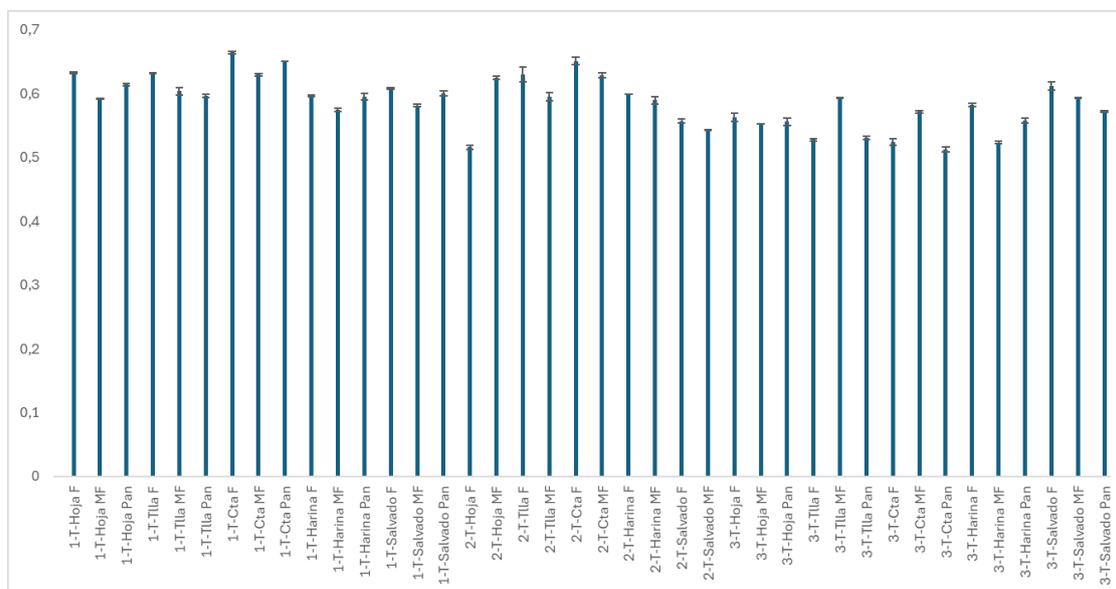


Figura 5: actividad de agua (a_w) en las muestras de trigo (T) procedentes de las empresas 1, 2 y 3. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla**: tercerilla; **Cta**: cuarta; **F**: fuerza; **MF**: media fuerza; **Pan**: panificable.

En las figuras 5 y 6, observamos los valores que se hallaron para actividad de agua y humedad. La actividad de agua en las muestras de trigo se encontró en todos los casos entre 0,5 y 0,7; valores a partir de los cuales los muchos mohos son capaces de crecer, como se mencionaba anteriormente en la introducción. Del mismo modo, la humedad estuvo comprendida entre un 9 y un 12 %, valores óptimos para el crecimiento de microorganismos. Las muestras que más humedad y actividad de agua presentaron se correspondieron a algunas muestras de harina y salvado, y las que menores valores presentan fueron muestras de hoja y tercerilla; en general presentando muy poca variación entre el conjunto de muestras.

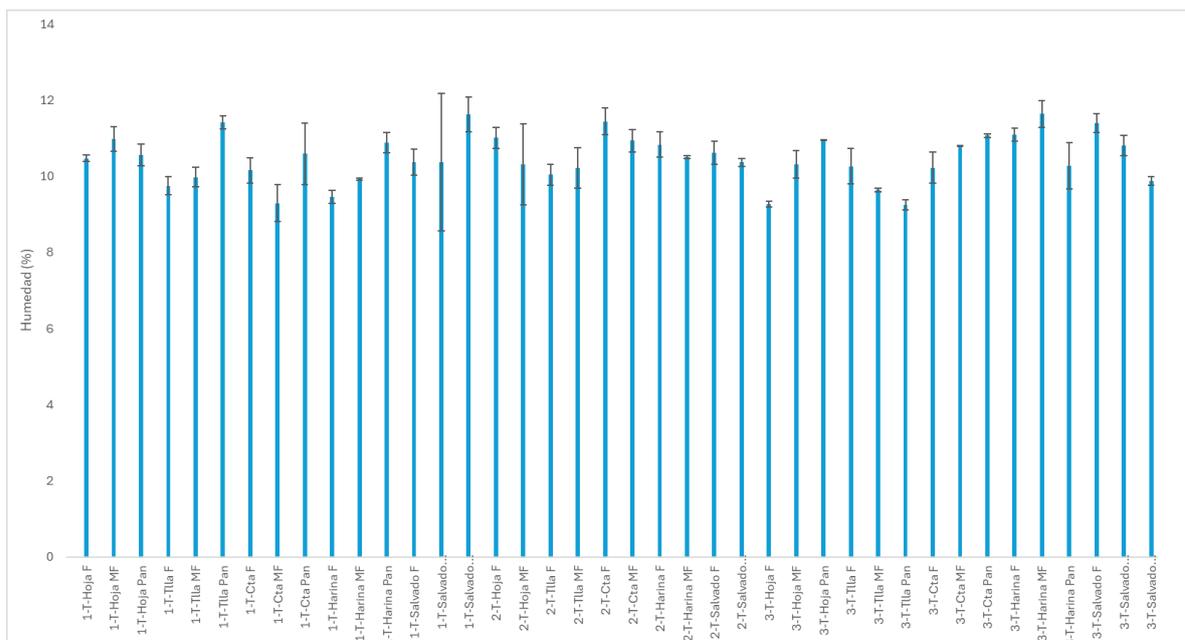


Figura 6: humedad en las muestras de trigo (T) procedentes de las empresas 1, 2 y 3. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; Tlla: tercerilla; Cta: cuarta; F: fuerza; MF: media fuerza; Pan: panificable.

Al igual que en el trigo, el centeno (Anexo II, Figuras 7 y 9) presentó valores de actividad de agua y humedad en los mismos rangos, observándose una tendencia similar entre las distintas fracciones, las muestras de harina presentaron mayor humedad, y las de hoja y tercerilla los valores más bajos para este parámetro. En comparación con estos resultados, en el caso de la cebada (Anexo II, Figuras 8 y 10) encontramos el mayor porcentaje de humedad en la muestra de tercerilla, y el menor valor en el caso de la hoja. El rango de valores en las muestras de cebada es el mismo que en los otros dos cereales.

4.2. Análisis de micotoxinas

En la Tabla 3 encontramos los resultados obtenidos para las diferentes toxinas, con los valores de estas expresadas en $\mu\text{g}/\text{kg}$. En la tabla no se han incluido los análisis estadísticos de aflatoxina B2 debido a la falta de datos. Esto se debe a que esta toxina sólo se detectó en una muestra de centeno, mientras que en el resto de los casos se podría afirmar que dicha toxina se encontraba por debajo del límite de detección, y por tanto, en el caso de estar presente, en valores seguros dentro de los límites legales. De hecho, en la muestra en la que se detectó la presencia de aflatoxina B2 no se superó el límite establecido de $4,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ para la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Reglamento 2023/915). En la tabla tampoco se ha incluido la cebada debido a que no se detectó toxina en ninguna de las fracciones estudiadas.

Tabla 3: Presencia de micotoxinas en trigo y centeno para las distintas fracciones estudiadas procedentes de distintas empresas harineras. En cebada no se detectaron micotoxinas.

	AFB1	OTA	ZEN	SUMATORIO
Cereal				
Trigo	n.d.	0,99 ± 1,63 ^a	6,15 ± 6,40 ^a	4,92 ± 6,13 ^b
Centeno	n.d.	0,85 ± 1,44 ^a	2,54 ± 0,0 ^a	0,72 ± 1,16 ^a
Empresa				
1	0,44 ± 0,47 ^a	0,76 ± 1,23 ^a	3,78 ± 1,79 ^a	1,89 ± 2,75 ^a
2	0,20 ± 0,09 ^a	1,32 ± 2,11 ^a	1,53 ± 0,99 ^a	1,30 ± 1,98 ^a
3	n.d.	0,63 ± 0,71 ^a	7,56 ± 7,36 ^a	7,61 ± 7,56 ^b
Fracción				
Hoja	0,29 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,06 ^{ab}	6,88 ± 7,72 ^a	4,05 ± 6,61 ^{ab}
Cuarta	0,65 ± 0,79 ^a	0,93 ± 1,71 ^{ab}	5,66 ± 6,15 ^a	3,51 ± 4,95 ^{ab}
Tercerilla	0,43 ± 0,23 ^a	1,92 ± 2,23 ^b	7,24 ± 6,59 ^a	5,61 ± 6,07 ^b
Harina	0,18 ± 0,11 ^a	0,25 ± 0,18 ^a	0,52 ± 0,18 ^a	0,36 ± 0,22 ^a
Salvado	0,22 ± 0,06 ^a	0,47 ± 0,43 ^a	7,00 ± 6,09 ^a	3,51 ± 5,58 ^{ab}

Valores medios ± desviación estándar. Las diferentes letras muestran diferencias significativas para $p \leq 0,05$. **n.d.:** análisis no determinado por falta de datos. **OTA:** Ocratoxina A; **AFB1:** Aflatoxina B1; **ZEN:** Zearalenona. **Sumatorio:** incluye la suma de OTA, AFB2, AFB1 y ZEN en cada muestra. Los valores medios se muestran en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En cuanto a la Aflatoxina B1 (AFB1), esta micotoxina sólo se detectó en 9 muestras del total. En concreto, solo en centeno, por lo que no se ha podido realizar un ANOVA de esta toxina por el tipo de cereal. Para el resto de los análisis estadísticos, no se encontraron diferencias significativas ni entre las empresas ni entre las distintas fracciones. Los valores medios más altos fueron de 0,65 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en ninguno de los casos superando el máximo establecido por el Reglamento 2023/915 de 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (2023). En ninguna de las muestras se supera tampoco el límite establecido para la suma de aflatoxinas de 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ya que, en ninguna muestra se detectaron ambas aflatoxinas B1 y B2 analizadas.

No obstante, para el caso de Ocratoxina A (OTA), OTA se detectó en 27 muestras de trigo y centeno, sin diferencias significativas entre estos dos cereales. Solamente en dos de los casos de trigo se superó el límite legal de 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que en el resto de los casos no se superó esa cantidad. No se encontraron diferencias significativas ni

en tipo de cereal ni en las distintas empresas, pero sí en las distintas fracciones del cereal. La fracción donde menos cantidad se encontró fue la harina con un valor medio de 0,25 µg/kg, y la fracción en la que más se encontró fue la tercerilla, con una media de 1,92 µg/kg. Es importante señalar que ninguno de los valores medios superó el límite establecido por Reglamento Europeo (2023/915).

Zearalenona (ZEN) fue la principal toxina encontrada, con los mayores valores medios, entre las cuatro toxinas analizadas. Del total de las muestras estudiadas, se detectó en 19 muestras por encima del límite de detección, una de ellas correspondiente a centeno y las demás correspondientes a trigo. Por ello, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al tipo de cereal ni entre empresas ni entre fracciones de cereal, oscilando sus valores medios desde 0,52 µg/kg en la harina hasta 7,24 µg/kg en la tercerilla con una desviación estándar de 6,69. El límite legal máximo establecido para ZEN es de 75 µg/kg, valor que en ningún caso se excedió (Reglamento 2023/915).

El conjunto de la suma de todas las toxinas detectadas en cada muestra también se analizó, y se encontraron diferencias significativas en todos los casos. La media del sumatorio de las toxinas fue superior en el caso del trigo con 4,92 µg/kg en comparación con el centeno con 0,72 µg/kg. En el análisis de las empresas se encontraron diferencias entre las empresas 1 y 2 y la 3, con una media de 1,3-1,8 y 7,61 µg/kg, respectivamente. En cuanto a las fracciones se encontró la menor cantidad de toxinas en harina con un valor medio de 0,36 µg/kg, seguido de salvado, cuarta y hoja con valores medios entre 3,50 - 4,05 µg/kg, y 5,61 µg/kg en la fracción tercerilla.

En la Figura 7 se observan las muestras de trigo en las que se detectó presencia de las toxinas OTA y ZEN. La muestra que más cantidad de micotoxinas presentó fue una muestra de tercerilla de fuerza, no correspondiéndose con la muestra que más cantidad de mohos y levaduras presentaba. Aunque mayor cantidad de mohos en una muestra, mayor probabilidad de que esa muestra presente toxinas.

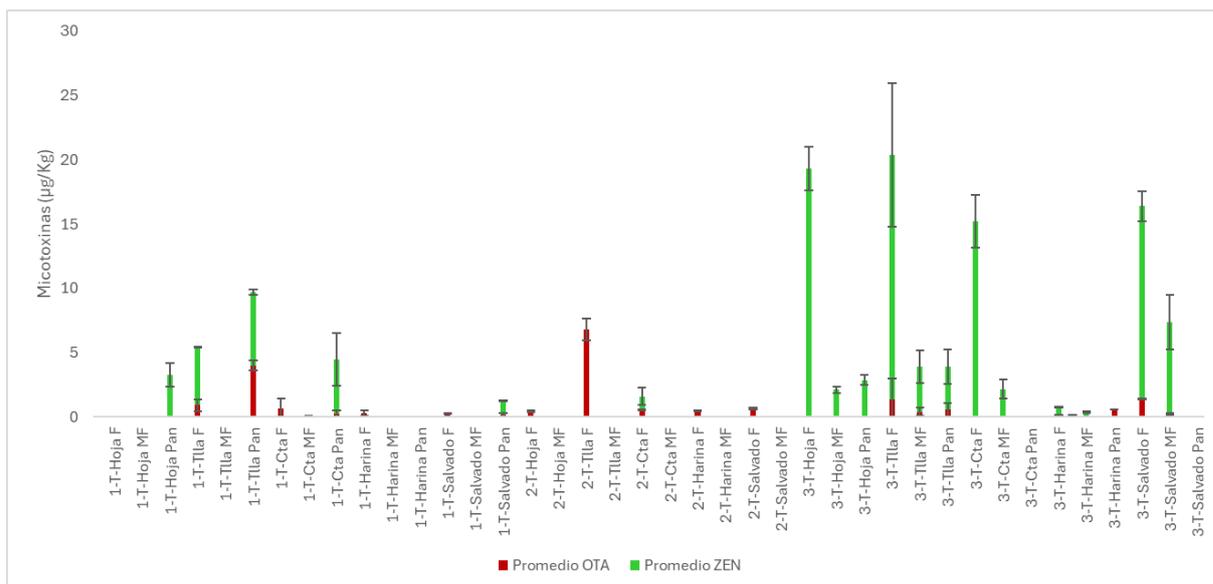


Figura 7: Presencia de las toxinas Ocratoxina A (OTA, granate) y Zearalenona (ZEN, verde) en muestras de trigo (T) procedentes de las empresas 1, 2 y 3. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; Tlla: tercerilla; Cta: cuarta; F: fuerza; MF: media fuerza; Pan: panificable.

En el caso del centeno (Anexo II, Figura 11) se detectaron las cuatro micotoxinas, pero AFB2 y ZEN solamente en una muestra cada una, 2-C-Hoja 2 y 2-C-Salvado 1 respectivamente. Por lo general, en centeno se detectaron OTA y AFB1 principalmente. Los valores para el sumatorio de las toxinas en centeno fueron mucho más bajos que en el caso del trigo, con un valor máximo de 5,60 µg/kg, cuando en el caso del trigo el valor máximo fue de 20 µg/kg. Esto se debe a que en el caso del trigo se detectó ZEN en muchas muestras, cuyos valores de detección fueron los más altos de todas las muestras, aunque como se dijo previamente, en ningún caso se supera el máximo legal. La diferencia en las toxinas encontradas en trigo y centeno puede deberse a que cada tipo de cereal se cultiva en distintas zonas del mundo, con climatologías diferentes, lo que puede provocar que se desarrollen mejor unas especies de mohos toxicogénicos (formadores de toxinas) que otros (Kosicki et al., 2020). Por otro lado, en las muestras de cebada no se detectó ninguna toxina, posiblemente debido a que se encuentren por debajo del límite de detección del equipo.

Distintas investigaciones han encontrado, al igual que este estudio, que en porcentajes cercanos a la mitad de las muestras que estaban contaminadas por micotoxinas y, que contenían al menos dos de ellas de forma simultánea (H. Zhou et al., 2022). También se encontró que las harinas tienen menos contaminación por micotoxinas que las fracciones que se obtienen del exterior del grano y que las harinas integrales o que incluyen otras fracciones aparte del endospermo (Edwards et al., 2011;

Van der Fels-Klerx et al., 2021; H. Zhou et al., 2022). Estudios hechos en otros cereales como arroz, también encontraron mayor cantidad de aflatoxinas en los salvados (Trucksess et al., 2011). Por otra parte, diversos estudios afirman que cuando disminuye el tamaño de partícula del endospermo, el nivel de micotoxinas aumenta (Burger et al., 2013). Por lo general, no se excedieron los límites legales de micotoxinas establecidos por la Unión Europea, al igual que las analizadas en este estudio, excepto en algunas muestras en las que se excedieron los límites establecidos para comidas infantiles, que son más estrictos (Kosicki et al., 2020; H. Zhou et al., 2022). En otros estudios no se encontró contaminación por micotoxinas en ninguna de las muestras (Cardoso et al., 2019b). En el estudio de Cardoso et al., (2019), se analizaron las micotoxinas a través de columnas de inmunoafinidad, cuyos los límites de detección fueron 1,2, 0,4 y 0,7 µg/kg para AFB1, AFB2 y OTA, respectivamente, mientras que en este trabajo se se usó la LC-MS/MS estudiar las micotoxinas y se alcanzaron límites de detección al menos quince veces menos que el mencionado trabajo.

Es importante señalar, que a pesar de que las micotoxinas se encuentran dentro de los límites legales, la presencia de micotoxinas podría ser mayor, ya que estos metabolitos se modifican o pueden ser liberados por hidrólisis microbiana durante los procesos de fermentación (Rychlik et al. 2014). Las micotoxinas modificadas, son moléculas derivadas de las micotoxinas, sin embargo, su estructura química ha sido modificada en mayor o menor medida y esas modificaciones no son detectadas por los métodos analíticos habituales, suponiendo un riesgo para la salud de los consumidores (Tan et al., 2023). Además de esto, las toxinas modificadas podrían tener toxicidad similar o incluso más alta que las toxinas no modificadas al ser hidrolizadas en el tracto digestivo (Zhang et al., 2020).

La modificación de toxinas incluye distintas reacciones como oxidación, reducción, deshidrogenación, etc. En los cereales, estas pueden deberse a mecanismos de defensa de las plantas infectadas por microorganismos o por reacciones enzimáticas o de defensa de los propios microorganismos, como mohos y bacterias; e incluso por competencia entre mohos toxicogénicos y los que no lo son (Tan et al., 2023). Las formas modificadas de las toxinas también podrían formarse durante el proceso productivo de alimentos por tratamientos enzimáticos o térmicos, que sumando a las que se han podido formar en la etapa del cultivo, nos puede llevar a subestimar la cantidad real de toxinas que hay presente en nuestra matriz a analizar (Khan, 2024). Esto se podría estudiar en investigaciones futuras, ya que, en este trabajo no se ha tenido en cuenta.

4.3. Porcentaje recuperación

Los resultados del porcentaje de recuperación de las toxinas en las diferentes matrices donde se realizó la calibración del equipo se calcularon siguiendo la fórmula indicada en el Reglamento 2023/2782 (CE, 2023). Se ha encontrado en todos los casos porcentaje de recuperación por encima del 70%, lo que indica una buena recuperación de las toxinas analizadas, siendo representativos los resultados obtenidos en este estudio para los salvados y harinas analizados.

5. CONCLUSIONES

Las micotoxinas son componentes naturales producidos por distintas especies de mohos, entrando en la cadena alimentaria a través de la contaminación de los cultivos, tanto en el campo, como en las etapas posteriores a la cosecha (EFSA, 2024). Estos compuestos suponen un gran riesgo para la salud humana y animal, por lo que son objeto constante de investigación.

En este estudio se llevaron a cabo distintos análisis fisicoquímicos y microbiológicos para intentar establecer una relación con la presencia de micotoxinas. Se encontró que los valores de pH, actividad de agua y humedad, pueden permitir el crecimiento de microorganismos en las diversas fracciones obtenidas de la molienda del trigo.

Las muestras que más contaminación por flora aerobia mesófila, mohos y levaduras presentaron, fueron las correspondientes a las fracciones procedentes de las capas externas del cereal, y las menos contaminadas fueron las harinas, procedentes del endospermo. Del mismo modo, las muestras con más cantidad de micotoxinas fueron también las procedentes de capas externas del cereal, y las harinas las que contenían menos, y en cuanto al tipo de cereal, las muestras de trigo fueron las que presentaban mayor cantidad de toxinas, con presencia de OTA y ZEN.

En cuanto a las muestras de trigo, también se encontró que las muestras menos contaminadas por microorganismos y con menor cantidad de micotoxinas fueron las correspondientes a las muestras de fuerza, al contrario que las de media fuerza y panificables. Se requieren futuros estudios para comprobar esta tendencia e investigar más en profundidad sobre las formas modificadas de las toxinas.

6. BIBLIOGRAFÍA

AESAN. (2023a). *ZEARALENONA Y SUS METABOLITOS*.

AESAN. (2023b, May 25). *OCRATOXINA A*.

https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/ge stion_riesgos/Ficha_OT A_2023.pdf

- AESAN. (2023c, December 15). *AFLATOXINAS*.
https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Ficha_Aflatoxinas.pdf
- AESAN. (2024). *Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*.
https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm
- Alegbeleye, O., Odeyemi, O. A., Strateva, M., & Stratev, D. (2022). Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. *Applied Food Research*, 2(1), 100122.
<https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100122>
- Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D., & Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1–2), 137–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00507-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00507-X)
- Burger, H. M., Shephard, G. S., Louw, W., Rheeder, J. P., & Gelderblom, W. C. A. (2013). The mycotoxin distribution in maize milling fractions under experimental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 165(1), 57–64.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.03.028>
- Cardona Serrate, F. (2019). *Actividad del agua en alimentos: concepto, medida y aplicaciones Apellidos, nombre*.
- Cardoso, R. V. C., Fernandes, Â., Heleno, S. A., Rodrigues, P., González-Paramás, A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019a). Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chemistry*, 280, 123–129.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.12.063>
- Cardoso, R. V. C., Fernandes, Â., Heleno, S. A., Rodrigues, P., González-Paramás, A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019b). Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chemistry*, 280, 123–129.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.12.063>
- Caro, I., Portales, S., & Gómez, M. (2023). Microbial characterization of discarded breads. *LWT*, 173, 114291. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.114291>
- Casaubon-Garcín, P., Lamshing-Salinas, P., Isoard-Acosta, F., Casaubon Lemen-Meyer, S., Delgado-Franco, D., & Bertha Pérez-Lizaur, A. (2018). *pH de los alimentos: ¿una herramienta para el manejo de los pacientes con refl ujo gastroesofágico?* 85(3). www.medigraphic.com/rmp
- Código Alimentario Español (1967).
- Edwards, S. G., Dickin, E. T., MacDonald, S., Buttler, D., Hazel, C. M., Patel, S., & Scudamore, K. A. (2011). Distribution of Fusarium mycotoxins in UK wheat mill fractions. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28(12), 1694–1704.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2011.605770>
- EFSA. (2024). *Mycotoxins*. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins>
- Eglezos, S. (2010). Microbiological Quality of Wheat Grain and Flour from Two Mills in Queensland, Australia. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1533–1537.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.8.1533>
- Ennadir, J., Hassikou, R., Ohmani, F., Hammamouchi, J., Bouazza, F., Qasmaoui, A., Mennane, Z., Touhami, A. O., & Khedid, R. C. K. (2012). [Microbiological quality of wheat flour consumed in Morocco]. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(2), 145–150. <https://doi.org/10.1139/W11-139>

- EUR-Lex - 32006H0583 - ES - EUR-Lex (2006). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32006H0583&qid=1720111709215>
- FAO. (n.d.). *Cereales y granos | Inpho | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Retrieved August 28, 2024, from <https://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es/>
- FAO. (2024, July 5). *FAO Cereal Supply and Demand Brief | Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en>
- FEDNA. (2019). *Salvado de trigo FEDNA*. https://fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/salvado-y-tercerillas-de-trigo-23-almid%C3%B3n-actualizado-nov-2011
- Ferreras, R. (2009). *ANÁLISIS REOLÓGICO DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE HARINA OBTENIDAS EN LA MOLIENDA DEL GRANO DE TRIGO*.
- García Olivares, J. A. (2019). *IMPORTANCIA DE LAS MICOTOXINAS EN LA INDUSTRIA PECUARIA*.
- Gómez, M., Casado, A., & Caro, I. (2023). Assessing the Effect of Flour (White or Whole-Grain) and Process (Direct or Par-Baked) on the Mycotoxin Content of Bread in Spain. *Foods 2023, Vol. 12, Page 4240, 12(23)*, 4240. <https://doi.org/10.3390/FOODS12234240>
- Gonzalez Pereyra, M. L., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2011). Mycobiota and mycotoxins in malted barley and brewer's spent grain from Argentinean breweries. *Letters in Applied Microbiology, 53(6)*, 649–655. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2011.03157.X>
- González Rodríguez, C. (2018). *Análisis de la calidad microbiológica de los alimentos procedentes de cadenas de comida rápida*.
- González-Jartín, J. M., Rodríguez-Cañás, I., Alfonso, A., Sainz, M. J., Vieytes, M. R., Gomes, A., Ramos, I., & Botana, L. M. (2021). Multianalyte method for the determination of regulated, emerging and modified mycotoxins in milk: QuEChERS extraction followed by UHPLC–MS/MS analysis. *Food Chemistry, 356*, 129647. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129647>
- Hervert-Hernández, D. (2022). El papel de los cereales en la nutrición y en la salud en el marco de una alimentación sostenible. *Nutrición Hospitalaria, 39(SPE3)*, 52–55. <https://doi.org/10.20960/NH.04312>
- Ismail, A., Naeem, I., Gong, Y. Y., Routledge, M. N., Akhtar, S., Riaz, M., Ramalho, L. N. Z., de Oliveira, C. A. F., & Ismail, Z. (2021). Early life exposure to dietary aflatoxins, health impact and control perspectives: A review. *Trends in Food Science & Technology, 112*, 212–224. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.04.002>
- Khan, R. (2024). Mycotoxins in food: Occurrence, health implications, and control strategies-A comprehensive review. *Toxicon, 248*, 108038. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2024.108038>
- Kosicki, R., Twaruzek, M., Dopierała, P., Rudzki, B., & Grajewski, J. (2020). Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). *Toxins, 12(6)*. <https://doi.org/10.3390/TOXINS12060423>
- Kovač, M., Nevistić, A., Kovač, T., Babić, J., Šarić, A., Miličević, B., Panjičko, M., & Šarkanj, B. (2022). Development and Validation of an UHPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of 11 EU-Regulated Mycotoxins in Selected

Cereals. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, Page 665, 8(7), 665.
<https://doi.org/10.3390/JOF8070665>

- MAPA. (2015). *RECOMENDACIONES PARA LA PREVENCIÓN, EL CONTROL Y LA VIGILANCIA DE LAS MICOTOXINAS EN LAS FÁBRICAS DE HARINAS Y SÉMOLAS*. <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
- Naeem, I., Ismail, A., Riaz, M., Aziz, M., Akram, K., Shahzad, M. A., Ameen, M., Ali, S., & Oliveira, C. A. F. (2024). Aflatoxins in the rice production chain: A review on prevalence, detection, and decontamination strategies. *Food Research International*, 188, 114441. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2024.114441>
- N'zi, F. A. J. A., Kouakou-Kouamé, C. A., N'guessan, F. K., Poss, C., Teyssier, C., Durand, N., & Montet, D. (2023). Occurrence of mycotoxins and microbial communities in artisanal infant flours marketed in Côte d'Ivoire. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(5), 1–16. <https://doi.org/10.1007/S11274-023-03577-5/TABLES/6>
- Pereira, C. S., Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2019). Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11050290>
- Rai, A., Das, M., & Tripathi, A. (2020). Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2710–2729. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
- Reglamento - 2023/915 - ES - EUR-Lex (2023). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915&qid=1720111587130>
- Reglamento - UE - 2024/1022 - ES - EUR-Lex (2024). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32024R1022&qid=1720111646519>
- Reglamento de Ejecución (UE) 2023/2782 de La Comisión, de 14 de Diciembre de 2023, Por El Que Se Establecen Los Métodos de Muestreo y Análisis Para El Control Del Contenido de Micotoxinas En Los Alimentos y Se Deroga El Reglamento (CE) No 401/2006. (2023). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2023-81817>
- Rehagel, C. A. Ö. U. E. (2022). *Microbiological and mycotoxicological analyses of processed cereal-based complementary foods for infants and young children from the German market*.
- Rico-Munoz, E., Samson, R. A., & Houbraken, J. (2019). Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiology*, 81, 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.03.016>
- Román, M. G. (2009). *Tecnología de cereales*.
- Romero-Sánchez, I., Ramírez-García, L., Gracia-Lor, E., & Madrid-Albarrán, Y. (2022a). 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>
- Romero-Sánchez, I., Ramírez-García, L., Gracia-Lor, E., & Madrid-Albarrán, Y. (2022b). 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>
- Rychlik, M., Humpf, H. U., Marko, D., Dänicke, S., Mally, A., Berthiller, F., Klaffke, H., & Lorenz, N. (2014). Proposal of a comprehensive definition of modified and other

- forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research*, 30(4), 197–205. <https://doi.org/10.1007/S12550-014-0203-5>
- SCIEX. (2021). *Serie de instrumentos 6500*.
- Sifre, M. D., Peraire, M., Simó, D., Segura, A., Simó, P., La, P. T., & Pág, H. (2019). *LA HARINA - UNIVERSITAT PER A MAJORS SEU DEL NORD-SANT MATEU*.
- 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>
- Tan, H., Zhou, H., Guo, T., Zhou, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., & Ma, L. (2023). Recent advances on formation, transformation, occurrence, and analytical strategy of modified mycotoxins in cereals and their products. *Food Chemistry*, 405, 134752. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134752>
- Tian, M., Feng, Y., He, X., Zhang, D., Wang, W., & Liu, D. (2022). Mycotoxins in livestock feed in China - Current status and future challenges. *Toxicon*, 214, 112–120. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2022.05.041>
- Trucksess, M. W., Abbas, H. K., Weaver, C. M., & Shier, W. T. (2011). Distribution of aflatoxins in shelling and milling fractions of naturally contaminated rice. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28(8), 1076–1082. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.576441>
- Van der Fels-Klerx, H. J., Focker, M., De Rijk, T., & Liu, C. (2021). Mycotoxins in wheat cultivated in the Netherlands: results from eight years of field surveys. *Mycotoxin Research*, 37(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/S12550-021-00427-X>
- 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>
- Zamora, R., & Rodiles, J. O. (2022). *La molienda y harinas de cereales*. <https://tecnoagro.com.mx/no.-158/la-molienda-y-harinas-de-cereales>
- Zhang, Y. yue, Zhao, M. juan, Liu, C. yao, Ma, K., Liu, T. yu, Chen, F., Wu, L. na, Hu, D. jun, & Lv, G. ping. (2023). Comparison of two commercial methods with a UHPLC–MS/MS method for the determination of multiple mycotoxins in cereals. *Food Chemistry*, 406, 135056. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.135056>
- Zhang, Z., Nie, D., Fan, K., Yang, J., Guo, W., Meng, J., Zhao, Z., & Han, Z. (2020). A systematic review of plant-conjugated masked mycotoxins: Occurrence, toxicology, and metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1523–1537. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1578944>
- Zhou, H., Xu, A., Liu, M., Yan, Z., Qin, L., Liu, H., Wu, A., & Liu, N. (2022). Mycotoxins in Wheat Flours Marketed in Shanghai, China: Occurrence and Dietary Risk Assessment. *Toxins*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14110748>
- Zhou, S., Zhu, X., Song, S., Sun, M., Kuang, H., Xu, C., & Guo, L. (2024). Rapid and simultaneous detection of five mycotoxins and their analogs with a gold

nanoparticle-based multiplex immuno-strip sensor. *Food Microbiology*, 121, 104510. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2024.104510>

ANEXOS

Anexo I

Cromatogramas de micotoxinas

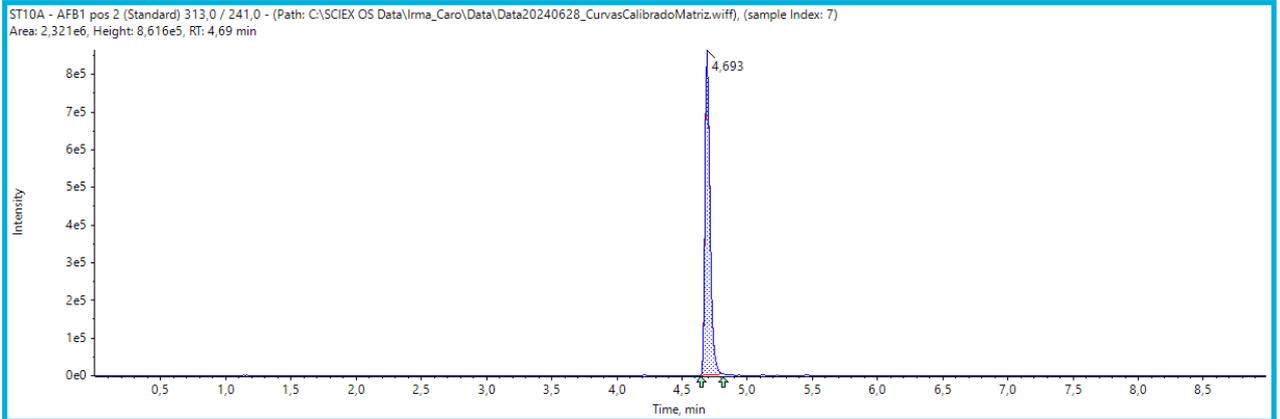


Figura 1: Cromatograma con tiempo de retención de AFB1.

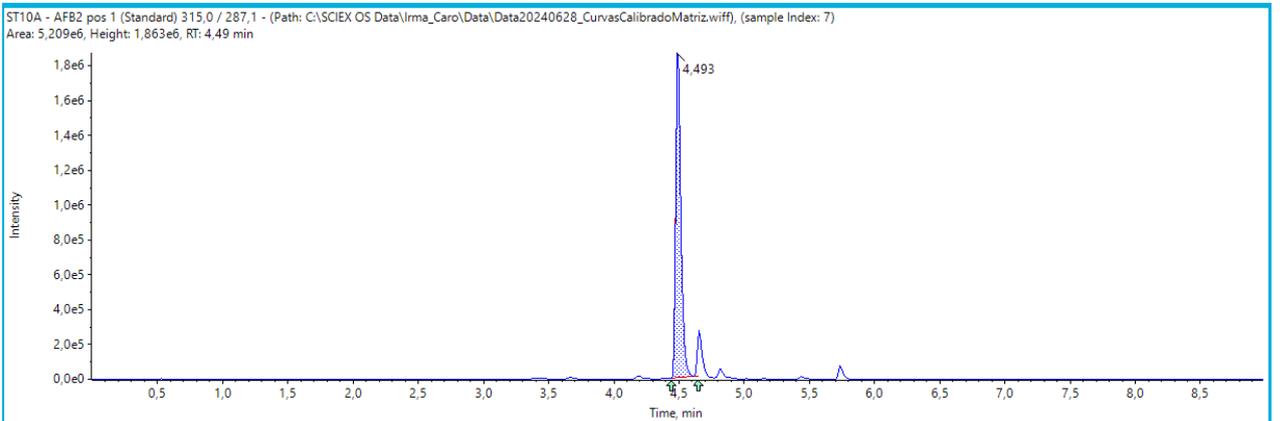


Figura 2: Cromatograma con tiempo de retención de AFB2.

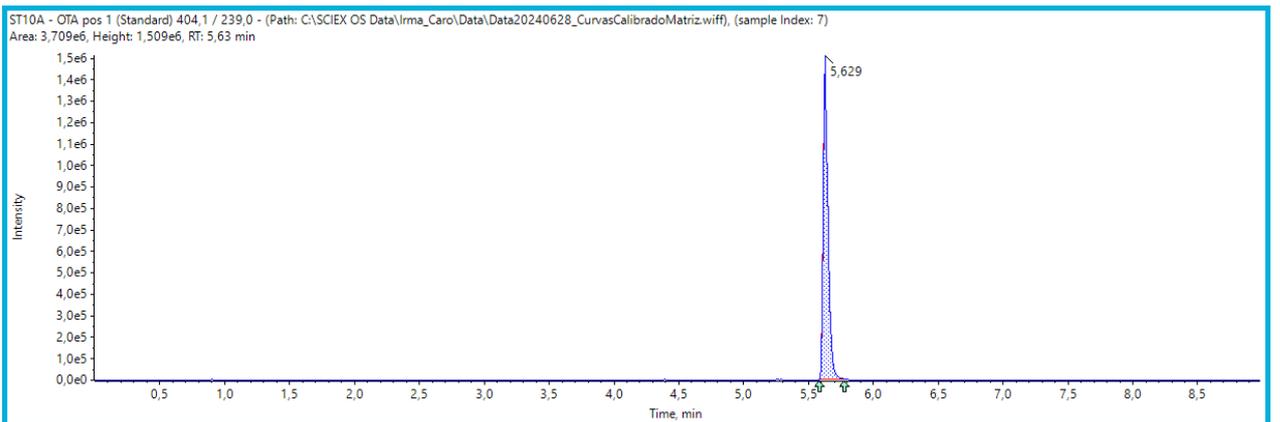


Figura 3: Cromatograma con tiempo de retención de OTA.

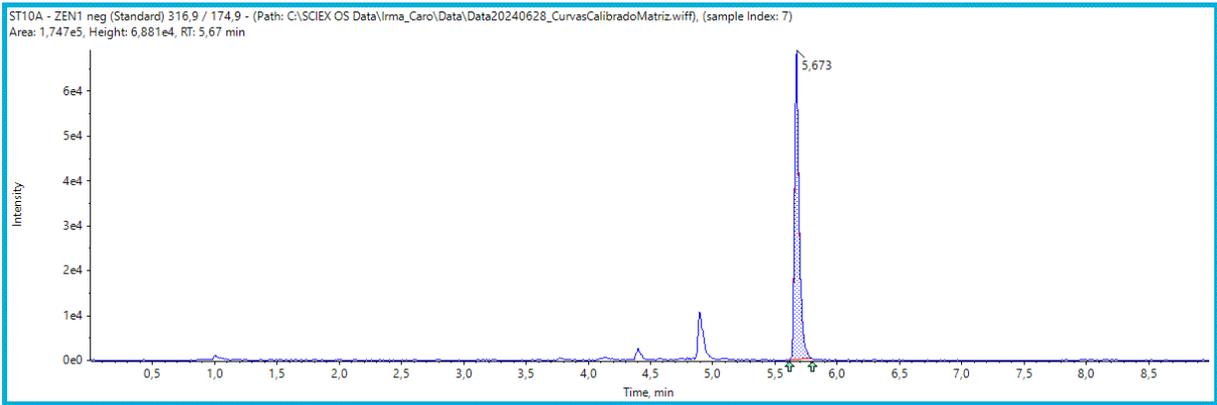


Figura 4: Cromatograma con tiempo de retención de ZEN.

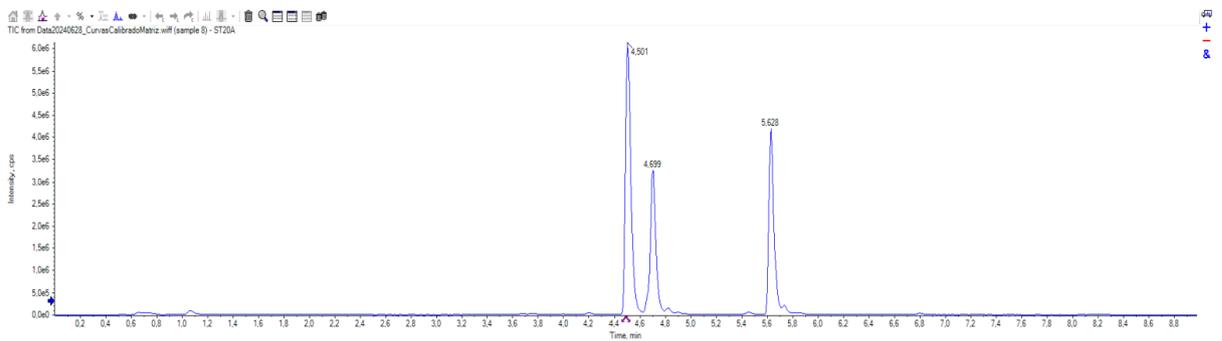


Figura 5: Cromatograma de muestra de salvado de trigo.

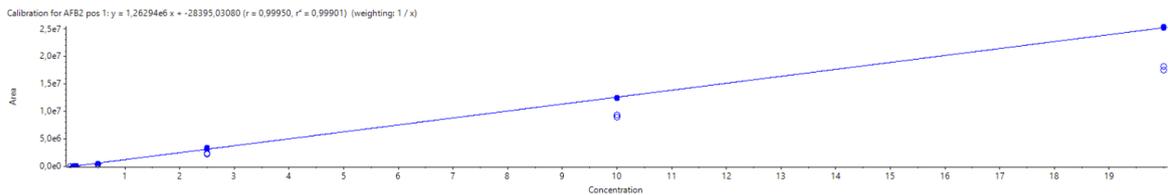


Figura 6: Recta de calibración AFB2 en matriz salvado de centeno los puntos no seleccionados pertenecen a calibración en la matriz harina de trigo).

Anexo II

Resultados muestras centeno y cebada

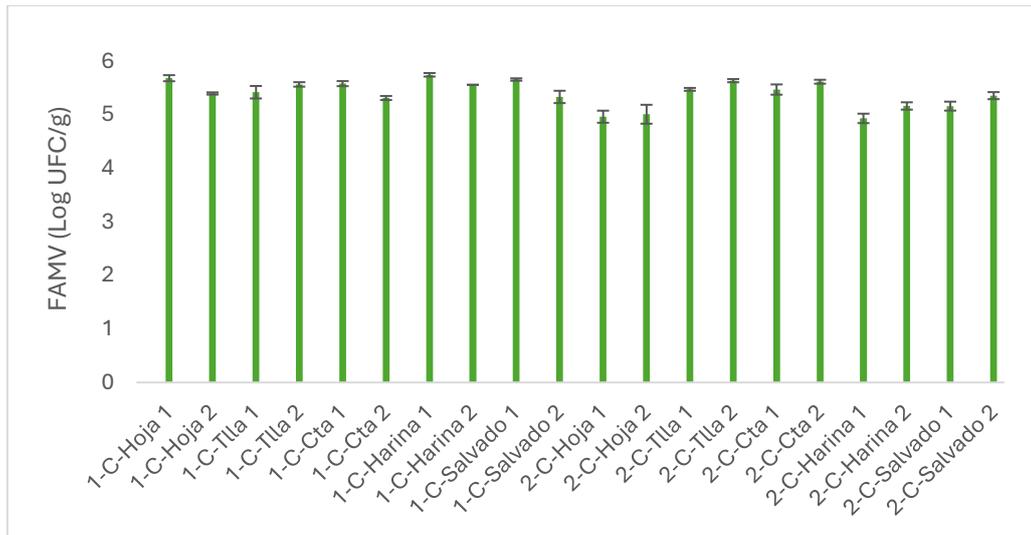


Figura 1: Flora Aerobia Mesófila Viable (FAMV) expresado en Log UFC/g presente en las muestras de centeno (C) procedentes de las empresas 1 y 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

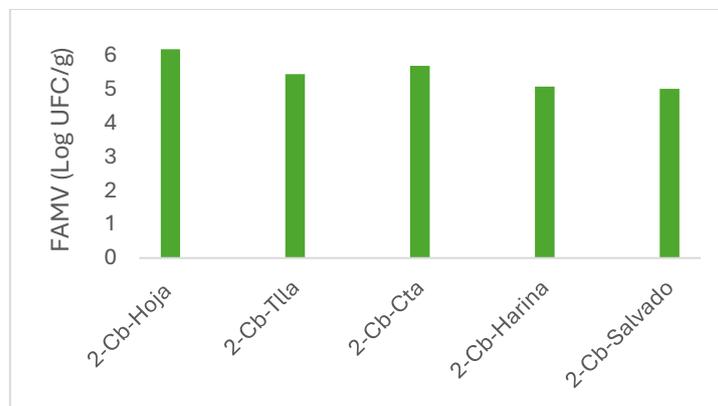


Figura 2: Flora Aerobia Mesófila Viable (FAMV) expresado en Log UFC/g presente en las muestras de cebada (Cb) procedentes de la empresa 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

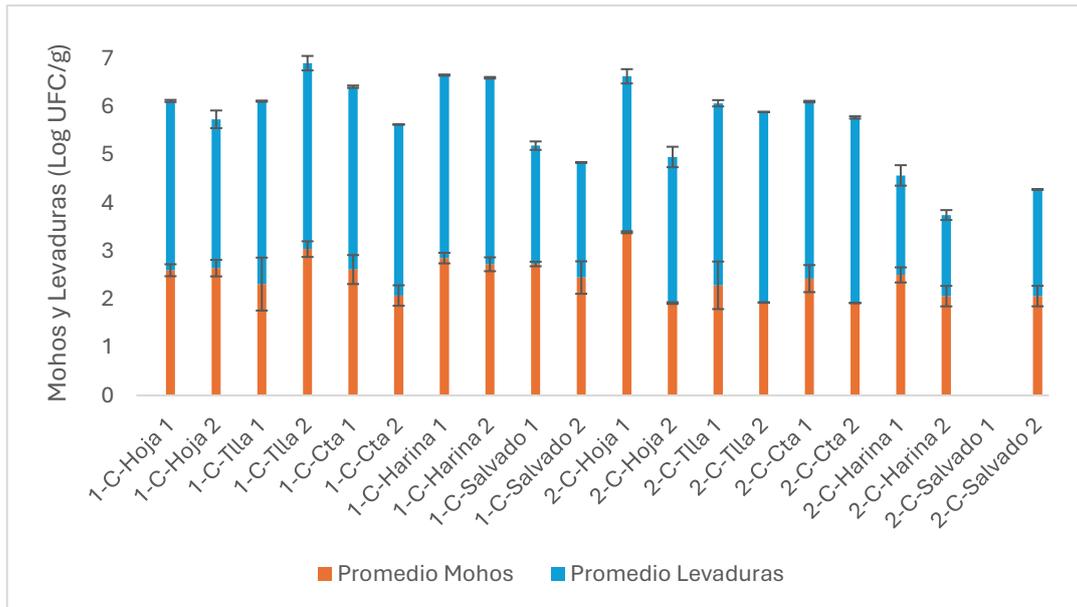


Figura 3: Mohos (naranja) y levaduras (azul) expresado en Log UFC/g presente en las muestras de centeno (C) procedentes de las empresas 1 y 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tilla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

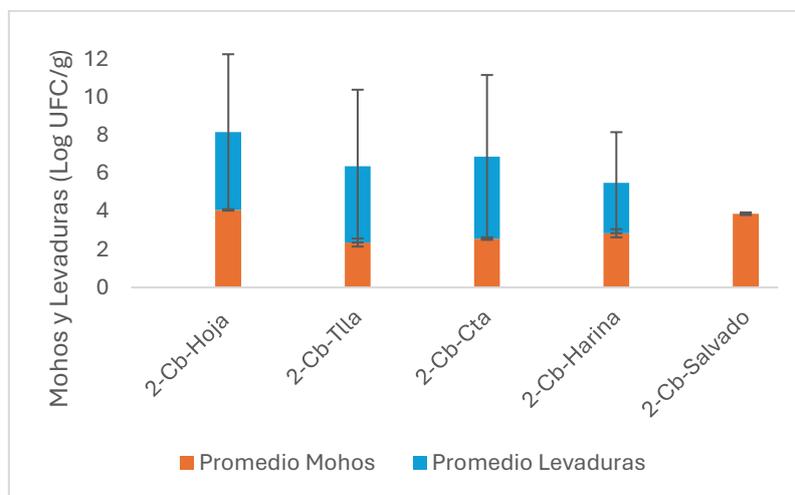


Figura 4: Mohos (naranja) y levaduras (azul) expresado en Log UFC/g presente en las muestras de cebada (Cb) procedentes de la empresa 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tilla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

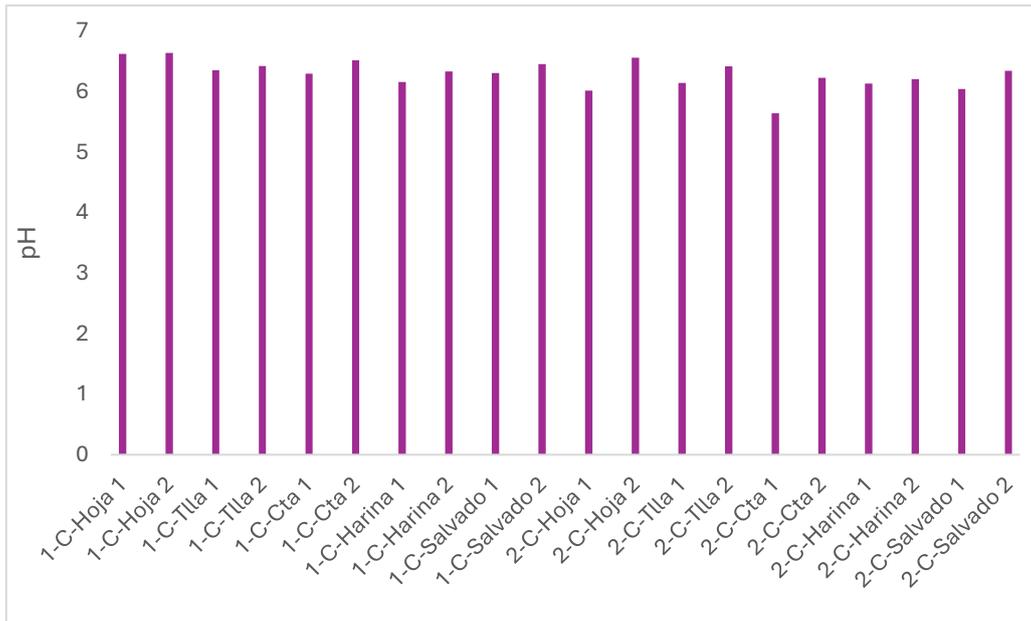


Figura 5: valores de pH de las muestras de centeno (C) procedentes de las empresas 1 y 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

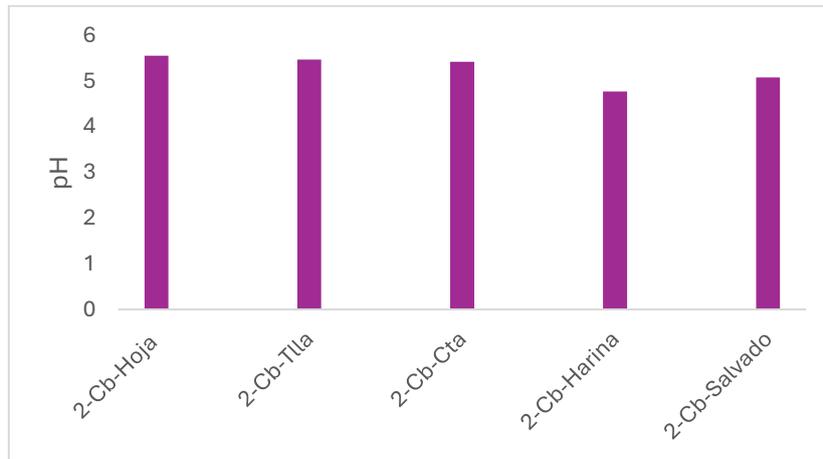


Figura 6: valores de pH de las muestras de cebada (Cb) procedentes de la empresa 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

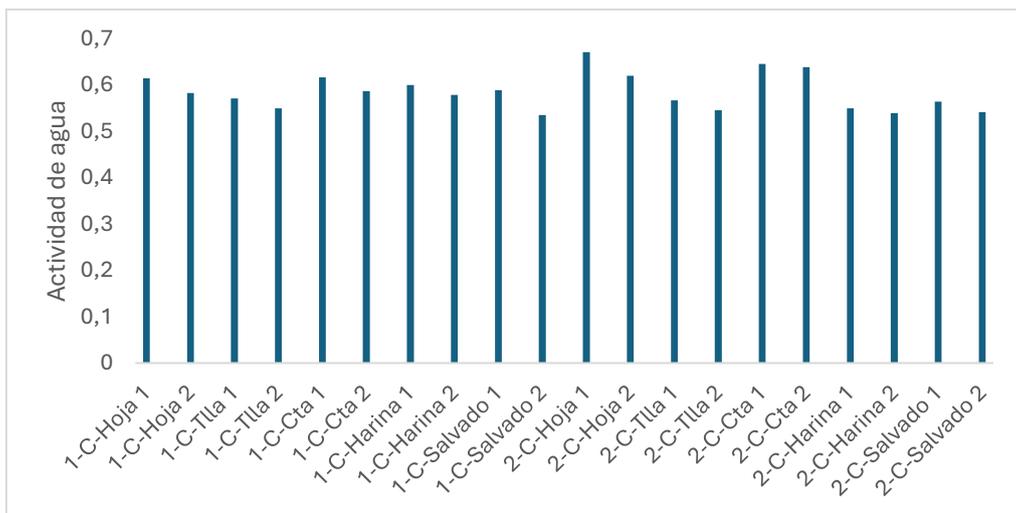


Figura 7: valores de actividad de agua de las muestras de centeno (C) procedentes de las empresas 1 y 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

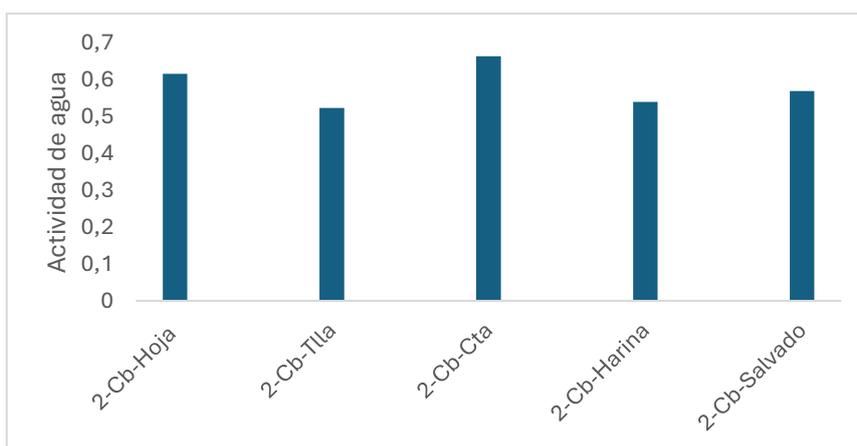


Figura 8: valores de actividad de agua de las muestras de cebada (Cb) procedentes de la empresa 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

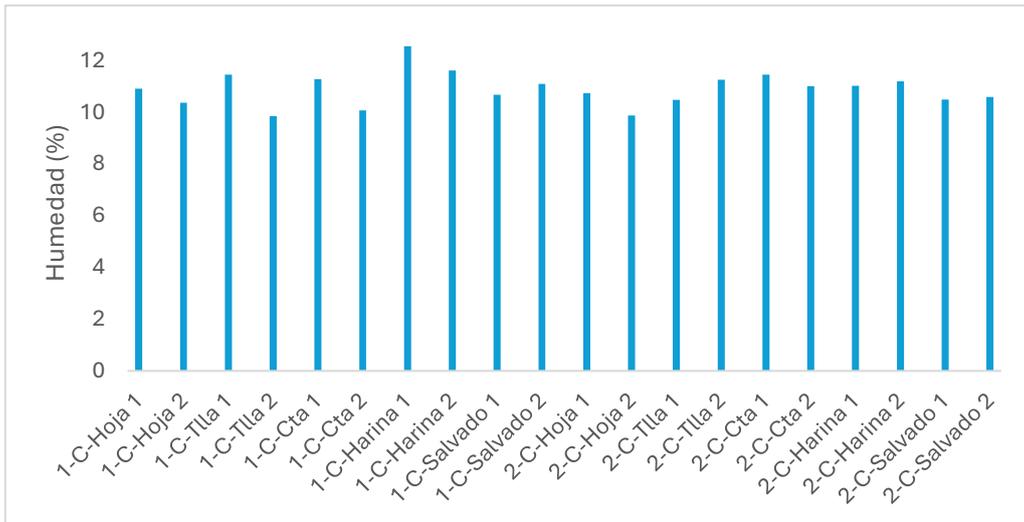


Figura 9: valores de humedad expresado en % de las muestras de centeno (C) procedentes de las empresas 1 y 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

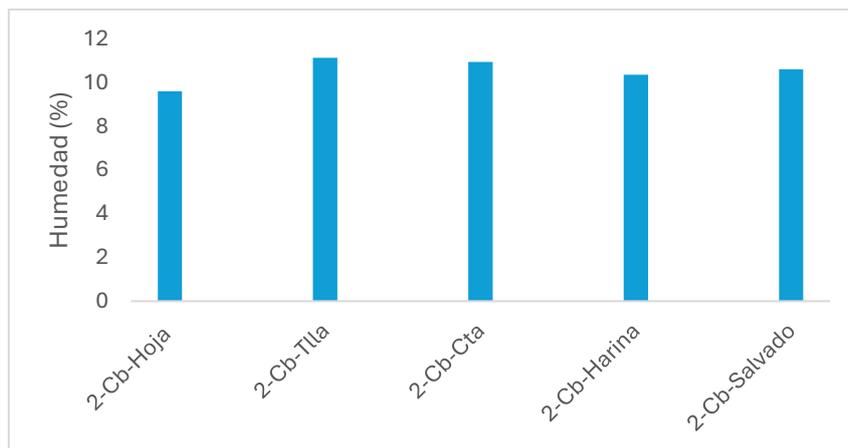


Figura 10: valores de humedad expresada en % de las muestras de cebada (Cb) procedentes de la empresa 2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

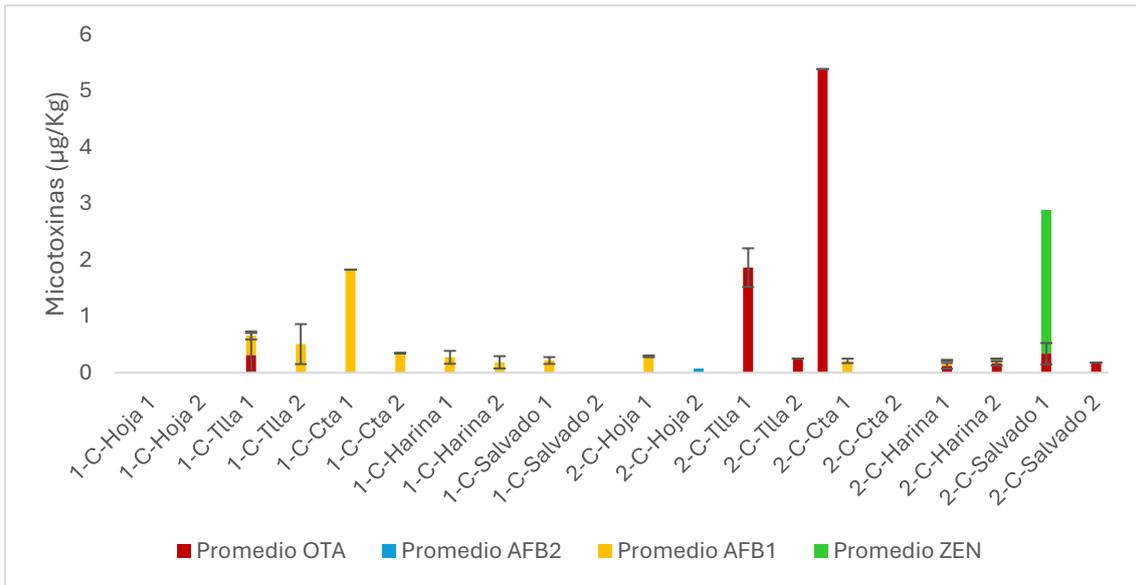


Figura 11: micotoxinas detectadas en las muestras de centeno (C) expresadas en µg/kg procedentes de las empresas 1 y 2. **OTA:** ocratoxina A; **ZEN:** zearalenona; **AFB1:** aflatoxina B1; **AFB2:** aflatoxina B2. Las fracciones estudiadas corresponden al salvado completo, Harina, Hoja; **Tlla:** tercerilla; **Cta:** cuarta; **F:** fuerza; **MF:** media fuerza; **Pan:** panificable.

Anexo III

Análisis microbiológico

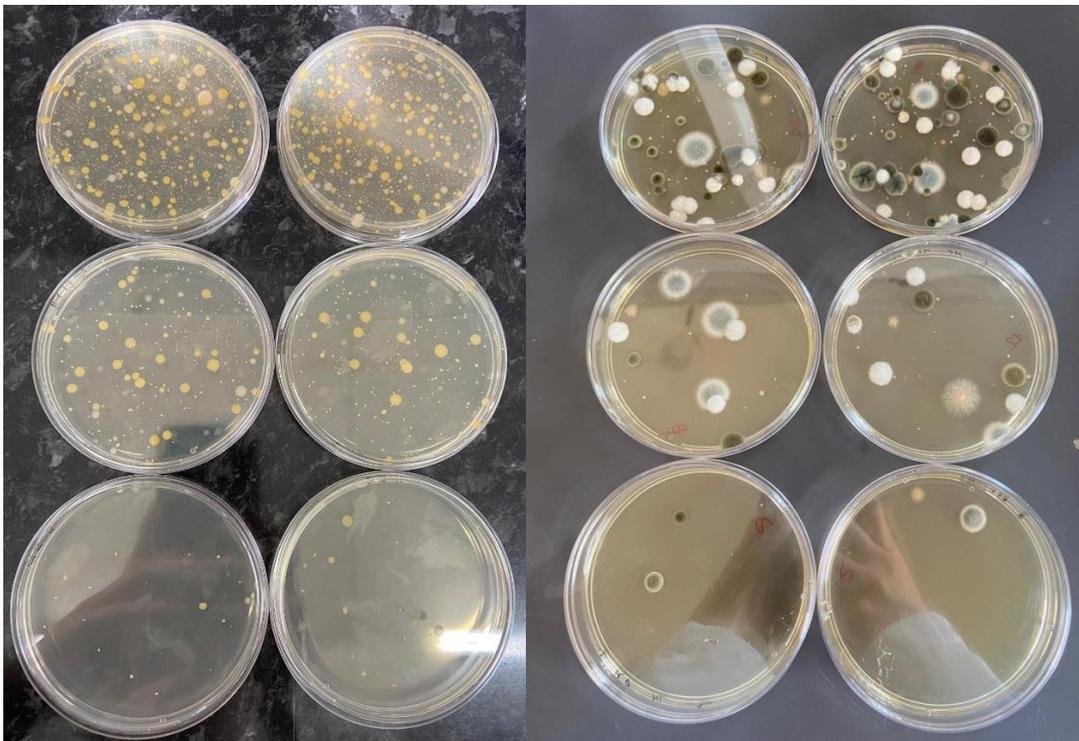


Figura 1: Placas de cultivo con Flora Aerobia Mesófila Viable (izquierda) en medio PCA (Plate Count Agar) y mohos y levaduras (derecha) en medio Agar Base Dichloran-Glycerol (DG18).