



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **Estado actual de la problemática y métodos de análisis para la determinación de ocratoxina A en alimentos.**

**Alumna: Ana María Munuera Moreno**

**Julio, 2018**



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*



Facultad de  
**Ciencias Experimentales**

Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

# **Estado actual de la problemática y métodos de análisis para la determinación de ocratoxina A en alimentos.**

**Alumna: Ana María Munuera Moreno**

**Julio, 2018**

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN / ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Micotoxinas.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Origen.....</i>	2
2.1.2. <i>Tipos.....</i>	5
2.1.3. <i>Toxicidad.....</i>	6
<b>2.2. Ocratoxina A.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. <i>Origen.....</i>	9
2.2.2. <i>Toxicidad.....</i>	10
2.2.3. <i>Legislación.....</i>	11
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>4. MÉTODOS PARA LA DISMINUCIÓN Y ANÁLISIS DE OCRATOXINA</b>	
<b>A EN ALIMENTOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Métodos para la disminución de ocratoxina A.....</b>	<b>14</b>
4.1.1. <i>Prevención de OTA.....</i>	14
4.1.2. <i>Métodos de reducción de OTA.....</i>	15
<b>4.2. Métodos de análisis de ocratoxina A.....</b>	<b>18</b>
4.2.1. <i>Técnicas de extracción y purificación de ocratoxina A en</i> <i>vino y café.....</i>	18
4.2.2. <i>Técnicas de análisis de ocratoxina A en vino y café.....</i>	22
<b>5. DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN VINO Y CAFÉ.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1. Determinación de ocratoxina A en vino.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2. Determinación de ocratoxina A en café.....</b>	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

## 1. RESUMEN / ABSTRACT

Las micotoxinas son metabolitos secundarios que derivan de los hongos producidos generalmente por las especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Dentro de este grupo de micotoxinas está una de las más importantes debido a su gran toxicidad para la salud humana y animal, la ocratoxina A, producida por el género *Aspergillus Ochraceus*. En este estudio se ha hecho una revisión de la toxicidad de las micotoxinas, especialmente de la ocratoxina A, micotoxina que se puede encontrar en el vino y el café. Se describen las distintas técnicas empleadas para la extracción y las técnicas de detección para la cuantificación de OTA. La técnica de extracción más utilizada, debido a su sencillez y rapidez, es la utilización de columnas de inmunoafinidad, y la técnica de determinación cuantitativa para el análisis de OTA en ambos alimentos es la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia. Finalmente, se muestran los niveles de OTA encontrados por diversos autores y se comparan con los límites máximos legales.

Mycotoxins are secondary metabolites derived from fungi usually produced by the species of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*. Within this group of mycotoxins, one of the most important ones is ochratoxin A, due to its high toxicity to human and animal health. This mycotoxin is produced by the genus *Aspergillus Ochraceus*. In this study, I have reviewed the toxicity of mycotoxins, especially ochratoxin A, which maybe present in wine and coffee. The different techniques used for the extraction and quantification of OTA have been reviewed. The most common extraction technique is the use of immunoaffinity columns, due to the simplicity and rapidity, and the detection tecnique for OTA quantitation in both foods is high performance liquid chromatografhy coupled to a fluorescence detector. Finally, the OTA levels found by diferent authors are shown and compared with the legal maximum residue limits.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Micotoxinas

#### 2.1.1. Origen

Micotoxina es un término que deriva de las siguientes palabras griega y latina, respectivamente: *mykes*, que significa hongo, y *toxicum*, que quiere decir veneno. (Ota et al., 2015)

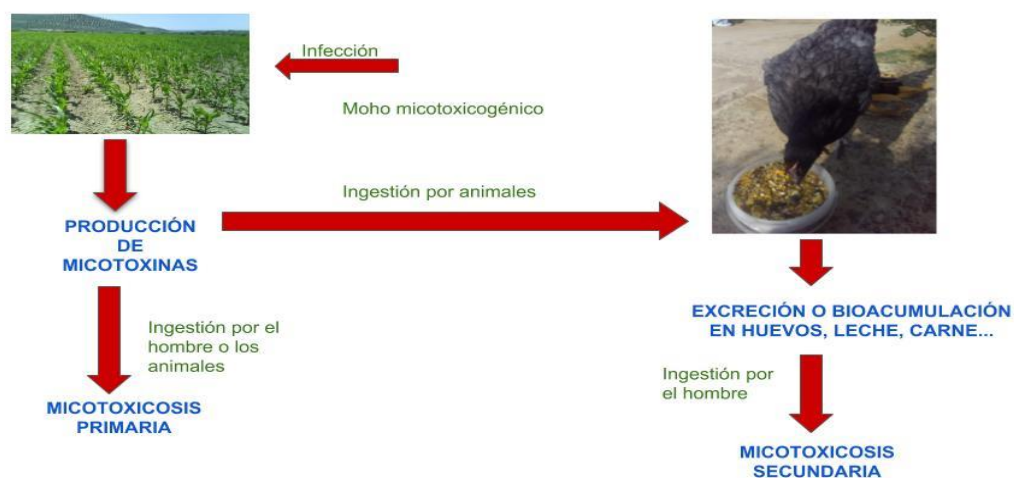
Las micotoxinas son metabolitos secundarios, producidas generalmente por hongos filamentosos de bajo peso molecular, 700 Da aproximadamente (Andrade & Lanças, 2017), durante la etapa final de la fase de crecimiento del moho o a principio de la fase estacionaria. Estos hongos filamentosos son los que pertenecen principalmente a las especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las micotoxinas son metabolitos potencialmente peligrosos para la salud humana y animal, ya que pueden causar una gran variedad de enfermedades (cirrosis, toxicidad renal, cáncer de esófago, nefropatía endémica de los Balcanes, trastornos gastrointestinales, etc.), y en ocasiones hasta la muerte (Elika, 2014).

Estas micotoxinas se producen bajo unas condiciones óptimas de temperatura. Las temperaturas oscilan entre los 24°C-28°C, que corresponden a climas tropicales (ej. moho del queso). Adicionalmente, los valores óptimos de pH se encuentran entre 4 y 8, y la humedad relativa de 80 a 90%. Actualmente se conocen más de 300 micotoxinas aproximadamente (Arroyo-manzanares et al., 2014).

Por otra parte, la contaminación de las cosechas, alimentos y piensos por hongos supone un problema higiénico sanitario a nivel mundial. Los alimentos pueden ser penetrados por los hongos desde el campo directamente o en el almacén de forma indirecta, induciendo a que la calidad nutritiva y organoléptica de los alimentos invadidos sea menor. Ciertos hongos tienen la capacidad de sintetizar micotoxinas, sustancias químicas altamente peligrosas para la salud humana y animal. En cierta manera, todos los productos vegetales pueden servir como sustrato para el crecimiento fúngico, con la posible contaminación por micotoxinas. Varios de los metabolitos secundarios producidos por hongos pueden poseer una alta actividad biológica y pueden ser tóxicos para otros

microorganismos (antibióticos), plantas (fitotoxinas), o animales. Determinados metabolitos secundarios producidos por hongos como son fumagilina, ácido fusárico y ácido micofenólico, se han empleado como agentes terapéuticos, mientras que otros metabolitos se consideran potentes toxinas.

Existe una gran variedad de micotoxinas que posiblemente afecten a la salud humana y animal. Esto se debe a las variedades de hongos, ya que hay alguna variedad de hongo que no produce micotoxinas tóxicas, cuya existencia está influida por ciertos factores como son el tipo de alimento, la humedad y la temperatura. Por esta razón, hay micotoxinas que se forman durante el cultivo (campo), durante la cosecha y otras durante el almacenamiento. Son una importante amenaza alimentaria, ya que una vez presentes en el alimento no se puede descontaminar, puesto que resisten los procesos de secado, molienda y procesado. No suelen desaparecer mediante tratamientos tecnológicos (calor, presión, etc.) debido a la estabilidad térmica, pasando inevitablemente a la cadena alimentaria. Cuando el ser humano o un animal ingieren una planta contaminada con estas toxinas, o simplemente un producto ya elaborado como es el pienso, pueden desarrollar una enfermedad, que en este caso se denomina micotoxicosis primaria (Figura 1). Además de esto, lo que suele ocurrir es que los animales al consumir piensos contaminados con estas toxinas los bioacumulen en sus tejidos o los excreten a través de la leche u otros derivados procedentes de los animales de granja. En este caso, la enfermedad causada se denomina micotoxicosis secundaria (Figura 1).



**Figura 1.** Llegada de micotoxinas a la cadena alimentaria. (Elaboración propia)

En general, las micotoxinas producidas por distintos tipos de hongos filamentosos que se encuentran habitualmente en alimentos como los cereales, frutos secos, cacao o café, son extremadamente peligrosas. Su consumo produce desde cuadros neurotóxicos de gravedad o alteraciones hormonales, hasta algunos tipos de cáncer. Los efectos que producen las micotoxinas en el ganado son muy conocidos. Esto es debido a que cuando consumen los alimentos contaminados con micotoxinas, los efectos que les produce a los animales se manifiestan acto seguido de ser consumidos, causando una gran pérdida en la explotación animal. Por el contrario, los efectos sobre los humanos se producen progresivamente, ya que las micotoxinas se pueden bioacumular y sus efectos nocivos son silenciosos; es decir, sus síntomas no son reconocidos fácilmente hasta que la enfermedad está avanzada.

Las micotoxinas que más destacan entre todas por su presencia son las aflatoxinas y la ocratoxina A. Estas micotoxinas son generadas por mohos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Se pueden encontrar principalmente en cereales, oleaginosas y frutos secos y estas micotoxinas tienen un gran efecto cancerígeno. La principal y más conocida es la aflatoxina B1, que dentro del organismo es metabolizada por el hígado a aflatoxina M1, teniendo efectos nocivos similares. La ocratoxina A, además de los alimentos mencionados más arriba, también se encuentra en racimos de uvas y pasas (Figura 2), café y cacao. Otras micotoxinas importantes son la fumonisinas, la zearalenona y los tricotecenos, entre los que destaca la toxina T2 o el deoxinivalenol, producidas todas ellas por hongos del género *Fusarium* y presentes en cereales.



**Figura 2.** Racimo de uvas afectados por *Aspergillus*. (Giralt et al., 2005)

### 2.1.2. Tipos

En la Tabla 1 (Arroyo-manzanares et al., 2014) se pueden observar los tipos de micotoxinas más importantes que se conocen a partir del hongo que las produce y, como consecuencia, los alimentos que están afectados por dichas toxinas.

**Tabla 1.** Principales tipos de micotoxinas. (Arroyo-manzanares et al., 2014)

HONGOS PRODUCTORES	MICOTOXINAS	ALIMENTOS AFECTADOS
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Arroz, semillas oleaginosas, trigo, maíz, fruto secos (nuez, almendras, pistachos, etc.) y especias
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B1 y B2	Arroz, semillas oleaginosas, trigo, maíz, frutos secos (nuez, almendras, pistachos, etc.) y especias
Metabolito de aflatoxina B1 en mamíferos	Aflatoxina M1	Leche y productos lácteos
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxinas T-2 y HT-2	Cereales y derivados
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol (o nivalenol) zearalenona	Cereales y derivados
<i>Fusarium moniliforme (F. verticillioides)</i>	Fumonisinias B1 y B2	Maíz y derivados
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A	Cereales, café, frutas, vino



**Continuación Tabla 1.** Principales tipos de micotoxinas. (Arroyo-manzanares et al., 2014)

HONGOS PRODUCTORES	MICOTOXINAS	ALIMENTOS AFECTADOS
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina	Zumos y derivados, manzana
<i>Aspergillus, Penicillium y Monascus</i>	Citrinina	Quesos, cereales, frutas, arroz rojo
<i>Aspergillus versicolor</i>	Esterigmatocistina	Cereales, café, jamón, pimienta y queso
<i>Hypocreales (Claviceps purpúrea), Eurotiales</i>	Alcaloides ergóticos (o del cornezuelo centeno)	Cereales

### 2.1.3. Toxicidad

Los primeros estudios científicos de las micotoxinas comenzaron a principio de los años sesenta del siglo pasado con el descubrimiento de las aflatoxinas, tras un suceso ocurrido en el Reino Unido de una intoxicación aguda de más de 100.000 pavos (Ramos & Sanchis Sonia Marín, 2015), causándole la muerte. Este episodio se relacionó con la ingesta de un pienso a base de harina de cacahuete que estaba contaminado por el hongo *Aspergillus flavus*.

El mayor problema que tienen las micotoxinas es que se trata de compuestos que producen distintos efectos tóxicos y afectan de forma nociva a gran parte de los órganos, normalmente a la misma vez, presentando una toxicidad que, además, es dependiente de otros aspectos tales como la edad, el sexo, la especie animal o el estado nutricional del individuo, entre otros factores. Por ejemplo, en el caso de las aflatoxinas, el principal órgano afectado es el hígado, aunque después se han observado otros órganos dañados como el riñón y el cerebro (la aflatoxina B1 es el agente cancerígeno de origen natural más potente que existe), además de haberse comprobado su actividad cancerígena, mutagénica, teratogénica e inmunotóxica. La Tabla 2 (IARC 1987, 1993, 2002)

hace referencia a los principales efectos tóxicos que presentan las micotoxinas más importantes; además, algunos efectos tóxicos son comunes en varias micotoxinas.

**Tabla 2.** Principales efectos tóxicos de las micotoxinas más importantes. (IARC, 1987) (IARC, 1993) (IARC , 2002)

MICOTOXINAS	EFFECTOS TÓXICOS
<b>Aflatoxinas</b>	Carcinogénica, cirrosis, inducción de tumores, daño hepático agudo, inmunosupresivas,
<b>Citrinina</b>	Inmunosupresivas, temblores corporales, toxicidad renal
<b>Fumonisinias</b>	Cáncer de esófago, hepatóxica, leucoencefalomalacia, embriotóxica, teratogénicas, edema pulmonar
<b>Ocratoxinas</b>	Nefropatía endémica de los Balcanes, embriotóxica, acumulación de riñón, mutagénica, tubulonefritis, vómitos, teratogénicas
<b>Patulina</b>	Trastornos gastrointestinales y neurológicos, mutágena e inductora de tumores, temblores corporales
<b>Tricotecenos</b>	Anorexia, inmunosupresión, emesis, diarrea, dolor abdominal
<b>Zearalenona</b>	Efectos estrogénicos (alteraciones en niveles de progesterona y estradiol), alteraciones en glándulas suprarrenales, descenso fertilidad, tiroides y pituitaria.

La principal forma de entrada al organismo de estas toxinas es por vía oral, causando enfermedades que se denominan micotoxicosis tanto en animales como en humanos. También pueden ser inhaladas o absorbidas a través de la piel.

Otro aspecto que hay que tener presente en cuanto a la toxicidad de las micotoxinas es que cuando un alimento está contaminado por estos tóxicos, probablemente esta contaminación se reproduzca, es decir, que se encuentre más de una micotoxina en el mismo alimento o pienso. Esto, en el mejor de los casos, supone la suma de los efectos tóxicos de cada toxina, pero muy frecuentemente lo que implica es la aparición de efectos sinérgicos, mediante los cuales la coexistencia de cantidades relativamente pequeñas de varias toxinas origina un efecto tóxico mucho mayor que el que cabría esperar a la vista del nivel de contaminación encontrado en el alimento. Por último, no hay que olvidar

que muchas micotoxinas producen un efecto inmunosupresor que abre la puerta al desarrollo de otras enfermedades secundarias.

Teniendo en cuenta la toxicidad crónica, el “*Centro internacional de investigaciones sobre el cáncer*” (IARC) clasifica varias micotoxinas como cancerígenas o altamente cancerígenas para el ser humano, en grupos de mayor a menor grado de riesgo de cáncer como se puede ver en la Tabla 3. Como se puede observar, las micotoxinas más problemáticas según la IARC son la ocratoxina A, las fumonisinas, las aflatoxinas y esterigmatocistina perteneciente al grupo 2B (IARC, 1987). En 1987, 1993 y 2002 se revisó la clasificación de las micotoxinas.

- Grupo 1: El agente es cancerígeno en humanos
- Grupo 2: El agente es posiblemente cancerígeno en humanos; hay poca certeza en humanos, pero sí en animales.
- Grupo 2B: El agente es posiblemente cancerígeno, pero no hay suficiente certeza experimental tanto en humanos como animales.
- Grupo 3: Este agente no se clasifica como cancerígeno para humanos.
- Grupo 4: El agente posiblemente no es cancerígeno en humanos, y tampoco experimentalmente en animales.

**Tabla 3.** Clasificación de las micotoxinas según la IARC.

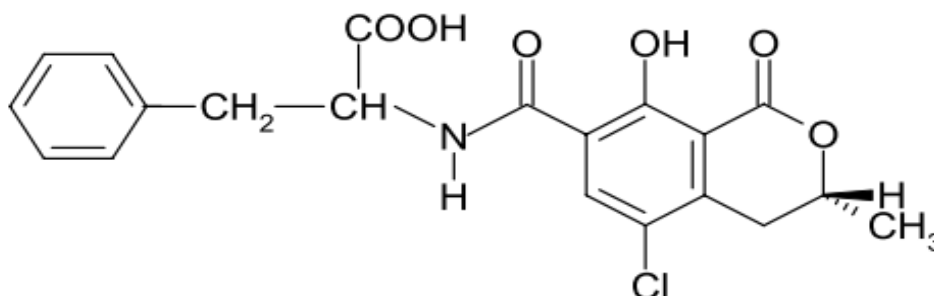
MICOTOXINAS	GRUPO
<b>Aflatoxinas de origen natural</b>	1
<b>Aflatoxina M1</b>	2B
<b>Fumonisina B1</b>	2B
<b>Ocratoxina A</b>	2B
<b>Esterigmatocistina</b>	2B
<b>Citrinina</b>	3
<b>Patulina</b>	3
<b>Toxinas derivadas de <i>Fusarium graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. crookwellense</i> (zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)</b>	3

## 2.2. Ocratoxina A

### 2.2.1. Origen

Dentro de las micotoxinas nos encontramos un grupo llamado ocratoxinas. Dentro de la variedad ocratoxina se distinguen varios tipos, en los que se encuentran la A, B, C,  $\alpha$  y  $\beta$  (Serrano-coli & Cardona-castro, 2015). Según la toxicidad, la más importante es la ocratoxina A, además de ser la que nos encontramos con mayor frecuencia en los alimentos. Por estos motivos, dicha micotoxina será objeto del presente trabajo.

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por determinados hongos, entre ellos *Aspergillus Ochraceus*, que se produce durante el almacenamiento en climas tropicales a unas temperaturas óptimas entre 12-37°C, detectándose sobre todo en alimentos almacenados, y *Penicillium Verrucosum*, que crece a temperaturas inferiores, entre 4-31°C (Elika, 2013), por lo que los alimentos contaminados son los producidos en climas templados o fríos, generalmente cereales y derivados (Ravelo Abreu et al., 2011). La ocratoxina A se diferencia de las demás por contener un átomo de cloro. Como se observa en la Figura 3 (Comisión Europea, 2006c), es una molécula formada por un anillo de 3,4-dihidrometil isocumarina unido, por medio de un grupo carboxilo y mediante un enlace tipo amida, a una molécula de fenilalanina ( $C_{20} H_{18} O_6 N Cl$ ). Es una molécula muy estable, poco soluble en agua pero si en disolventes orgánicos polares, incolora, tiene carácter de ácido débil y emite fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta.



**Figura 3.** Estructura química de la ocratoxina A. (Comisión Europea, 2006c)

La ocratoxina A aparece durante el crecimiento de la planta, la siembra, el almacenamiento o el procesado. La producción está relacionada con la temperatura y la actividad del agua, teniendo en cuenta algunas excepciones. La ocratoxina A es una molécula estable que no se elimina por los métodos de cocinado, tostado y fermentación habitualmente utilizados. Para que su concentración disminuya en los alimentos se necesitan temperaturas superiores a los 250°C y emplear un tiempo de varios minutos de cocinado (Malir, Ostry, & Novotna, 2013). Por esta razón, los alimentos que están expuestos a contaminación de ocratoxina A son los crudos y procesados.

Esta micotoxina, OTA, se encuentra presente en numerosos productos de origen vegetal de todo el mundo, como son los cereales, los granos de café, el cacao, las especias y los frutos secos, produciéndose especialmente durante la etapa del almacenamiento. Conociendo esto, se ha encontrado ocratoxina A en productos derivados a base de cereales, en el vino, la cerveza y el zumo de uva, incluso en alimentos procedentes de animales como son los riñones de cerdo.

### *2.2.2. Toxicidad*

Según los estudios realizados sobre los efectos tóxicos de la OTA, se afirma que esta micotoxina es nefrotóxica, inmunotóxica, genotóxica, carcinogénica, teratogénica y neurotóxica (Edite Bezerra da Rocha et al., 2014). De igual forma, se relaciona a una nefropatía endémica habitual en los Balcanes (enfermedad degenerativa progresiva de los riñones) debido a la gran concentración de esta micotoxina en los alimentos consumidos en dicha zona. En la Tabla 4 se puede observar la clase de toxicidad que provoca la ocratoxina A en los seres humanos y en los animales. La OTA se acumula en el riñón debido a que es el órgano más sensible a la toxicidad de esta micotoxina. La IARC clasifica la OTA como posible cancerígeno en humanos, perteneciente al grupo 2B (Ravelo Abreu et al., 2011) basándose en el análisis en animales de experimentación.

En 1998, la OTA fue determinada a nivel europeo por el Comité Científico de la Alimentación de la Unión Europea, alertando de su presencia en ciertos alimentos debido a su gran carácter genotóxico y carcinógeno. Se establecieron límites máximos permitidos o recomendados diarios a modo preventivo, entre 1.2-14 ng/kg por peso corporal (Ota et al., 2015).

**Tabla 4.** Toxicidad de las ocratoxinas en animales y humanos. (Elika, 2014)

MICOTOXINAS	TOXICIDAD AGUDA	TOXICIDAD CRÓNICA
<b>Ocratoxina</b>	<u>En animales:</u> Nefrotoxicidad	<u>En animales:</u> Teratogénica, mutagénica, nefrotóxica, inmunosupresión, genotóxica
	<u>En humanos:</u> Anorexia, pérdida de peso, hemorragias digestivas deshidratación, poliuria, polidipsia	<u>En humanos:</u> Nefropatía endémica en los Balcanes, carcinogénica e inmunosupresión

### 2.2.3. Legislación

La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) presentó el 4 de abril de 2006 una actualización de un informe científico sobre la OTA en los alimentos por petición de la Comisión Técnica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria, en la que se estableció una ingesta máxima semanal de 120 ng/kg de peso corporal (Comisión Europea, 2006a). Pero actualmente los niveles han cambiado a 15-60 ng/kg de peso corporal. (Comisión Europea, 2006c).

El 19 de diciembre de 2006 se estableció un contenido máximo de OTA para productos alimenticios en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión Europea (Comisión Europea, 2006a). En algunas ocasiones, se han observado contenidos elevados de OTA en especias, por lo que este reglamento se actualizó en 2010 (Comisión Europea, 2010). Actualmente la última actualización existente de especias es del 2012 (Comision Europea, 2012).

Como se puede observar en la Tabla 5 se muestran los niveles máximos permitidos de OTA en los alimentos, siendo para el vino 2µg/kg, café tostado 5µg/kg y café soluble 10µg/kg.

**Tabla 5.** Contenidos máximos de ocratoxina A en alimentos establecidos por la Unión Europea. (Comisión Europea, 2006)(EFSA, 2006a)

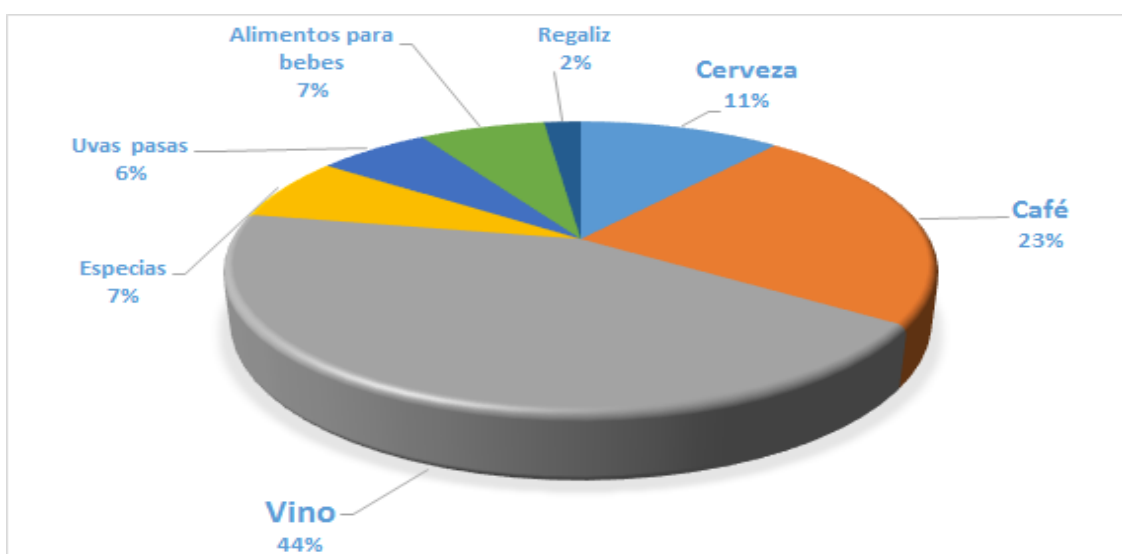
ALIMENTOS	CONTENIDOS MÁXIMOS (µg/kg)
Cereales no elaborados	5
Todos los productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo a excepción de los productos alimenticios (alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad, alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos especialmente a los lactantes, gluten de trigo no destinado a la venta directa al consumidor)	3
Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10
Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5
Café soluble (café instantáneo)	10
Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licores y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15% vol.) y vino de frutas	2
Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2
Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo	2
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes.	0.5
Espicias, incluidas especias desecadas <i>Capsicum</i> spp. (frutos de dicho género desecados, enteros o pulverizados, incluidos los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón)	30
<i>Piper</i> spp. (frutos de dicho género, con inclusión de la pimienta blanca y negra) <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada) <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma)	15
Mezclas de especias que contenga una de estas especias	15

**Continuación Tabla 5.** Contenidos máximos de ocratoxina A en alimentos establecidos por la Unión Europea. (Comisión Europea, 2006)(EFSA, 2006a)

ALIMENTOS	CONTENIDOS MÁXIMOS (µg/kg)
Raíz de regaliz, ingredientes para infusiones	20
Extracto de regaliz, para uso alimentario, especialmente en bebidas y confitería	80
Gluten de trigo no destinado a la venta directa al consumidor	8

### 3. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo principal la realización de una revisión, tanto del actual problema que tiene la ocratoxina A en los alimentos, como los métodos de análisis para su determinación y cuantificación. Como puede verse en la Figura 4, la mayoría de las investigaciones publicadas en los últimos años sobre la presencia o el análisis de OTA en alimentos se centraron en el café (23% de las publicaciones) y el vino (44% de las publicaciones). Además, se han encontrado mayores concentraciones de OTA en estos alimentos. Por lo tanto, se va a realizar una revisión de los distintos tratamientos de muestra para cada uno de los alimentos seleccionados, además de las distintas técnicas de análisis utilizadas.



**Figura 4.** Porcentaje de información encontrada de alimentos con OTA.



## 4. MÉTODOS PARA LA DISMINUCIÓN Y ANÁLISIS DE OCRATOXINA A EN ALIMENTOS

### 4.1. Métodos para la disminución de ocratoxina A

Actualmente existen dos tipos de estrategias para disminuir la cantidad de OTA en los alimentos, métodos para la reducción y métodos para la prevención, siendo estos últimos los más eficientes. Estas estrategias están destinadas a reducir la contaminación mediante la aplicación de buenas prácticas agrícolas (Codex, 2014).

#### 4.1.1. *Prevención de OTA*

Para la prevención de OTA se pueden considerar tres tipos de controles: control pre-cosecha, control durante la cosecha y control post-cosecha (Amézqueta et al., 2009).

##### ❖ *Control pre-cosecha*

Consiste en hacer un plan de rotación de los cultivos para que no se siembre el mismo cultivo en el mismo campo durante dos años consecutivos. Hay que preparar el terreno para la siembra haciendo labranzas al campo para la eliminación de los restos de plantaciones antiguas. Cultivar variedades de semillas siempre que sea posible, resistentes a los hongos que podrían infectarlas y a las plagas de insectos (Codex, 2014).

##### ❖ *Control durante la cosecha*

Durante la cosecha, lo más importante que hay que tener en cuenta es el rendimiento y la limpieza de equipos agrícolas; esto ayudará a la ligereza del trabajo para que no retrase el tiempo de cosecha. También hay que tener en cuenta que hay que recolectar solo los productos maduros y eliminar los que estén demasiado maduros, fermentados o dañados al caer al suelo o dañados por fenómenos meteorológicos, que hay que eliminar rápidamente del campo ya que son propensos a contener grandes niveles de OTA y pueden contaminar los

productos sanos. Los productos tienen que ser recogidos en sacos o recipientes que estén muy bien limpios, libres de contaminación (Amézqueta et al., 2009).

#### ❖ *Control post-cosecha*

En la post-cosecha, la fase más importante es el almacenamiento y el procesamiento donde se puede prevenir la contaminación o incluso la desintoxicación por procesos físicos o químicos (FAO - ONU, 2004); los autores de este artículo han propuesto que el almacenamiento tiene que estar muy bien controlado, ya que las condiciones ambientales, la humedad y la temperatura son las causantes de la contaminación por estas micotoxinas durante esta fase. Estas condiciones hay que controlarlas en cualquier lugar donde se encuentre el producto, ya sea en la nave de almacenamiento, granja, lugar de fabricación o incluso ya en la tienda para ser vendido. Los almacenes tienen que limpiarse antes de almacenar nuevas cosechas, para evitar la contaminación de productos futuros. Hay que controlar las condiciones en las que se encuentran los productos, incluso cuando se transporta a otros países. Cuando el producto es importado a otros países se hace mediante barco, donde las condiciones de humedad son muy elevadas, y la presencia de roedores es muy frecuente. Por esta razón, es muy importante la limpieza en profundidad y el saneamiento de las zonas de transporte. Igualmente, es de vital importancia evitar la entrada de roedores o insectos.

#### 4.1.2. *Métodos de reducción de OTA*

Hoy en día se encuentran diferentes tipos de métodos para la reducción de la concentración y/o efectos tóxicos de las micotoxinas que se encuentran en los productos primarios o incluso en los ya procesados, como los piensos para el consumo animal.

#### ❖ *Métodos químicos*

En los métodos químicos se utilizan principalmente la amonización (transformación de la materia orgánica nitrogenada en un compuesto amoniacal

bajo la acción de los microorganismos del suelo) y la nixtamalización (procedimiento de cocción que se le realiza al maíz con agua y cal) (Europa & Materias, 2013). Otros métodos químicos observados (Soriano, 2007), consisten en añadir concentraciones entre 0.25 y 1% de ácido fórmico, propiónico o sórbico, que degrada efectivamente la OTA después de la exposición durante 24 horas, también se ha demostrado que la aplicación de amonio o el uso de 0.5% hidróxido de sodio junto con tratamientos térmicos descompone casi totalmente la OTA en maíz, trigo y cebada. En otro método se aplican soluciones de amoniaco con hidróxido cálcico a 96°C en los piensos para cerdos. Un tratamiento efectivo en los piensos para ganados consiste en usar sosa cáustica al 2.5 - 3.0% debido a que la OTA es susceptible a la hidrólisis alcalina. Este método químico para piensos normalmente suele ser caro y no llega a ser totalmente efectivo para la destrucción de las micotoxinas. Todos estos procesos químicos no están autorizados por la Unión Europea. (Soriano, 2007)

#### ❖ *Métodos biológicos*

Los métodos biológicos para la reducción de OTA aún no están muy claros, ya que están en proceso de estudio. Estos métodos biológicos se basan en la eliminación de las micotoxinas, o reducción de las mismas, mediante el uso de agentes biológicos de control que incluyen bacterias, levaduras, hongos y enzimas. La aplicación de aceites esenciales se ha usado para disminuir la concentración de OTA (Soriano, 2007). En el caso del vino, se ha observado que cepas diferentes de la variedad *Saccharomyces* llegan a reducir la cantidad de OTA en un 13%, transcurridos ocho días de fermentación. La cantidad más baja de OTA se encuentra en la carne de los rumiantes, debido a la actividad de microorganismos que se encuentran en el rumen. También en ocasiones esta reacción es reversible, ya que se puede formar OTA debido a las condiciones ácidas.

❖ *Métodos físicos*

En los métodos físicos los procedimientos utilizados no son muy efectivos, ya que disminuyen el contenido de micronutrientes que contienen los alimentos. Esto puede deberse a las altas temperaturas, las radiaciones ultravioletas, las irradiaciones con microondas o los métodos mecánicos, como son la limpieza de semillas, extrusión, etc. En la Tabla 6 se pueden observar los métodos de reducción de OTA en algunas muestras de alimentos y el porcentaje de reducción de esta micotoxina (Soriano, 2007).

**Tabla 6.** Métodos para la reducción de OTA mediante procesos físicos. (Soriano, 2007)

MÉTODO	MUESTRA	REDUCCIÓN (%)
<b>Cereales:</b>		
Autolavar (30')	Harina de avena Arroz	61-67
Autolavar (132°C 30')	Cebada	85
Moler	Cebada	10-35
<b>Derivados de cereales:</b>		
Calentar (210°C 5')	Galletas	62
Calentar (210°C 5')	Galletas	83
<b>Hortalizas:</b>		
Autolavar (121°C 20')	Habas	20.1-76.7
Cocción	Habas	84
<b>Café:</b>		
Tueste	Café	69-96
<b>Bebidas alcohólicas:</b>		
Calentar (>90°C)	Cerveza	52-90
Uso de <b>carbón</b> activado	Vino	99.8
Uso de caseinato potásico	Vino	82
<b>Carne y derivados:</b>		
Secado	Salchicha	20
Fritura	Riñón	35

El método que actualmente se utiliza con mayor frecuencia para reducir la toxicidad de la ocratoxina A es la adición de adsorbentes a los alimentos (Elika, 2013b). La función que tienen estos adsorbentes es, como su propio nombre indica, la de adsorber las micotoxinas, con lo cual dificulta su función tóxica en el organismo animal.

El inconveniente que tiene utilizar adsorbentes es que en ocasiones se unen a los nutrientes y dificulta que el animal los absorba. Por esta razón, los adsorbentes no llegan a ser lo suficientemente efectivos para todas las micotoxinas en general. A continuación se citan los adsorbentes más comunes:

- *Carbón activo*

- Es activo para casi todas las micotoxinas, pero también se une a los nutrientes e impiden que se adsorban.

- *Polímeros:*

- Polivinipirrolidona,

- Colestiramina

- *Arcillas:*

- Aluminosilicatos: zeolita, esmectita.

- Aluminosilicatos hidratados de sodio y calcio: (HSCAS)

- Magnesosilicatos: atapulgita

En el caso de la OTA los más efectivos son: Polivinipirrolidona, colestiramina y zeolitas

## **4.2. Métodos de análisis de ocratoxina A**

### *4.2.1. Técnicas de extracción y purificación de ocratoxina A en vino y café.*

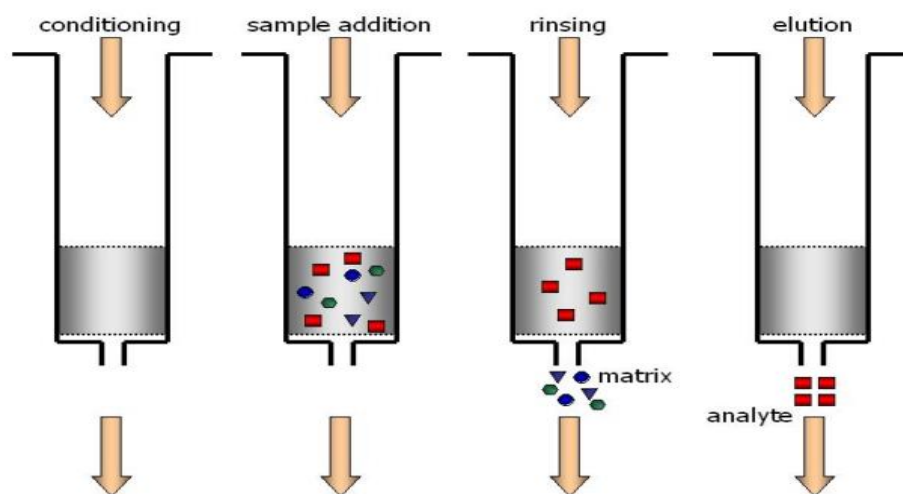
Las etapas de cualquier método analítico son: toma de muestra, pre-tratamiento de la muestra, tratamiento de muestra, medida analítica y análisis de los resultados. Por otro lado, la complejidad de los alimentos, donde se encuentran presentes cantidades importantes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y otros componentes minoritarios, requiere generalmente una

purificación de los extractos para eliminar las sustancias interferentes antes de realizar la medida analítica.

En el caso de la determinación de OTA en vino y café, se hace la toma de muestra cogiendo muestras de diferentes vinos y cafés de distintas regiones del mundo para la comparación de las diferentes técnicas de extracción y purificación empleadas.

#### ❖ *Extracción en fase sólida*

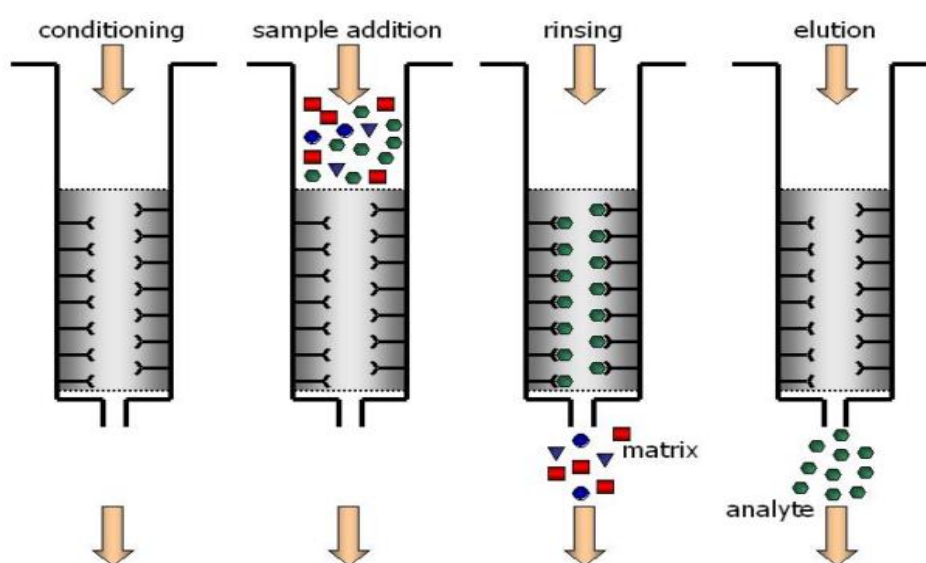
La extracción en fase sólida (SPE) (Cámara C., 2002), es una técnica que consiste en la preparación y limpieza de muestras; es una técnica muy utilizada debido a su rapidez y su bajo coste. Una columna SPE consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable (cartuchos). Esta técnica sirve para la concentración del analito y/o para la eliminación de interferentes en la muestra y posterior cuantificación. El término "extracción en fase sólida" es debido a que el material de soporte utilizado es un sólido, a través del cual pasa un líquido. Como se observa en la Figura 5, tiene cuatro etapas la SPE: acondicionamiento del soporte sólido, adición de la muestra, lavado y elución del analito dependiendo de su afinidad entre el material adsorbente y la fase móvil. La elección de los disolventes utilizados depende de la naturaleza de la fase estacionaria. Una ventaja que tiene la SPE es que en un solo paso permite hacer la extracción, la pre-concentración y la purificación (Huertas-Pérez et al., 2017).



**Figura 5.** Esquema de las etapas de la extracción SPE. (Krska & Kos, 2000)

### ❖ Columnas de inmunoafinidad

Las columnas de inmunoafinidad (IAC) se utilizan para limpiar y aislar micotoxinas separadas de los alimentos y fluidos biológicos, como puede ser la ocratoxina A (Scott & Trucksess, 1997). Las IAC se preparan uniendo anticuerpos específicos para una micotoxina concreta. Para ello, un soporte de fase sólida se activa especialmente y se empaqueta al soporte suspendido en una solución tampón en un cartucho. La muestra dentro de la columna da lugar a la retención del analito debido a la especificidad de la identificación antígeno-anticuerpo, mientras que otros componentes de la muestra eluyen sin retenerse en la columna. Después, las impurezas se eliminan con agua o solución acuosa, seguidamente la micotoxina se eluye con un disolvente como el metanol que es miscible, obteniendo el analito aislado. En la Figura 6 se puede observar un esquema de las diferentes etapas. El peso molecular de las micotoxinas, normalmente, suele ser bajo (Arroyo-manzanares et al., 2014). Para que los anticuerpos se puedan fijar en la fase estacionaria, necesitan unirse a transportadores como son la agarosa, sefarosa o dextrano. Posteriormente, se lleva a cabo la cuantificación del analito. Las IAC han sido empleadas comercialmente para aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol.



**Figura 6.** Esquema de columnas de inmunoafinidad (IAC). (Krska & Kos, 2000)

## ❖ *QuEChERS*

El método QuEChERS quiere decir Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro); es un acrónimo del inglés. Este método fue diseñado para el análisis de plaguicidas en alimentos, pero como es un método de preparación de muestras muy sencillo y directo, actualmente se está utilizando para otros tipos de muestras (López, García, & Fernández, 2010).

Este método tiene dos etapas. En la primera etapa combina la extracción simple con la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) que sería la fase de limpieza. En esta etapa se realiza una extracción con disolvente orgánico, como puede ser el acetonitrilo con presencia de diferentes sales. Las sales que se suelen utilizar en esta etapa son acetato tribásico de sodio (regula el pH), el sulfato de magnesio (retiene agua y facilita de esta forma la extracción), sales de citrato (ajustan el pH a valores de 5.5, valor en el que se extraen la mayoría de los compuestos ácidos y básicos de la muestra) y cloruro sódico (favorece la separación de las fases y disminuye la solubilidad del analito en la fase acuosa). En la Figura 7 podemos observar esquemáticamente los procedimientos de extracción.

En la segunda etapa lo que se realiza, es la limpieza o "clean-up" de la muestra mediante SPE. En esta etapa, las sales y los reactivos que se emplean son cartuchos C<sub>18</sub> (elimina del extracto las grasas, esteroides y lípidos), sulfato de magnesio (elimina el exceso de agua), amina primaria/secundaria (PSA) (elimina azúcares, ácidos grasos y ácidos orgánicos), y carbón grafitizado (elimina esteros y pigmentos). Dependiendo de la muestra que vayamos a analizar utilizaremos un tipo de sales y una fase sólida u otra.





**Figura 7.** Procedimiento de la extracción QUECHERS. (QuEChERS, phenomenex 2012)

#### 4.2.2. Técnicas de análisis de ocratoxina A en vino y café

Hoy en día los métodos de determinación y cuantificación han variado respecto a años anteriores, al igual que los procedimientos de extracción y purificación. Entre los métodos más utilizados para la determinación y cuantificación de los niveles de ocratoxina A, debido a su gran eficacia y rapidez, encontramos la cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de capa fina, cromatografía de intercambio iónico y técnicas de electroforesis capilar, siendo estas dos últimas menos utilizadas y la cromatografía líquida de alta resolución la más empleada.

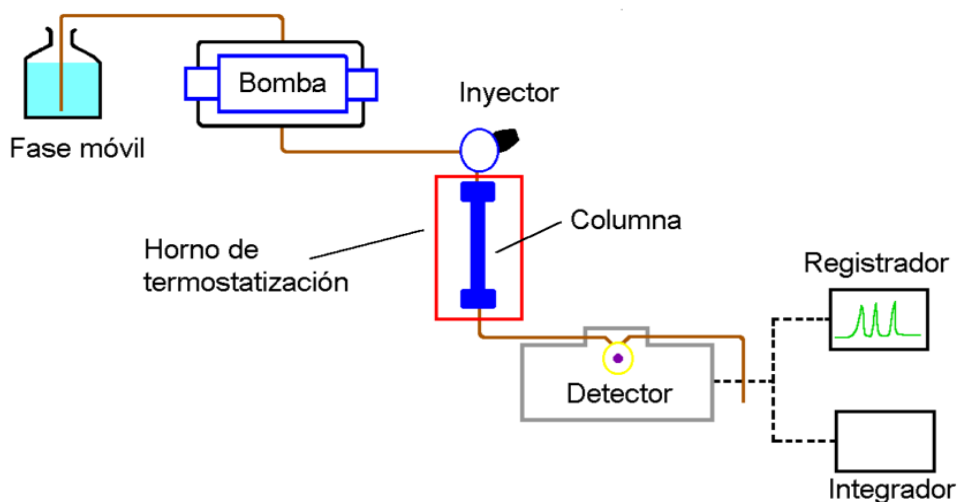
Actualmente, el objetivo de la utilización de las técnicas de análisis es obtener resultados rápidos, y dependiendo de la técnica empleada, se obtendrá mayor o menor selectividad y sensibilidad. Las técnicas que hoy en día se utilizan y se pueden destacar son: cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS-MS), cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD), técnica cualitativa del Test (ELISA; del inglés “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) mediante el uso combinado de anticuerpos monoclonales.

### ❖ *Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)*

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Hernández, 2007), es una técnica de separación analítica que se lleva a cabo gracias a la afinidad del analito por una de las dos fases, fase estacionaria o fase móvil. La fase móvil es un líquido que circula en contacto con un sólido u otro líquido inmiscible que pertenece a la fase estacionaria. Al introducir la mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema a una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Una vez terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada analito eluirá en un tiempo diferente, por lo que estarán separados.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos (Figura 8) son:

- Bomba y dispositivo de mezcla de eluyentes
- Dispositivo de inyección
- Conducción y conexión
- Columna
- Detector y registrador

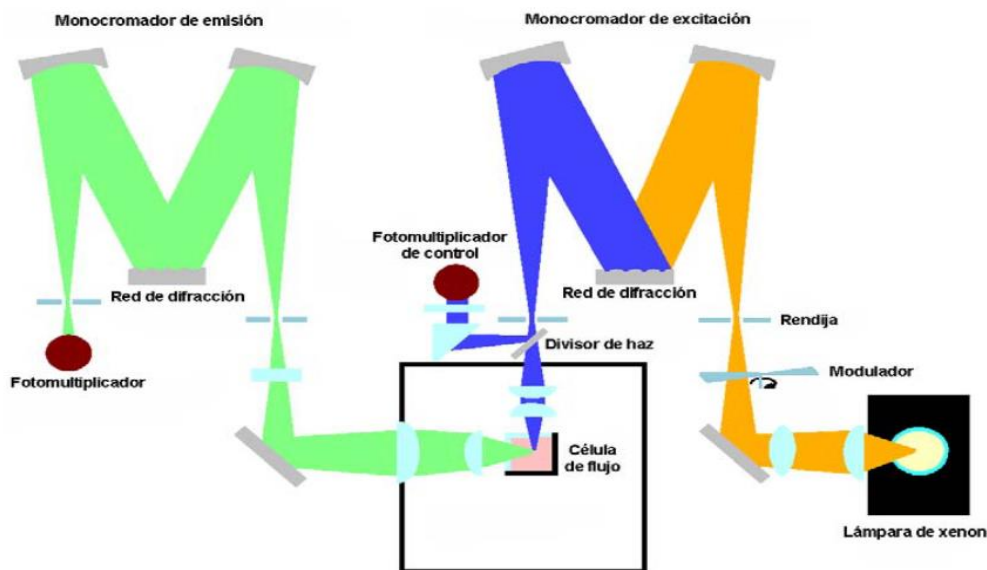


**Figura 8.** Componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. (Hernández, 2007)

La cromatografía líquida de alta resolución puede tener diferentes tipos de detectores dependiendo de las necesidades. Estos detectores son detectores de absorbancia, detectores de fluorescencia, detectores de índice de refracción, detectores de dispersión de luz, detectores electroquímicos. Para la determinación de OTA en los alimentos se utiliza el detector de fluorescencia. En ocasiones también se acopla el cromatógrafo a un espectrómetro de masas (MS).

**Detectores de fluorescencia.** La fluorescencia se produce cuando compuestos que tienen determinados grupos funcionales se excitan a ciertas longitudes de onda de energía y emiten una radiación de longitud de onda mayor que la radiación absorbida (Gomis Yagües, 2008). La fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Los detectores que utilizan una fuente de excitación de mercurio, y uno o más filtros para aislar la radiación fluorescente, son los más sencillos. Los métodos de fluorescencia tienen una ventaja destacable y es que son muy sensibles, llegando a ser mayor esta sensibilidad que la de los sistemas de absorbancia. En cromatografía de líquidos (LC) se ha aplicado esta capacidad para separar y determinar en las muestras los compuestos fluorescentes.

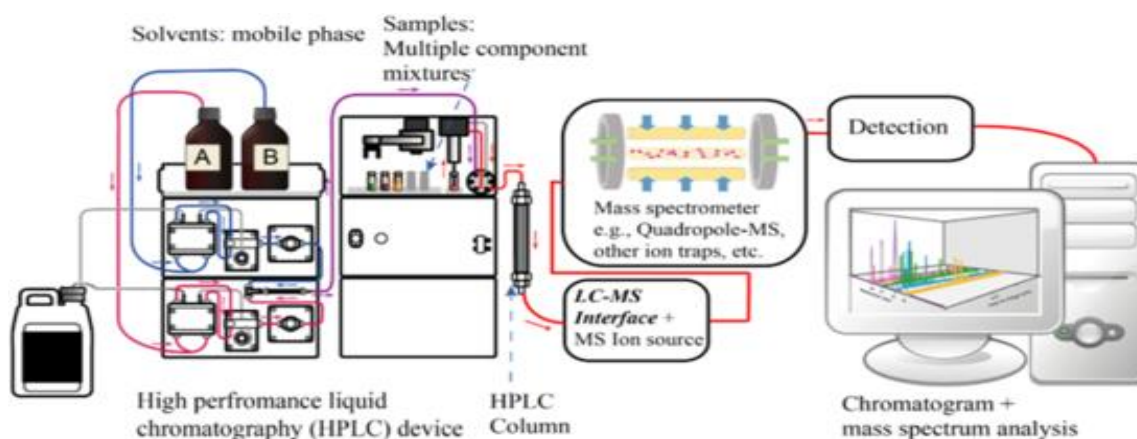
En la Figura 9 se puede observar un esquema de un detector de fluorescencia para cromatografía de líquidos. Hay distintas variedades de detectores, pero solamente se diferencian unos de otros en la forma de mandar las longitudes de onda de excitación y emisión. Los instrumentos que tienen un precio menor utilizan filtros, los que tienen un precio algo mayor hacen el control con monocromador de una de las dos longitudes de onda, y los que tienen un coste mayor debido a que son más completos, son los que se emplean en investigación. El control de estos se hace mediante monocromador que detecta ambas longitudes de onda, excitación y emisión.



**Figura 9.** Detector de fluorescencia. (Gomis Yagües, 2008)

#### ❖ HPLC-MS

Esta técnica analítica combina las capacidades de separación físicas de la cromatografía líquida (HPLC) con las capacidades de la espectroscopia de masas (MS) (Niessen, 2006). En la Figura 10 se puede observar un esquema general de la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas. La cromatografía líquida separa las mezclas con múltiples componentes y la espectrometría de masas proporciona una identidad estructural de los componentes individuales con alta especificidad molecular y sensibilidad de detección. Esta técnica en tándem se suele utilizar para el análisis de muestras complejas de origen ambiental y biológico. Por lo tanto, LC-MS se utiliza en el procesamiento de alimentos y en esta ocasión para la determinación de OTA en una serie de alimentos.



**Figura 10.** Esquema del acoplamiento de HPLC-MS. (Fuente: wikimedia/licencia.creative commons)

Estas técnicas empleadas como son la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y la cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC-MS), tienen unas series de ventajas e inconvenientes. Si empezamos por el HPLC-FLD podemos decir que es una técnica muy sensible y más selectiva que otra técnica de detección espectroscópica como puede ser ultravioleta (UV), pero como inconveniente, esta técnica no nos proporciona información estructural del compuesto. En el caso de HPLC-MS la principal ventaja que tiene es que proporciona información estructural del compuesto; sin embargo, es una técnica muy compleja además de ser bastante costosa.

## 5. DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN VINO Y CAFÉ

Todo proceso experimental tiene un método de muestreo para el cual hay que seguir unas pautas. En este caso, el Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión Europea del 23 de febrero de 2006 establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de OTA en los alimentos (EFSA, 2006b).

## 5.1. Determinación de ocratoxina A en vino

Según datos publicados sobre la presencia de OTA en vinos tintos, blancos y rosados de distintos orígenes, los vinos tintos son los que presentan mayor concentración de OTA en comparación con los vinos blancos y los vinos rosados. Por esta razón, como se puede observar más adelante, la gran parte de los estudios realizados son de vino tinto y las concentraciones de OTA aumentan desde países del norte a países del sur. Como se ha estudiado anteriormente, esto es debido a las condiciones climatológicas y a la latitud que hace que aumente la producción de OTA. Las prácticas de viticultura y enológicas influyen a la hora de la producción de OTA, por tanto si seguimos todos los pasos establecidos por estas prácticas, la concentraciones de OTA serán menores. Por esta misma razón, nos encontramos diferencias de concentraciones de OTA en unos vinos y en otros, debido a que algunos agricultores siguen unas buenas practicas vinícolas y otros no. En las revisiones realizadas para la determinación de OTA en vino, principalmente se emplean la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD), cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS) y la técnica de inmunoabsorción (ELISA). En la tabla 7 se muestra un resumen de los métodos utilizados para la determinación de OTA en vino. Aquí se puede observar que la técnica más empleada es HPLC-FLD, utilizando para la purificación de la muestra cartuchos C<sub>18</sub> (octadecilsilano) en columnas de inmunoafinidad (IAC). Además podemos observar, que los vinos más estudiados son los vinos tintos posiblemente por ser el más consumido por el ser humano, igualmente de haberse detectado niveles más altos de OTA.

El estudio realizado por Pradenas (Pradenas Canales, 2009) se realizó durante la campaña 2007-2008 sobre 57 muestras de vinos tintos, procedentes de viñedos del valle del Maule. Estas muestras se diluyeron en una solución de polietilenglicol carbonato de sodio hidrogenado, que tras varios procesos de filtración se purificó mediante columnas de inmunoafinidad (IAC). La OTA se eluyó con metanol y posteriormente se cuantificó con HPLC-FLD. Este método tiene un límite de cuantificación y detección de 2.14µg/kg y 0.65µg/kg

respectivamente. Una vez finalizado el estudio, en los resultados obtenidos no se encontró evidencia de presencia de OTA en los vinos analizados.

En otro estudio realizado para la variedad de vino dulce Español (Hernández et al., 2006), se estudiaron 16 muestras de vino dulce, de las cuales ocho muestras de vino eran de variedad de uvas Moscatel, y las otras ocho muestras de variedad de uva Pedro Ximénez. El análisis de las muestras de vino de uva Moscatel fue más complejo, debido a la limpieza previa a la extracción en fase sólida (SPE), utilizando en este caso un cartucho (C<sub>18</sub>) que previamente se acondicionó con metanol/agua (60/40, v/v) y seguidamente la determinación y cuantificación del analito con HPLC-FLD. Para la variedad de vino de Pedro Ximénez, la muestra se inyectó directamente al HPLC sin previo tratamiento de muestra. En este estudio realizado solo detectaron OTA en muestras de mosto de uva.

En otro estudio realizado sobre vino dulce (Burdaspal & Legarda, 2007), se analizaron 209 muestras de vinos obtenidas entre 2001 y 2005, de las cuales 188 muestras de vino dulce fueron producidos en España y 102 muestras procedentes de otros países. Este método analítico se basó en la detección y cuantificación en HPLC con detector de fluorescencia mediante una extracción de columna de inmunoafinidad con PBS-metanol al 15% (v/v). El límite de detección es de 0.01 µg/kg. En los resultados obtenidos la concentración de OTA media global en los vinos procedentes de España y de otros países fue de 0.5 µg/kg, podemos comprobar que está dentro de los límites máximos permitidos por la Unión Europea para los vinos españoles. El 96.9% de los vinos estudiados resultaron tener niveles de OTA detectables.

En este estudio realizado por Valero, (Valero et al., 2008) se analizaron 121 variedades de vinos especiales de diferentes zonas europeas. Estos vinos se obtuvieron con diferentes técnicas de vinificación, de los cuales más del 90% de los vinos contenían OTA. En este caso la OTA se eluyó en una columna de IAC con metanol: ácido acético (98:2). La OTA se separó y se cuantificó haciendo uso de un HPLC-FLD con columna de gel de sílice C<sub>18</sub> de fase inversa. Con el análisis realizado se demostró que los vinos que estaban más envejecidos debido a su crianza estaban contaminados con OTA pero con una concentración inferior a 1 µg/kg. Finalmente, el 19.8% de los vinos que fueron estudiados dieron

unos resultados de concentración de OTA superior al límite máximo permitido por la Unión Europea que es de  $2\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Murillo realizó un estudio de 40 muestras de vinos blancos, de los cuales 10 eran vino Fino, 10 vino Manzanilla, 10 vino Amontillado y 10 vino Oloroso, (Murillo-Arbizu et al.2010). En este estudio, Murillo utilizó una alícuota de vino que se diluyó con PBS y se pasó por una columna de inmunoafinidad (IAC) y la OTA se eluyó con metanol y se cuantificó con HPLC con detector de fluorescencia. Los valores medios de OTA obtenidos fueron de  $0.042\mu\text{g}/\text{kg}$  para el vino Manzanilla,  $0.044\mu\text{g}/\text{kg}$  para el vino Fino,  $0.144\mu\text{g}/\text{kg}$  para el Amontillado y  $0.319\mu\text{g}/\text{kg}$  para el vino Oloroso. Finalmente, de las 40 muestras analizadas, en el 80% de las muestras se detectó OTA, con una media de concentración de OTA de  $0.138\mu\text{g}/\text{kg}$ . Todas las muestras presentaron niveles de OTA inferiores a los establecidos por la legislación. Los vinos blancos comparados con los vinos tintos tienen unos niveles de OTA muy bajos.

La situación geográfica y el tipo de vino en los niveles de OTA fueron estudiados por Quintela (Quintela et al., 2011). Analizaron 100 muestras de vino con denominación de origen Rioja, de las cuales 51 pertenecen a una zona semiárida y 49 a una zona seca. Para la extracción de OTA se mezcló un cierto volumen de cada vino con una solución acuosa de polietilenglicol (PEG) al 1% y  $\text{NaHCO}_3$  al 5% y se filtró con un filtro Whatman. Para la limpieza utilizaron una IAC que posteriormente lavaron con  $\text{NaCl}$  y  $\text{NaHO}_3$ , y agua Mili-Q y la OTA fue eluida con metanol. Finalmente, para la detección y cuantificación lo hicieron con HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, con un límite de detección de  $0.002\mu\text{g}/\text{kg}$ . Una vez obtenidos los resultados se llegó a la conclusión de que la concentración de OTA depende de la situación geográfica y el tipo de vino, ya que obtuvieron niveles de concentración de OTA mayores en los vinos procedentes de la región semiárida que de la región seca, es decir regiones de escasas precipitaciones y altas temperaturas. En el 57% de las muestras se detectó OTA, pero todas con concentraciones inferiores de las que recoge la legislación europea.

En este artículo (Campone et al., 2018), Campone realizó un estudio con 41 vinos tintos y 17 vinos blancos. Las técnicas empleadas de extracción y determinación son SPE y HPLC-MS/MS respectivamente. Este es un procedimiento analítico rápido ya que está automatizado. Los resultados son



precisos y selectivos y además este método tiene un bajo costo. De las 58 muestras totales analizadas, ninguna contenía concentraciones de OTA superiores al límite máximo establecido por la Unión Europea ( $2\mu\text{g}/\text{kg}$ ). La concentración más alta detectada de OTA fue de  $0.270\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente siete veces inferior que el límite permitido.

Markaki, (Markaki et al., 2001) realizó una investigación con 31 muestras de vinos tintos procedentes de países del Mar Mediterráneo. Para el tratamiento de muestra utilizó columnas de inmunoafinidad, llevando a cabo la elución de la OTA con metanol y ácido acético; la detección y cuantificación se realizó con HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. En todas las muestras se detectó la presencia de OTA; el 72% de las muestras de vino se encontraron contaminadas por encima de  $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ , pero todas ellas estaban dentro del límite máximo permitido.

En otro estudio (Flajs et al., 2009), se estudiaron 18 muestras de mosto y vino de las cuales, 6 muestras eran mosto rojo, 6 muestras de vino producido del mosto y 4 muestras de vino ya embotellado durante 2007. Este estudio lo hicieron con muestras de vino recogidas en Croacia que se determinó mediante la técnica ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), método bastante rápido y fiable para la determinación de OTA en varios productos, además de que solo se necesita un volumen de muestra escaso y la limpieza es más rápida comparado con los otros métodos convencionales. También compararon la técnica ELISA con la técnica HPLC. Primeramente, realizaron el estudio con la técnica de HPLC, en la cual diluyeron las muestras de vinos con tampón PBS, se filtraron con un filtro de microfibra y se pasaron por la columna de inmunoafinidad para eluir la OTA con metanol y ácido acético (98:2) (v/v). En la técnica ELISA a la muestra se le añadió HCl y cloroformo y posteriormente se pasó a un proceso de agitación, centrifugación y una serie de procesos más de acidificación y otras más. El residuo se aplicó en la placa ELISA y se midió la intensidad de color a 450nm en el detector de placas (Victor 3, Perkin Elmer, Shelton, CT, EE. UU.). Las concentraciones de OTA las compararon con los estándares obtenidos del fabricante. De los estudios realizados a los vinos y mostos llegaron a la conclusión de que se encuentran niveles de OTA mayores en mostos que en vinos. Esto se debe a que en el proceso de fermentación

disminuye la concentración de OTA, ya que el mosto solo tiene los procesos de vinificación como es el triturado.

Con la investigación De Sousa (De Sousa et al., 2013) sobre los vinos tintos portugueses comenta que ha mejorado la calidad de los vinos al adoptar unas buenas prácticas vitivinícolas y enológicas. El objetivo de este estudio fue optimizar y validar un método para la determinación de OTA en el vino tinto portugués utilizando una columna SPE y posteriormente se cuantificó por HPLC-FLD. Utilizaron 11 vinos en los cuales 4 no demostraron estar contaminados con OTA pero las 7 muestras restantes sí que tenían concentraciones de OTA apreciables.

**Tabla 7.** Técnicas de extracción y cuantificación de OTA en distintos tipos de vinos.

MUESTRA	EXTRACCIÓN	TÉCNICA	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	REFERENCIA
<b>Vino tinto del Mar Mediterráneo</b>	IAC Elución: metanol-ácido acético	HPLC- FLD	0.002	(Markaki et al., 2001)
<b>Moscatel y Pedro Ximénez</b>	SPE Elución: metanol	HPLC- FLD	0.22	(Hernández et al., 2006)
<b>Vino dulce</b>	IAC	HPLC- FLD	0.01	(Burdaspal & Legarda, 2007)
<b>Vino especial</b>	IAC Elución: metanol-ácido acético	HPLC - FLD	0.024	(Valero et al., 2008)
<b>Vino tinto</b>	IAC Elución: metanol	HPLC-FLD	0.65	(Pradenas Canales, 2009)
<b>Vino tinto Croacia</b>	IAC Elución: metanol-ácido acético	HPLC  ELISA	-----	(Flajs et al., 2009)
<b>Vinos blancos</b>	IAC Elución: metanol	HPLC- FLD	0.09	(Murillo-Arbizu et al., 2010)
<b>Vino tinto denominación de origen Rioja</b>	IAC Elución: metanol	HPLC- FLD	0.002	(Quintela et al., 2011)
<b>Vino tinto portugués</b>	SPE	HPLC - FLD	0.005	(De Sousa et al., 2013)
<b>Vino tinto</b>	SPE-online	HPLC-MS/MS	-----	(Campone et al., 2018)

## 5.2. Determinación de ocratoxina A en café

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los distintos métodos, variedades de cafés de diferentes países, límites de detección. A continuación se dan más detalles de los mismos.

El estudio realizado por Benites, (Benites et al., 2017) consistió en determinar la OTA en café tostado Arábica y Robusta de varios países, y el café tostado en Portugal. Para ello analizó 11 muestras de las cuales 6 eran café tostado y 5 café tostado molido. El análisis se hizo mezclando una muestra de café con un disolvente de extracción (metanol:  $\text{NaHCO}_3$ ), se filtró con un filtro de papel y se pasó por una columna de inmunoafinidad, y ésta se lavó con agua ultrapura. Para la elución de OTA utilizaron metanol: ácido acético (98:2), se inyectó a un HPLC acoplado a un detector de fluorescencia para su cuantificación, obteniendo un límite de detección de  $0.266\mu\text{g}/\text{kg}$ . Solo en 3 muestras se detectaron niveles de OTA superiores a este límite de detección.

Según Casal, (Casal et al., 2014), el café y los cereales son fuentes importantes de concentración de OTA en la dieta del ser humano. En este estudio se evaluó la presencia de OTA en café soluble, en el cual se utilizaron métodos para la extracción con columnas de inmunoafinidad (IAC) y para la cuantificación HPLC con detector de fluorescencia. Se hizo un análisis de 40 muestras comercializadas en Portugal, de las cuales 10 eran café soluble, 13 mezclas con café y 17 mezclas sin café. De estas 40 muestras, 35 dieron positivo en OTA con unas concentraciones de  $0.15$  y  $11.8\mu\text{g}/\text{kg}$ . Las muestras que obtuvieron un nivel de concentración de OTA superior de  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  superaron los límites máximos permitidos por la Unión Europea, por lo cual esos cafés no pueden ser comercializados en Europa.

En otro estudio (Mincea et al., 2016) se estudiaron los métodos para extraer OTA en el café instantáneo de forma económica, precisa y rápida. La OTA se extrajo con metanol, seguidamente se retiene con un intercambiador de aniones y finalmente para su cuantificación se utilizó cromatografía líquida de ultra-rendimiento (UPLC) acoplado a un espectrómetro de MS/MS para su detección. Este es un proceso fácil, económico y rápido para extraer y analizar OTA.

En este artículo (De Almeida et al., 2007), se realizó un estudio a 82 muestras para la determinación de la contaminación por OTA del café instantáneo de São

Paulo en Brasil. Para la extracción de la OTA se utilizaron columnas de inmunoafinidad y para la detección y la cuantificación se empleó HPLC con detector de fluorescencia. En este estudio, de las 82 muestras analizadas resultaron estar contaminadas el 98.8% con unos niveles de concentración de OTA entre 0.17µg/Kg y 6.29µg/Kg. Estos niveles están dentro de los límites máximos permitidos de OTA para el café instantáneo de 10µg/kg.

En este estudio (Calzadilla & Díaz, 2010) se ha encontrado OTA en café, desde el fruto verde hasta la bebida elaborada. Para la determinación de la OTA en las muestras de café, se realizó mediante la mezcla de la muestra con metanol: hidrógeno carbonato de sodio (1:1). La solución se filtró y de ahí se tomó otra cantidad de extracto para la dilución con PBS y ya se pasó a una columna de inmunoafinidad; tras una serie de lavados, se eluyó la OTA con metanol. Finalmente se inyectó al HPLC que lleva una columna de C<sub>18</sub> acoplado a un detector de fluorescencia. El análisis se realizó a 62 muestras de café tostado molido puro y mezclado, destinadas a la exportación y consumo por la población de Cuba. De las 62 muestras, 12 son café tostado puro y 50 de café tostado mezclado. El 60.3% de las muestras estaban contaminadas con OTA en unos niveles de concentración entre 0.02µg/kg y 3.24µg/kg, estas concentraciones están dentro de los límites permitidos.

Noonim (Noonim et al., 2008) realizó un estudio de 64 muestras de la ciudad de Tailandia, de las cuales, se recogieron 32 muestras secas de café de dos sitios de cultivo de la provincia de Chiang Mai y 32 muestras secas de café de dos sitios de cultivo de Chumphon. El porcentaje de muestras contaminadas por OTA fue del 94%. Las concentraciones de OTA del café Arábica fue entre 0.6µg/kg y 5.5µg/kg y las del café Robusta entre 1µg/kg y 27µg/kg. Se detectaron concentraciones bajas de OTA en todas las muestras excepto en dos muestras de cereza de café seco Robusta que tenía una concentración de 18µg/kg y 27µg/kg respectivamente, las cuales están fuera de los límites permitidos para su comercialización. El secado del café en Tailandia, tiene de costumbre realizarse en el suelo, lo cual es una gran fuente de contaminación. En este estudio utilizaron la técnica de detección ELISA para todas las muestras, para ello siguió Noonim el procedimiento de análisis del fabricante. Además de ELISA, también utilizó el LC-MS/MS para 10 muestras de granos de café que congeló con nitrógeno líquido para moler el grano. Las muestras se trataron para ser

eluidas mediante SPE y la OTA se eluyó con metanol: ácido acético y posteriormente se inyectaron en el cromatógrafo.

El objetivo de este estudio (Gopinandhan et al., 2008) fue observar la contaminación de OTA en los lotes de café verde destinados a la exportación. Se realizó un análisis de 80 muestras de café verde de las cuales el 74% de las muestras contenían OTA en unas concentraciones entre 0.2µg/kg y 13.5µg/kg. La OTA en estas muestras se determinó usando un proceso de limpieza empleando columnas de inmunoafinidad. La OTA se extrajo mediante un procedimiento de mezcla de muestra de café verde molido con una solución de metanol/hidrogeno carbonato de sodio. Una vez la muestra está preparada se pasó por una columna de inmunoafinidad eluyendo la OTA con metanol y finalmente se detectó y cuantificó mediante HPLC. De las 80 muestras analizadas, solo 21 muestras estaban por debajo del límite de detección de 0.1µg/kg y el resto se encontraron en un rango de detección de (0.2-5µg/kg). El nivel más alto detectado es el de 13.5µg/kg en cerezas de café Robusta que supera los límites máximos permitidos de la UE.

Según el estudio que realizó Batista (Batista et al., 2009), a 289 muestras de café de las cuales en el 44% no se detectó la presencia de OTA. El análisis lo hizo mediante una extracción con metanol-bicarbonato de sodio (1:1) bajo agitación mecánica y la purificación se realizó en columnas de inmunoafinidad. Finalmente la muestra se inyectó en un HPLC con detector de fluorescencia para cuantificar la cantidad de OTA presente en las muestras.

Coronel realizó un estudio (Coronel et al., 2011) en el que se analizó la OTA en café tostado molido de diferentes marcas y tipos disponibles en España. La OTA se extrajo, se limpió mediante IAC y se detectó mediante detección de fluorescencia.

En el siguiente estudio (Nielsen et al., 2015), Nielsen determinó la OTA en muestras de café verde, tostado e instantáneo, un total de 72 muestras, de las cuales solo 35 obtuvieron presencia de OTA por encima del límite de detección. La extracción se realizó por el método QuEChERS en unas condiciones ácidas, seguida de una fase sólida de intercambio aniónico en fase mixta. Se analizó mediante UHPLC-MS/MS y se cuantificó mediante dilución isotópica.

En otro estudio (Pittet & Royer, 2002), se emplea la cromatografía de capa fina para la detección de OTA. En la extracción de OTA se basa en una mezcla de ácido fosfórico y diclorometano, y en la purificación se utiliza la separación por cromatografía capa fina (CCF) en fase normal de hidrógeno carbonato de sodio. La detección la realizaron de forma visual mediante una lámpara de UV a una longitud de onda de 366nm. Se hizo este análisis para café verde. Los resultados obtenidos con CCF se compararon con los métodos de inmunoafinidad/HPLC, y se pueden observar unos resultados excelentes sin diferencias apreciables. La CCF puede llegar a ser una alternativa al HPLC ya que es una técnica rápida, simple y muy barata.

**Tabla 8.** Tipos de técnicas extracción y cuantificación de OTA en distintos tipos de cafés.

MUESTRA	EXTRACCIÓN	TÉCNICA	LD (µg/kg)	REFERENCIA
<b>Granos de café verde</b>	Elución: ácido fosfórico- diclorometano	CCF	10	(Pittet & Royer, 2002)
<b>Café instantáneo de Brasil</b>	IAC	HPLC-FLD	0.16	(De Almeida, A.P., et al 2007)
<b>Grano café verde</b>	SPE Elución: metanol	LC-MS/MS	0.5	(Noonim et al., 2008)
<b>Café verde de india</b>	IAC Elución: metanol	HPLC-FLD	0.1	(Gopinandhan et al., 2008)
<b>Café verde de Brasil</b>	IAC Elución: Metanol-bicarbonato de sodio	HPLC-FLD	0.12	(Batista et al., 2009)
<b>Café tostado</b>	IAC Elución: metanol	HPLC-FLD	0.02	(Calzadilla & Díaz, 2010)
<b>Café tostado de España</b>	IAC	HPLC-FLC	1.16	(Coronel et al., 2011)
<b>Café soluble Portugués</b>	IAC	HPLD-FLD	0.05	(Casal et al., 2014)
<b>Café verde Café tostado Café instantáneo</b>	QUECHERS	UHPLC MS/MS	0.33 0.53 13	(Nielsen et al., 2015)
<b>Café instantáneo</b>	Extracción: metanol Retención: intercambiador de aniones	UPLC MS/MS	0.05	(Mincea et al., 2016)
<b>Café tostado portugués</b>	IAC Elución: metanol-ácido acético	HPLC-FLD	0.266	(Benites et al., 2017)



## 6. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado se ha hecho una revisión y una comparación de los métodos de tratamiento de muestra y análisis que se han utilizado hasta la actualidad para la determinación de OTA en los alimentos en que se encuentra con más abundancia, que son el vino y el café.

Del estudio del estado actual de la problemática y métodos de análisis para la determinación de OTA en alimentos se han obtenido una serie de conclusiones como las mencionadas a continuación:

- En general la primera fuente de contaminación de un alimento debe de estar controlado por unas buenas prácticas agrícolas, evitando así la gran toxicidad tanto en humanos como en animales.
- Las técnicas de extracción empleadas con mayor frecuencia para el análisis de OTA en ambos alimentos son SPE y IAC, debido a que son unas técnicas muy sencillas y rápidas. Sin embargo, la problemática que tiene es que están limitadas a muestras líquidas.
- La técnica de detección y cuantificación más utilizada para la determinación de OTA es la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia.
- Obtenidos los datos de las concentraciones de OTA para el vino, casi todas las muestras están dentro de los límites máximos permitidos establecidos por la Unión Europea. También se llegó a la conclusión de que los vinos tintos presentan mayor concentración de OTA que los vinos blancos.
- Para las muestras de café se demostró que la fuente principal de OTA se encuentra en las cerezas de café, siendo los granos de café verde los que presentan mayor nivel de OTA, en los granos de café verde.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Amézqueta, S., González-peñas, E., Murillo-arbizu, M., & López de Cerain, A. (2009). Ochratoxin A decontamination : A review. *Food Control*, 20(4), 326-333.

Ana Luísa De Sousa, Armando Venâncio, Luís Abrunhosa. (2013). Validation of a SPE clean-up method for ochratoxin A determination in red wine. *Chemical contaminants: occurrence and surveillance*, 69.

Andrade, M. A., & Lanças, F. M. (2017). Determination of Ochratoxin A in wine by packed in-tube solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1493, 41-48.

Arroyo-manzanares, N., Huertas-pérez, J. F., Gámiz-gracia, L., & García-campaña, a N. a M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín Graseqa*, 7, 16-31.

Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., & Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, 20(9), 784-790.

Benites, A. J., Fernandes, M., Boleto, A. R., Azevedo, S., Silva, S., & Leitão, A. L. (2017). Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*, 73, 1223-1228.

Burdaspal, P., & Legarda, T. (2007). Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. *Food Additives and Contaminants*, 24(9), 976-986.

Calzadilla, C. G., & Díaz, G. G. (2010). Implementación de una metodología por HPLC para la determinación de Ocratoxina A en café tostado, 2-3.

Cámara C., Fernandez-Hernando P., Martín-Esteban A., Pérez-Conde C., Vidal M. Toma y Tratamientos de Muestras, Ed.Sintesis, Madrid, 2002.

Campone, L., Piccinelli, A. L., Celano, R., Pagano, I., Russo, M., & Rastrelli, L. (2018). Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC–MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples. *Food Chemistry*, 244, 128-135.

Casal, S., Vieira, T., Cruz, R., & Cunha, S. C. (2014). Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes. *Food Research International*, 61, 56-60.

Codex, alime. (2014). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas CAC/RCP 51-2003 Adoptado en 2003. Enmiendas 2014 .

Comisión Europea. (2006a). Reglamento (CE) nº 1881/2206 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el cotenido maximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 364, 5-24.

Comisión Europea. (2006b). Reglamento (CE) nº 401/2206 de la comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 12-70.

Comisión Europea. (2006c). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the comission related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 365, 1-56.

Comisión Europea. (2010). Reglamento (UE) 105/2010 de la Comisión de 5 de febrero de 2010 que modifica el Reglamento (CE) 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a la ocratoxina A. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L35(10), 7-8.

Comision Europea. (2012). Reglamento (UE) N° 594/2012 de la Comisión de 5 de julio de 2012. *EFSA Journal*, 8(4), 1573.

Coronel, M. B., Marin, S., Cano, G., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2011). Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: Occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. *Food Control*, 22(3-4), 414-419.

De Almeida, A.P., Alaburda, J., Shundo, L., Ruvieri, V., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Sabino, M. 2007 *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), pp. 300-303.

Edite Bezerra da Rocha, M., da Chagas Oliveira, F., Erlan Feitosa Maia, F., Florindo Guedes, M. I., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165.

- Elika, Agricultura. (2013a). Ocratoxina A, 1, 1-4.
- Elika. (2013b). Ocratoxina A - Alimentación Animal - Elika. Rev: 1, 1-5
- Elika, Agricultura. (2014). Ocratoxina A en vino, 1-5.
- FAO - ONU, (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. *Estudio FAO. Alimentación y Nutrición*. Roma, ISBN 92-5-305162-0.
- Flajs, D., Domijan, A. M., Ivić, D., Cvjetković, B., & Peraica, M. (2009). ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control*, 20(6), 590-592.
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 4. Cromatografía De Líquidos De Alta Resolución. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial.*, 0-31.
- Gopinandhan, T. N., Kannan, G. S., Panneerselvam, P., Velmourougane, K., Raghuramulu, Y., & Jayarama. (2008). Survey on ochratoxin A in Indian green coffee destined for export. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 1(1), 51-57.
- Hernández, J. M. (2007). Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. *Enfermedades Hepáticas Autoinmunes*, 7, 44-52.
- Hernández, M. J., García-Moreno, M. V., Durán, E., Guillén, D., & Barroso, C. G. (2006). Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. *Analytica Chimica Acta*, 566(1), 117-121.
- Huertas-Pérez, J. F., Arroyo-Manzanares, N., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2017). Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3405-3420.
- IARC. (1987). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. *Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs*, 1-42, 139.
- IARC. (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56, 1-521.
- IARC. (2002). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 82. *IARC Press*, 82, 1-370.

Krska, R., & Kos, G. (2000). EMAN: Internet training course on modern sample preparation techniques for the determination of mycotoxins. *European Mycotoxin Awareness Network (EMAN)*, (EC project QLK1-CL-2000-01248), 1-11.

Lluís Giralt, Concha Domingo Carrasco, G. Barrios, O. Catalina, Joan Reyes Aybar. (2005). Guía básica de buenas prácticas vitícolas para minimizar la presencia de ocratoxina A en los productos vitivinícolas. *Revista de enología*, 59, ISSN-e 1697-4123.

López, F. A., García, M. E., & Fernández, S. I. (2010). Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. *Universidad Politécnica de Valencia*.

Malir, F., Ostry, V., & Novotna, E. (2013). Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 32(2), 19-33.

Markaki, P., Delpont-Binet, C., Grosso, F., & Dragacci, A. S. (2001). Determination of Ochratoxin A in Red Wine and Vinegar by Immunoaffinity High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Food Protection*, 64(4), 533-537.

Mincea, M., Ionascu, C., Kis, K., Ostafe, V. (2016). *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia* 61(2), 167-175.

Murillo-Arbizu, M. T., Amézqueta, S., González-Peñas, E., & De Cerain, A. L. (2010). Occurrence of Ochratoxin A in Southern Spanish Generous Wines under the Denomination of Origin «Jerez-Xérès-Sherry and 'Manzanilla' Sanlúcar de Barrameda». *Toxins*, 2(5), 1054-1064.

Nielsen, K. F., Ngemela, A. F., Jensen, L. B., De Medeiros, L. S., & Rasmussen, P. H. (2015). UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin a and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(3), 1029-1034.

Niessen, wilfried M.A. (2006). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Third Edition. Boca Raton: CRC Taylor & Francis 50-90.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197-202.

Ota, L., Internacional, L. A., Ota, L., Fao, M., Alimentarios, A., Europea, L. A., & Alimentaria, S. (2015). Ocratoxina a, 1-2.

Pittet, A., & Royer, D. (2002). Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 243-247.

Pradenas Canales, R. A. (2009). Cuantificación de ocratoxina A (OTA) en vinos tintos. (<https://core.ac.uk/download/pdf/46748970.pdf>).

QuEChERS, Phenomenex. (2012). An Easier QuEChERS Solution for Multi-Residue Analysis from Food.

Quintela, S., Villarán, M. C., Armentia, I. L. De, & Elejalde, E. (2011). Occurrence of ochratoxin A in Rioja Alavesa wines. *Food Chemistry*, 126(1), 302-305.

Ramos, A.J.; Marín, S.; Sanchis, V. (2011). Micotoxinas. Introducción histórica. A.J. Ramos (Ed.), *Micotoxinas y micotoxicosis*. AMV Ediciones, Madrid, 1-18.

Ravelo Abreu, A., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A. J., & Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226.

Scott, P. M., & Trucksess, M. W. (1997). Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International*, 80(5), 941-949.

Serrano-colli, hector alejando, & Cardona-castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos, 29(1), 143-152.

Soriano del Castillo, José Miguel. (2007) *Micotoxinas en alimentos*. Editorial: Díaz de Santos, 1(1), 1-424.

Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2008). Survey: Ochratoxin A in European special wines. *Food Chemistry*, 108(2), 593-599.

Wikimedia:[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/Liquid\\_Chromatography\\_Mass\\_Spectrometer.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/Liquid_Chromatography_Mass_Spectrometer.png).