



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**AFLATOXINAS B1 Y M1:
PROBLEMÁTICA Y MÉTODOS
DE ANÁLISIS PARA SU
DETERMINACIÓN EN PIENSOS
Y LECHE**

Alumna: Ana Moral Valderrama

Julio, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN QUÍMICA

Trabajo Fin de Grado

**AFLATOXINAS B1 Y M1:
PROBLEMÁTICA Y MÉTODOS
DE ANÁLISIS PARA SU
DETERMINACIÓN EN PIENSOS
Y LECHE**

Alumna: Ana Moral Valderrama
Jaén, Julio de 2017

Fdo. Ana Moral Valderrama

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Micotoxinas.....	2
2.1.1. Concepto y origen.....	2
2.1.2. Tipos.....	3
2.1.3. Toxicidad.....	4
2.2. Aflatoxinas.....	5
2.2.1. Concepto y origen.....	5
2.2.2. Aflatoxina B1.....	6
2.2.3. Aflatoxina M1.....	7
2.2.4. Ruta metabólica desde aflatoxina B1 a aflatoxina M1.....	7
2.2.5. Relación entre la cantidad de aflatoxina B1 ingerida y la de aflatoxina M1 excretada.....	8
2.3. Métodos para la reducción de micotoxinas en alimentos.....	10
2.4. Normativa sobre contenidos máximos de aflatoxinas en alimentos.....	14
2.5. Técnicas de extracción y purificación de aflatoxinas en piensos y leche....	17
2.6. Técnicas de análisis de aflatoxinas en piensos y leche.....	20
3. OBJETIVOS.....	23
4. REVISIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS B1 Y M1.....	24
4.1. Determinación de aflatoxina B1 en piensos.....	24
4.2. Determinación de aflatoxina M1 en leche.....	30
5. CONCLUSIONES.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	40

1. RESUMEN / ABSTRACT

Las micotoxinas son metabolitos secundarios derivados de hongos, principalmente de las especies *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Dentro de este amplio grupo de contaminantes se encuentran las aflatoxinas, entre las que destaca la aflatoxina B1 por su alta toxicidad. En el presente trabajo se han estudiado las características, toxicidad y relación entre la aflatoxina B1 y la aflatoxina M1, obtenida de la biotransformación de aflatoxina B1 en el hígado de las vacas, así como la normativa sobre el contenido de ambas en piensos y leche.

Se han revisado por otra parte las técnicas utilizadas usualmente para la extracción de ambas aflatoxinas, entre las que destacan la extracción sólido-líquido para aflatoxina B1 en piensos y la extracción en fase sólida para la aflatoxina M1 en leche. En cuanto a las técnicas de determinación cuantitativa utilizadas para el análisis de ambos compuestos se ha comprobado que las más frecuentes son la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Acoplada a un Detector Fluorescente y los inmunoensayos enzimáticos.

Mycotoxins are secondary metabolites derived from fungi, mainly of the species *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Within this broad group of contaminants are aflatoxins, among which aflatoxin B1 stands out for its high toxicity. In the present work, it has been studied the characteristics, toxicity and connection between aflatoxin B1 and aflatoxin M1, obtained from the biotransformation of aflatoxin B1 in the cows's liver, as well as the regulation on the content of both in feeds and milk.

Techniques of extraction of both aflatoxin, usually used, have been reviewed. Solid-liquid extraction for aflatoxin B1 in feed and solid phase extraction for aflatoxin M1 in milk have proven to be the most outstanding. Regarding, techniques of quantitative determination for the analysis of both compounds, the most frequently utilized are high resolution chromatography coupled to a fluorescent detector and enzyme linked immunosorbed assay.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Micotoxinas.

2.1.1. Concepto y origen.

El término micotoxina deriva de dos palabras: “mukes” que hace referencia a “hongos” (griego) y “toxicum” que se refiere a “veneno” (latín).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por algunas de las cepas de hongos filamentosos pertenecientes principalmente a especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, que invaden los cultivos de campo y pueden crecer en los alimentos durante el almacenamiento en condiciones favorables.

La naturaleza y la cantidad de micotoxinas producidas van a depender de varios factores como son los tipos de sustrato, la nutrición disponible, el contenido de humedad, la competencia de otros microorganismos, la temperatura, la humedad del ambiente circundante, la concurrencia con otros hongos, los factores de estrés y el daño físico del sustrato debido a la actividad de los insectos entre otros factores (Bhat et al., 2010). Un ejemplo de condiciones favorables para que se produzcan micotoxinas sería un ambiente con una temperatura entre 10 y 40°C, con un rango de pH de 4 a 8 y donde el nivel de actividad del agua esté por encima de 0.70.

Por otro lado, las condiciones de crecimiento de una especie fúngica pueden depender de las etapas de la postcosecha. Por ejemplo: especies de *Aspergillus* y *Penicillium* pueden crecer con actividad acuosa baja y, a temperaturas más altas que la especie *Fusarium*, que suele crecer más a bajas temperaturas y con una alta actividad acuosa (Bhat et al., 2010). Algunos 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. Algunos de los metabolitos secundarios producidos por hongos como son fumagilina, ácido fusárico y ácido micofenólico, se han utilizado como agentes terapéuticos, mientras que otros metabolitos se consideran potentes toxinas.

Las micotoxinas se metabolizan normalmente en el hígado, en los riñones y por microorganismos en el tracto digestivo. Éstas pueden entrar en la cadena alimentaria directamente a través de productos vegetales como son los granos de cereales, café, semillas oleaginosas, especias, jugos de frutas y bebidas (vino y

cerveza) e indirectamente por la dieta de los animales como pastos y piensos contaminados con micotoxinas, que pueden dejar residuos en la leche, carne y otros productos. En la figura 1 se puede observar un tipo de cereal, concretamente maíz, contaminado por micotoxinas.



Figura 1. Comida de aves de corral (maíz) contaminada por micotoxinas¹.

2.1.2. Tipos.

En la tabla 1 (Karlovsky et al., 2016) se recogen los principales tipos de micotoxinas que se conocen de acuerdo con el tipo de hongo que las producen y algunos de los cultivos afectados por estas toxinas.

Tabla 1. Principales tipos de micotoxinas (Elaboración propia).

MICOTOXINA	HONGOS PRODUCTORES	CULTIVOS AFECTADOS
Aflatoxina B1,B2,G1,G2, M1 y M2	Aspergillus parasiticus, Aspergillus flavus, Aspergillus nomius	Frutos secos, maíz, semilla de algodón, trigo, cebada, granos de cacao, arroz, especias, higos
Ocratoxina A Ocratoxina B	Aspergillus alutaceus, Aspergillus carbonarius, Penicillium verrucosum	Legumbres, semillas oleaginosas, frutos secos, café, vino, jugo de uva, cacao, especias, productos cárnicos
Fumonisinias B1,B2,B3	Fusarium verticillioides, Fusarium proliferatum, Aspergillus niger	Maíz, Uvas

¹ <http://agronomag.com/wp-content/uploads/2017/03/corn-rots-aspergillus.jpg>

Tabla 1 (continuación). Principales tipos de micotoxinas (Elaboración propia).

MICOTOXINA	HONGOS PRODUCTORES	CULTIVOS AFECTADOS
Tricotecenos tipo A diacetoxiscirpenol, neosolaniol y toxinas T-2, HT- 2 , nivalenol	Fusarium sporotrichioides, Fusarium langsethiae, Fusarium poeae y Fusarium cerealis, Fusarium culmorum y Fusarium graminearum	Cereales
Tricotecenos tipo B Deoxinivalenol y sus derivados acetilados (3- y 15- acetil-deoxinivalenol)	Fusarium graminearum, Fusarium culmorum	Trigo, maíz, cebada, avena, centeno, arroz
Zearalenona	Fusarium spp	Todo tipo de granos
Patulina	Byssochlamys spp, Penicillium spp, Aspergillus spp	Frutas, aceitunas y cereales
Alcaloides de Ergot	Claviceps spp, Claviceps purpurea	Cereales

2.1.3. Toxicidad.

Los seres humanos están expuestos al riesgo de contaminación por micotoxinas debido al consumo directo de productos alimenticios contaminados por las mismas. La comida para animales (heno y paja) puede ser contaminada por hongos durante la etapa de precosecha y posteriormente de polvo micelial durante las etapas de secado. Los animales que se alimentan de ensilado y heno contaminado pueden llegar a sufrir micosis pulmonar, aborto o mastitis.

Las micotoxinas son sustancias muy tóxicas y los efectos que producen son mutagénicos, cancerígenos, teratogénicos e inmunosupresores. La ingesta de este tipo de toxinas a través de los alimentos puede dar lugar a una serie de trastornos diferentes denominando a esta enfermedad generalmente micotoxicosis. Los síntomas generales de la ingesta de micotoxinas en seres humanos suelen ser vómitos, diarreas y otros problemas gastrointestinales. El sistema inmunológico también se ve afectado tras la ingesta de micotoxinas, algunas de las cuales pueden suprimirlo, como es el caso de los tricotecenos, que pueden llegar a reducir la inmunidad y a inhibir la proliferación celular y la síntesis de proteínas.

Las micotoxinas producidas en los piensos de animales suelen causar irritación del tracto digestivo y pueden llegar a reducir la absorción de nutrientes en el animal, así como dañar el sistema exocrino y endocrino de éstos.

La *International Agency for Research on Cancer* IARC ha realizado una clasificación de agentes evaluados con pruebas científicas, para saber su carcinogenicidad. Esta clasificación se ha hecho en cinco grupos, ordenados de mayor a menor grado de riesgo de cáncer (Grupo 1, 2A, 2B, 3, 4). Según la IARC las micotoxinas más problemáticas son la ocratoxina A, las fumonisinas y las aflatoxinas. En 1987 la IARC clasificó a las aflatoxinas dentro del Grupo 1, es decir, como carcinogénicas para humanos (IARC, 1987). Esto fue reafirmado en otras tres re-evaluaciones en 1993, 2002 y 2012 (IARC, 2012).

2.2. Aflatoxinas.

2.2.1. Concepto y origen.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por las especies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Flores-Flores et al., 2015). El término aflatoxina deriva de la combinación de “a” que significa *Aspergillus*, “fla” que significa que proviene de especies *flavus* y “toxina” que significa veneno. Los tipos de aflatoxinas más comúnmente conocidos son B1, B2, G1, G2 y M1. Se llaman B y G porque el color fluorescente que se ve bajo la luz ultravioleta es azul (blue) y verde (green), y la M1 se denomina así porque es un metabolito de la B1.

Este tipo de toxinas se caracterizan por ser inodoras, insípidas e incoloras. Éstas son estables en los alimentos, resistentes a la degradación, por lo que su eliminación es difícil una vez que se han producido. Las aflatoxinas son solubles en disolventes como el cloroformo, benceno y metanol, tienen bajo peso molecular y un amplio espectro de toxicidad, son inestables a la luz UV y muy estables a temperaturas superiores a 100°C, siendo su descomposición cuando se someten a horneado y pasteurizado muy baja o inexistente.

Las aflatoxinas tienen una estructura policíclica derivada de un núcleo de cumarina unido a un sistema bifurano. Concretamente, las de tipo B conectadas a una ciclopentanona y las de tipo G conectadas a un anillo lactónico. El anillo lactónico es la parte más reactiva de una aflatoxina y el núcleo bifurano es la parte que hace que ésta tenga mayor rigidez. Las aflatoxinas generalmente son moléculas lipofílicas y, como el hígado es un órgano lipofílico, cuando son transportadas por el

torrente sanguíneo se almacenan y concentran en los hepatocitos. Estos compuestos pueden producir algún tipo de cáncer cuando un órgano está constantemente expuesto a ellas (Campagnollo et al., 2016).

Las aflatoxinas se pueden encontrar tanto en productos alimenticios para animales como para humanos. Algunos de los productos agrícolas en los que se pueden encontrar estas toxinas son cereales (maíz, arroz, trigo), especias (chiles, pimienta negra, cilantro, cúrcuma, jengibre), frutos secos (pistachos, almendras, nuez), semillas oleaginosas (girasol, soja, cacahuete), leche (animal y humana) y mantequilla.

Este tipo de toxinas se producen en ambientes con condiciones favorables. Se ha demostrado que la temperatura óptima para el crecimiento de la especie *Aspergillus flavus* está entre 29°C y 35°C, con la máxima producción de aflatoxinas a los 24°C y ninguna producción a temperaturas por debajo de los 13°C o por encima de los 42°C. Además la producción de aflatoxinas va a depender del tiempo de cosecha del alimento, de las condiciones de secado del mismo, de la composición química del sustrato, del contenido en agua y de las condiciones ambientales (temperatura y humedad). Otros factores que pueden influir en la producción de aflatoxinas son los daños mecánicos a los alimentos, la aplicación de pesticidas y fungicidas, la presencia de dióxido de carbono y oxígeno, etc.

Por otro lado, estas toxinas pueden ser consideradas también como inmunosupresoras, mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas (Flores-Flores et al., 2015), representando un riesgo para la salud humana por su extensa contaminación pre-cosecha de diferentes alimentos y porque pueden aparecer también en la leche como consecuencia de la ingestión de piensos contaminados por los animales (Perrone et al., 2017).

2.2.2. Aflatoxina B1.

La aflatoxina B1 (AFB1) tiene una estructura formada por un núcleo cumarínico, otro bifurano, y una ciclopentanona (figura 2).

Entre todos los tipos de aflatoxinas, la AFB1 es la que se encuentra más frecuentemente en los alimentos y a la vez la más tóxica. Datos epidemiológicos implican a la AFB1 como un componente del cáncer de hígado en los seres humanos en ciertas partes del mundo. Además esta aflatoxina exhibe propiedades hepatocarcinogénicas y hepatotóxicas (Perrone et al., 2017).

Cuando la AFB1 es ingerida, es biodegradada en el hígado por el sistema enzimático del citocromo P450. A continuación, la AFB1 puede unirse a macromoléculas celulares, incluyendo el material genético (proteínas y ADN), formando aductos con ácidos nucleicos. Dichos aductos se convierten en un anillo abierto estable derivado de formamidopiridina y la reparación de estas lesiones conduce a la aparición de cáncer y mutaciones genéticas. Los metabolitos hidroxilados y otras aflatoxinas que ocurren naturalmente no son sustratos adecuados para la reacción de epoxidación y por esto son menos carcinógenos y mutagénicos (Campagnollo et al., 2016).

2.2.3. Aflatoxina M1.

La aflatoxina M1 (AFM1) es un metabolito hidroxilado de la AFB1 que se encuentra en la leche de los animales que consumen alimentos contaminados por la AFB1 (figura 2). La contaminación de la leche y sus productos derivados por AFM1 es un problema grave, ya que la leche es un alimento muy consumido tanto por seres humanos como por animales, y dentro de los seres humanos, los bebés son más sensibles a las toxinas que los adultos.

En comparación con la AFB1, la AFM1 es menos carcinogénica y mutagénica, pero ha presentado un nivel alto de actividad genotóxica en animales. La AFM1 ha sido detectada en leche pasteurizada, leche en polvo, leche tratada y otros productos lácteos. La contaminación de la leche por dicha aflatoxina puede ocurrir directamente por la ingestión de piensos contaminados por animales o indirectamente por la contaminación de los productos lácteos con hongos.

La presencia de AFM1 en la leche varía en función de numerosos factores como la especie animal, la lactancia, la variabilidad de individuos, el ordeño, la salud del animal y de la ubre, la ingesta del alimento, la ubicación geográfica, el nivel de contaminación del pienso y la estación del año (Campanollo et al., 2016).

2.2.4. Ruta metabólica desde aflatoxina B1 a aflatoxina M1.

Cuando el ganado ingiere la AFB1 a través de piensos contaminados, una parte de ésta es degradada en el rumen por microorganismos residentes dando lugar a la formación de aflatoxicol. La AFB1 se metaboliza, principalmente, por el sistema microsomal oxidasa de función mixta (MFO), que es una organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unidas al

citocromo P-450, el cual desempeña un papel importante en la metabolización de la AFB1 y ocasiona su transformación en la AFM1 (figura 2).



Figura 2. Biotransformación hepática de la AFB1 a la AFM1².

2.2.5. Relación entre la cantidad de aflatoxina B1 ingerida y la de aflatoxina M1 excretada.

La concentración de AFM1 excretada por los animales en la leche va a depender de varios factores como la raza de la vaca, la concentración de AFB1 ingerida, la salud y el sistema metabólico del animal. Estos factores pueden provocar que la cantidad de AFM1 varíe entre animales y de un día para otro. Aproximadamente del 0.3% al 6.2% de la AFB1 total ingerida por los animales se transforma generalmente en AFM1 en la leche. En un trabajo científico, la excreción total de la AFM1 se ve afectada también por el rendimiento en leche, presentando las vacas de alto rendimiento lechero una mayor excreción de AFM1 en comparación con las vacas de bajo rendimiento lechero (Campagnollo et al., 2016).

Existen discrepancias a la hora de hablar de la excreción de AFM1 después de haber ingerido AFB1 contenida en piensos, tanto del tiempo que tarda la AFM1 en ser excretada en la leche y el tiempo que tarda ésta en desaparecer si se elimina de la dieta del animal los piensos contaminados por la AFB1. Estas diferencias entre autores se deben a lo dicho anteriormente, sobre todo al sistema metabólico de cada animal.

² Elaboración propia.

Según Nachtmann (Nachtmann et al., 2007) la excreción de AFM1 en la leche comienza después de 12-24 horas tras la ingesta de pienso contaminado, alcanzando niveles altos en pocos días y desapareciendo aproximadamente 24 horas después de haber sido eliminado de la dieta.

Según Prandini (Prandini et al., 2009) las vacas que ingieren una cantidad de AFB1 menor de 40 µg/vaca/día, producen leche con un contenido de AFM1 menor de 0.05 µg/kg. Además dice que las reacciones de producción de la AFM1 son muy rápidas, ya que dicha aflatoxina aparece en la leche dos o tres días después de comer alimentos contaminados, así como el nivel de AFM1 en leche se reduce a cero en dos o tres días después de que el animal se alimente con una dieta sin la presencia de aflatoxinas.

Otro de los estudios realizados por Battacone (Battacone et al., 2005) sobre muestras de leche de oveja, demuestra que la AFM1 se detectó en esta leche 12 horas después de la ingesta de piensos contaminados con la toxina. Al séptimo día se eliminó de la dieta del animal el pienso contaminado y se observó un gran descenso en las concentraciones de AFM1 en la leche. Después de otros cuatro días no se detectó ninguna concentración de AFM1 en las muestras de leche.

En la tabla 2 se muestra la relación existente entre la cantidad de AFB1 ingerida a través de piensos y la cantidad de AFM1 excretada en la leche por vacas lecheras de la raza Holstein (Gimeno, 2004).

Tabla 2. Relación entre AFB1 y AFM1 en vacas Holstein (Elaboración propia).

AFB1 CONSUMIDA (µg/kg de pienso)	AFM1 EXCRETADA EN LECHE (µg/L)
80	1.5
86	0.245
470	13.7
557	4.7
1089	20.2
1493	12.4

Generalmente existe una relación lineal entre la cantidad ingerida de AFB1 a través de piensos y la cantidad de AFM1 excretada en la leche, pero no siempre es

así, como se puede observar en la tabla 2, ya que la excreción de AFM1 va a depender de más factores como se ha dicho anteriormente.

En otras razas de vacas lecheras se han encontrado las siguientes concentraciones de AFM1 (Gimeno, 2004):

- En vacas lecheras Brindle: por la ingesta de pienso en la vaca contaminado con 540 μg de AFB1/kg, se excreta 0.92 μg de AFM1/L de leche.
- En otras vacas:
 - Por la ingesta de pienso en la vaca contaminado con 64 μg de AFB1/kg, se excreta 0.35 μg de AFM1/L de leche.
 - Por la ingesta de pienso en la vaca contaminado con 1799 μg de AFB1/kg, se excreta 14.2 μg de AFM1/L de leche.

2.3. Métodos para la reducción de micotoxinas en alimentos.

Según Mishra (Mishra et al., 2003), cualquier proceso de desintoxicación tiene que cumplir las siguientes pautas:

- La micotoxina tiene que ser destruida o transformada en un compuesto no tóxico.
- Las esporas de hongos y las micelias deben destruirse para que no se formen de nuevo nuevas toxinas.
- El alimento o pienso debe conservar su valor nutritivo.
- Las propiedades físicas del alimento no deben cambiar mucho.
- El proceso de desintoxicación debe ser viable económicamente, es decir, no debe de costar más el método de desintoxicación que el producto que se va a tratar.

Para llevar a cabo la reducción de micotoxinas se podrían usar una gran variedad de productos químicos, como son, el metano, el amoníaco, agentes oxidantes, etc. Como la matriz que se va a tratar en este caso son alimentos, no se pueden tratar con estos productos ya que la materia prima quedaría deteriorada; por este motivo se utilizarían adsorbentes para la eliminación de estas toxinas y así reducir el riesgo de micotoxicosis en animales.

- **Adsorbentes**

Son un tipo de sustancias usadas para disminuir las micotoxinas en materias primas. Para escoger el tipo de adsorbente adecuado en cada caso, tenemos que tener en cuenta la eficacia de éste, su especificidad y el mecanismo del proceso de adsorción. Uno de los aspectos más importantes en el proceso de adsorción es saber las características del adsorbente y del adsorbato. Las características más importantes del adsorbente que se tienen que tener en cuenta son la estructura física, la distribución de carga, la carga total, el tamaño de los poros y la superficie accesible de éste. Por otro lado, las características más importantes del adsorbato que se deben de tener en cuenta, sabiendo que en este caso se trata de micotoxinas, son el tamaño de éstas, la solubilidad, la forma, su polaridad y en el caso de los compuestos ionizados, las constantes de disociación y la de distribución de carga. La eficacia del proceso de adsorción va a depender tanto del adsorbente como del adsorbato. Algunos de los adsorbentes usados para disminuir las micotoxinas en materias primas pueden ser:

-Carbón activo: este tipo de adsorbente secuestra gran parte de las micotoxinas pero presenta problemas tecnológicos. En solución acuosa puede adsorber la mayoría de las micotoxinas, pero es un adsorbente muy inespecífico por lo que también puede adsorber nutrientes esenciales del alimento que se está tratando, y por dicha razón no sería un buen adsorbente.

-Aluminosilicatos: entre ellos principalmente se encuentran las zeolitas y los aluminosilicatos hidratados de sodio y calcio (HSCAS). Las zeolitas son silicatos naturales, baratos pero con impurezas que pueden interferir en el proceso de adsorción. Los HSCAS son filosilicatos que no interfieren en la adsorción de otros nutrientes si son usados a niveles inferiores a 0.5%. Estos filosilicatos tienen una gran afinidad por la AFB1, ya que forman un complejo muy estable con ésta a temperaturas entre 25 y 37°C, y en un intervalo de pH de 2 a 10. Se dice que este tipo de silicato se usa como una “esponja inorgánica” adsorbiendo aflatoxinas del tracto gastrointestinal de animales de granja.

-Polímeros: la resina colestiramina es una resina de intercambio aniónico que se utiliza para la unión de ácidos biliares y para la disminución del colesterol en

sangre. La eficacia de este adsorbente in vitro ha destacado con ocratoxina A, zearalenona y fumonisinas.

-Levaduras y productos de levadura: usando solamente paredes celulares de levadura en lugar de células enteras de levadura, se puede mejorar la adsorción de micotoxinas ya que las paredes celulares contienen polisacáridos, proteínas y lípidos y esto hace que tengan muchos centros de adsorción. El tipo de interacciones que se van a producir en este caso serían a través de un enlace de hidrógeno, una interacción iónica o una hidrofóbica (Huwig et al., 2001).

A parte de los adsorbentes para la reducción de micotoxinas en alimentos, también existen una serie de métodos físicos, químicos y biológicos, que involucran la inactivación de la aflatoxina.

- **Métodos físicos**

En la tabla 3 se presentan algunos de los métodos físicos comúnmente usados para la reducción de aflatoxinas.

Tabla 3. Métodos físicos para la reducción de aflatoxinas (Mishra et al., 2003).

MÉTODOS	CONDICIÓN	DESTRUCCIÓN (%)
Luz del sol	Luz solar intensa en productos líquidos	99
Luz UV	Solución de cloroformo de aceite de cacahuete	45
Microondas	6KW, 4 minutos	95
Autoclave	121°C, 4 horas	95
Cocina	Vapor/Soplado	50
Asado	180°C, 30 minutos	80
Pasteurización	80°C, 45 segundos	64
Disolventes	Específico para cada disolvente	80-95

Este tipo de métodos no son muy eficaces y deterioran cualidades organolépticas de los alimentos en la mayoría de los casos.

- **Métodos químicos**

En la tabla 4 se presentan algunos de los métodos químicos comúnmente usados para la reducción de aflatoxinas. Después de la aplicación de estos métodos, pueden quedar residuos químicos dañinos tras dicha desintoxicación.

Tabla 4. Métodos químicos para la reducción de aflatoxinas (Mishra et al., 2003).

MÉTODOS	CONDICIÓN	DESTRUCCIÓN (%)
H ₂ O ₂	6% H ₂ O ₂ , 30 minutos, 80°C, pH alcalino	97
Ozono	2 horas, 100°C, 22 % humedad	100
Amoníaco	40 psig, 100°C, 4% NH ₄ OH, 30 minutos	99
Urea+ureasa	20% de urea, 2% harina de soja, luz del sol 14 horas	85
Hipoclorito de sodio	15 mg de gas Cl ₂ por 100 mg de AFB1	100
Bisulfito de sodio	0.4%, 5 minutos	45

- **Métodos biológicos**

La desintoxicación de las micotoxinas también puede lograrse enzimáticamente. Algunas enzimas capaces de transformar las micotoxinas se producen naturalmente en los productos alimenticios o se producen durante la etapa de fermentación, pero la forma más eficaz para desintoxicar un alimento sería mediante la introducción de enzimas purificadas. Por otra parte se puede llevar a cabo el aislamiento de una enzima que puede degradar la aflatoxina dando un producto no tóxico o menos tóxico que retenga el valor nutritivo y el aspecto inicial de la muestra. Una de las características más importantes de la desintoxicación enzimática es que es muy específica, y debido a esto y a su perfil toxicológico favorable, las enzimas tienen un potencial alto para desintoxicar los contaminantes orgánicos en los alimentos (Karlovsky et al., 2016).

Como se ha dicho anteriormente, también se ha estudiado la desintoxicación de micotoxinas como efecto secundario de la fermentación, que es el proceso por el cual el alimento es procesado con la ayuda de microorganismos. Algunas de las

actividades de las bacterias y de los hongos pueden transformar a las micotoxinas en productos no tóxicos, pero no se ha autorizado aun cepa microbiana como ayuda de procesamiento de la micotoxina (Karlovsy et al., 2016).

2.4. Normativa sobre contenidos máximos de aflatoxinas en alimentos.

Las aflatoxinas tienen un efecto negativo sobre la salud tanto del ser humano como de los animales, por esta razón la Unión Europea (UE) ha establecido unos límites máximos de concentración, tanto en piensos para animales como en productos alimentarios destinados al consumo humano. En alimentos se han establecido límites para la AFB1, el contenido total en aflatoxinas (suma de la aflatoxina B1, B2, G1 y G2) y el contenido en AFM1. Estos límites vienen impuestos por el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión Europea (Comisión Europea, 2016), que ha sufrido una serie de modificaciones, siendo la más reciente la establecida en el texto consolidado del 1 de abril de 2016 (tabla 5).

Tabla 5. *Contenidos máximos de aflatoxinas en alimentos establecidos por la Unión Europea (Comisión Europea, 2016).*

ALIMENTO	CONTENIDOS MÁXIMOS (µg/kg)		
	AFB1	AFB1+AFB2+AFG1 +AFG2	AFM1
Cacahuetes y otras semillas oleaginosas que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o su utilización como ingredientes de productos alimenticios, con la excepción de los cacahuetes y otras semillas oleaginosas que vayan a molerse para la producción de aceite vegetal refinado	8	15	--
Almendras, pistachos y huesos de albaricoque que vayan a someterse a un proceso de selección, u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	12	15	--
Avellanas y nueces de Brasil que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	8	15	--
Frutos de cáscara arbóreos, salvo los reflejados anteriormente, que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5	10	--

Tabla 5 (continuación). Contenidos máximos de aflatoxinas en alimentos establecidos por la Unión Europea (Comisión Europea, 2016).

ALIMENTO	CONTENIDOS MÁXIMOS (µg/kg)		
	AFB1	AFB1+AFB2+AFG1+AFG2	AFM1
Cacahuetes y otras semillas oleaginosas y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes en los productos alimenticios, con la excepción de aceites vegetales crudos destinados a ser refinados y aceites vegetales refinados	2	4	--
Almendras, pistachos y huesos de albaricoque destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	8	10	--
Avellanas y nueces de Brasil destinadas al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de producción alimenticios	5	10	--
Frutos de cáscara arbóreos, distintos a los reflejados anteriormente y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o utilizarse como ingredientes de productos alimenticios	2	4	--
Frutos secos, distintos de los higos secos, destinados a ser sometidos a un proceso de selección u otro tratamiento físico, antes del consumo humano o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	5	10	--
Frutos secos, distintos a los higos secos, y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes en los productos alimenticios	2	4	--
Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos de cereales transformados, salvo los productos alimenticios indicados en los tres siguientes puntos	2	4	--
Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios	5	10	--
Alimentos a base de cereales transformados y alimentos para lactantes y niños de corta edad	0.10	--	--
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0.10	--	0.025
Leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos	--	--	0.050
Siguientes tipos de especias: Capsicum spp. (frutas pasas de dicho género, enteras o molidas, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón). Piper spp. (frutos de dicho género, con inclusión de la pimienta blanca y negra). Myristica fragrans (nuez moscada). Zingiber officinale (jengibre). Curcuma longa (Cúrcuma) y mezclas de especias que contengan una o varias de estas especias	5	10	--
Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	--	--	0.025
Higos secos	6	10	--

El contenido máximo de aflatoxinas en la alimentación animal viene establecido en la Directiva 2003/100/CE de la Comisión Europea del 31 de octubre de 2003 (Comisión Europea, 2003), dicho contenido se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Contenidos máximos de AFB1 en piensos establecidos por la Unión Europea (Comisión Europea, 2003).

ALIMENTACIÓN ANIMAL	CONTENIDO MÁXIMO DE AFB1 EN PIENSOS, CALCULADO SOBRE LA BASE DE UN CONTENIDO DE HUMEDAD DEL 12 % (mg/kg)
Todas las materias primas para la alimentación animal	0.02
Piensos completos para bovinos, ovinos y caprinos, excepto:	0.02
-piensos completos para ganado lechero	0.005
-piensos completos para terneras y corderos	0.01
Piensos completos para cerdos y aves de corral (excepto animales jóvenes)	0.02
Otros piensos completos	0.01
Pienso complementario para bovinos, ovinos y caprinos (excepto piensos complementarios para ganado lechero, terneras y corderos)	0.02
Piensos complementarios para cerdos y aves de corral (excepto animales jóvenes)	0.02
Otros piensos complementarios	0.005

En España el Real Decreto 475/1988 estableció también unos límites máximos permitidos de aflatoxinas para alimentos destinados al consumo humano, 10 µg/kg para el contenido máximo total de aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) y 5 µg/kg para el contenido máximo de AFB1 (BOE, 1988).

Aunque se han establecido límites para regular las aflatoxinas a nivel mundial e internacional, muchos países han impuesto sus propios límites.

En Brasil, el nivel máximo de aflatoxinas en cacahuetes y maíz es de 20 µg/kg. En China, el nivel máximo de AFB1 en maíz, grano de cacahuete y aceite de cacahuete es de 20 µg/kg. En Corea, el nivel máximo de AFB1 en todos los alimentos es de 10 µg/kg. En Suiza, Países Bajos y Estados Unidos, el límite de

AFB1 en frutos secos es de 1 µg/kg, 5 µg/kg y 20 µg/kg. En Suiza y Austria, los niveles de AFM1 en leche, queso y mantequilla son de 0.05 µg/kg, 0.25 µg/kg y 0.02 µg/kg (Xie et al., 2016).

En Estados Unidos, el Departamento de Agricultura (USDA) y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) han establecido como nivel máximo de aflatoxinas 15 o 20 µg/kg en piensos. La FDA ha establecido el nivel máximo de AFM1 en leche de 500 ng/ L (Xie et al., 2016).

Se puede decir que hay una falta de acuerdo entre los países sobre el límite máximo de AFM1 en todo el mundo, y esto afecta al comercio de algunos de los productos, ya que estos son aceptados en algunos países y en otros no, dependiendo del nivel máximo de AFM1 tolerable en cada país (Campagnollo et al., 2016).

2.5. Técnicas de extracción y purificación de aflatoxinas en piensos y leche.

Cualquier método analítico conlleva las siguientes etapas: toma de muestra (etapa que es una gran fuente de error), preparación de la muestra, separación del analito de la muestra, eliminación de posibles interferentes de la matriz, medida analítica y análisis de resultados.

En el caso de los piensos para el análisis de la AFB1, se hace la toma de muestra de piensos diversos y a continuación se muelen y se homogenizan usando un molino estándar. En el caso de la leche para el análisis de la AFM1, se suelen coger muestras de leche de diferentes vacas a diferentes días de su alimentación con piensos contaminados por la AFB1, después estas muestras de leche se llevan al laboratorio y se mantienen a unos -20°C hasta su análisis (Ullah et al., 2016).

A continuación se muestran las técnicas habitualmente utilizadas para la extracción de la AFB1 y AFM1 para su análisis en piensos y leche, respectivamente.

- Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica preparativa para limpiar y preconcentrar la muestra previamente a la correspondiente cuantificación de la concentración del analito. El material del soporte usado es sólido, y a través de éste

pasa un líquido o un gas. Como se puede observar en la figura 3, las etapas de esta técnica son el acondicionamiento del soporte sólido, adición de la muestra (donde los analitos son absorbidos en dicho soporte) y después lavado y elución de estos analitos dependiendo de su afinidad entre el material absorbente y la fase móvil.

La mayor ventaja de esta técnica es que permite la extracción, la preconcentración y la purificación en un solo paso sin aumentar el contenido de la matriz en el extracto final.

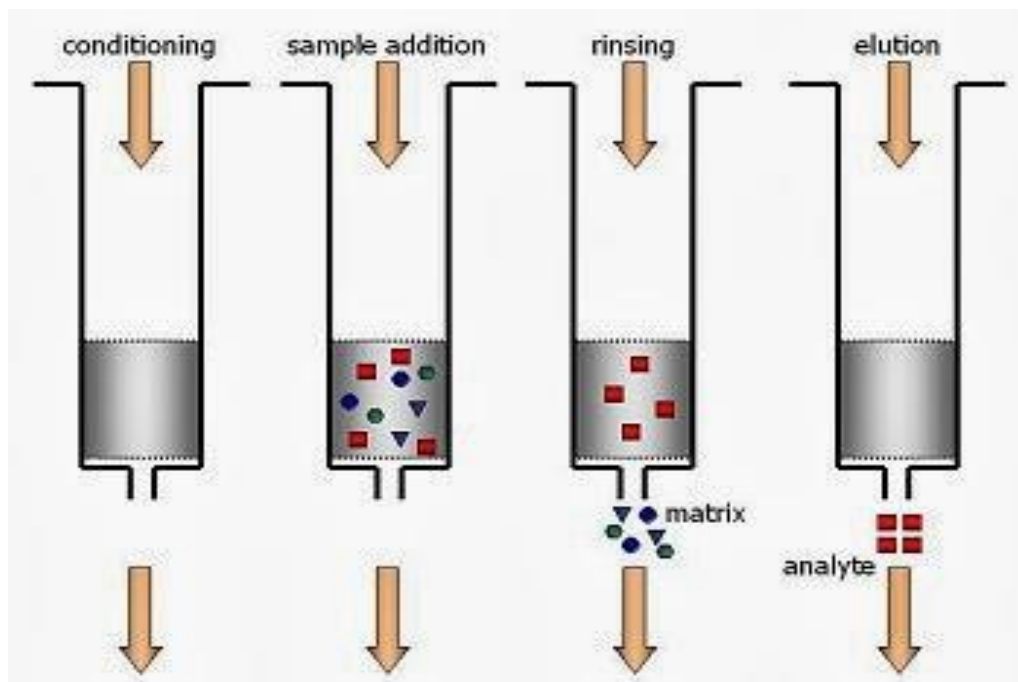


Figura 3. Etapas de la extracción en fase sólida (SPE)³.

- Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido (LLE) es una técnica que consiste en la separación de una de las dos sustancias de una mezcla, usando un disolvente orgánico ya que una de las sustancias que compone la mezcla tiene las mismas propiedades de dicho disolvente, por lo tanto, se uniría a él y se distinguirían dos fases en el embudo de decantación. Una de las fases es la fase acuosa, y la otra la fase orgánica con la sustancia que queremos obtener.

³

https://www.researchgate.net/publication/265192271_INTERNET_TRAINING_COURSE_ON_MODERN_SAMPLE_PREPARATION_TECHNIQUES_FOR_THE_DETERMINATION_OF_MYCOTOXINS

- Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido (SLE) es una técnica que consiste en la separación de uno o varios constituyentes solubles contenidos en un sólido inerte mediante la utilización de un disolvente adecuado. En un proceso de extracción sólido-líquido las operaciones implicadas son: cambio de fase del soluto, difusión del soluto a través del disolvente contenido en los poros del sólido inerte y la transferencia del soluto desde las inmediaciones de la interfase sólido/líquido hasta el seno de la masa principal de disolvente.

- Microextracción líquido-líquido dispersiva

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) es una técnica que sirve para la extracción y concentración de analitos. La muestra de la que los analitos pretenden ser extraídos es una fase acuosa, y se le añade una mezcla de dos disolventes orgánicos, uno miscible con agua y que funciona como agente dispersante y otro inmisible con el agua y miscible con el agente dispersante y de mayor densidad, agente extractante.

La mezcla dispersante-extractante se pone en contacto con la fase acuosa en un tubo cónico y se forma una emulsión, así se favorece la transición del analito entre la muestra y el extractante. Después se centrifuga y se obtiene una separación en dos fases, la primera que conlleva el agente extractante (que se encuentra en el fondo) más los analitos extraídos, y la segunda fase es la fase acuosa más el agente dispersante. En la figura 4 se pueden observar las distintas etapas de esta extracción.

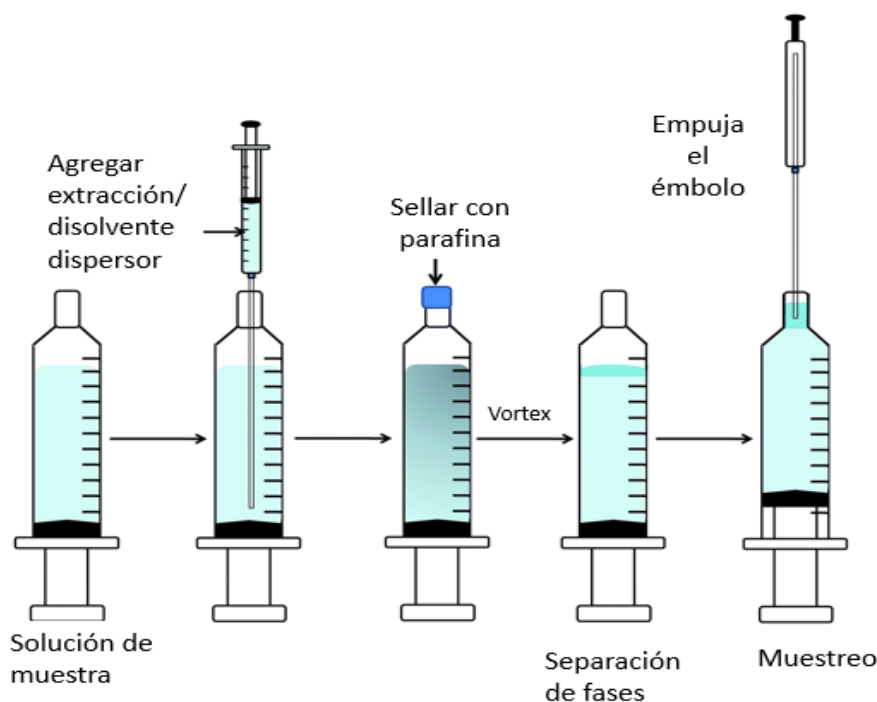


Figura 4. Etapas de la microextracción líquido-líquido dispersiva⁴.

2.6. Técnicas de análisis de aflatoxinas en piensos y leche.

Las técnicas de análisis principalmente usadas para la determinación de aflatoxinas en piensos y leche son las siguientes.

- Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación analítica, que se lleva a cabo gracias a la afinidad del analito por una de las fases, la estacionaria o la móvil. En ésta, un líquido (fase móvil), circula en contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria). Al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de la fase móvil, cada uno de los analitos va a avanzar a una velocidad distinta, dependiendo de la afinidad que tenga éste por cada una de las fases anteriormente nombradas. Esto hace que las sustancias introducidas en el sistema eluyan a un tiempo diferente y por lo tanto se separen.

⁴ <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ay/c5ay03380b#!divAbstract>

Este tipo de cromatografía de alta resolución requiere una serie de dispositivos formando un sistema; como se puede observar en la figura 5, y estos dispositivos son:

- Dispositivo que suministra eluyentes (bomba y un dispositivo que mezcla los eluyentes)
- Dispositivo de inyección (permite introducir la muestra en el sistema)
- Columna (sistema de análisis)
- Conducciones y conexiones
- Detector y registrador

El detector de este método puede ser un detector de fluorescencia, o puede estar acoplado el cromatógrafo a un espectrómetro de Masas (MS), y éste servir de detector. Los detectores de fluorescencia para esta técnica son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofluorímetros. En la mayoría de ellos, la fluorescencia es detectada por medio de un transductor fotoeléctrico colocado a 90° respecto al haz de excitación.

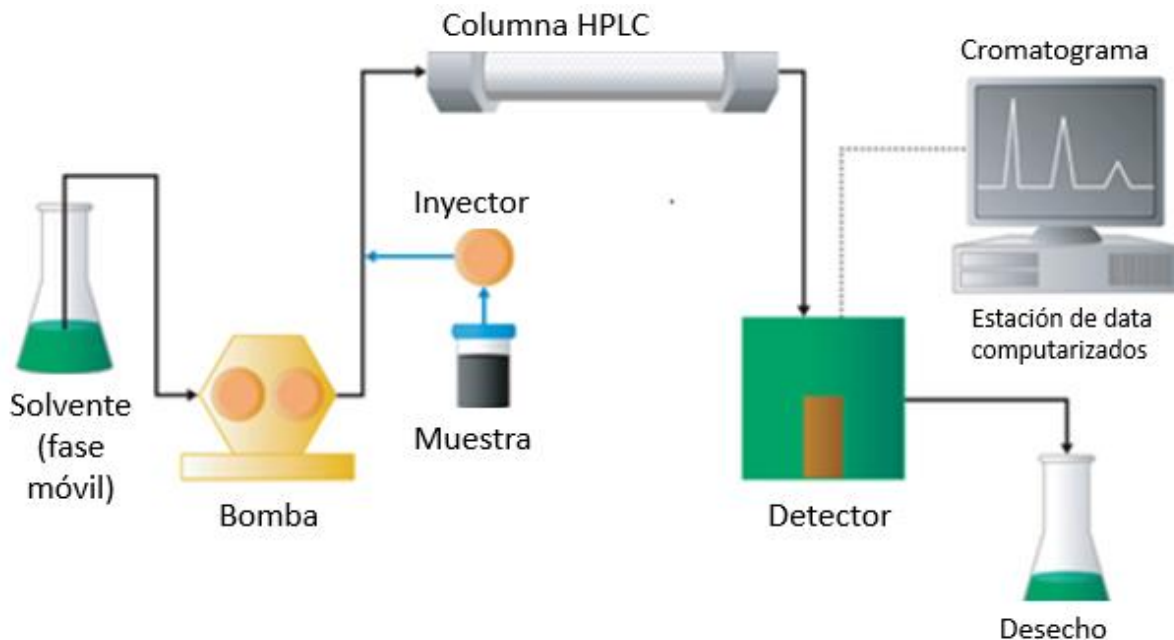


Figura 5. Esquema de un instrumento para HPLC⁵.

⁵ <http://bioquiwik1.wikispaces.com/La+hemoglobina+glicosilada?showComments=1>

- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Esta técnica llamada comúnmente ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) se basa en la realización de inmunoensayos enzimáticos, es decir, en la formación específica de los complejos antígeno-anticuerpo. Esta unión se mide a través de una reacción colorimétrica para saber la cuantificación del analito que se esté tratando.

Los diferentes tipos de ELISA se presentan en la figura 7 y son los siguientes:

-ELISA directo

En este tipo de ensayo se fijan antígenos específicos al soporte insoluble, a continuación se adicionan anticuerpos conjugados con una enzima capaz de catalizar el desarrollo de la reacción. Tras reaccionar esta enzima con el sustrato adecuado, se genera un producto coloreado con características espectroscópicas conocidas. Este tipo de ensayo no se suele utilizar mucho ya que la conjugación del anticuerpo específico y la enzima es dificultosa.

-ELISA indirecto

En este tipo de ensayo se fijan también antígenos específicos al soporte insoluble, y a continuación se adiciona la muestra problema, que contiene anticuerpos que reaccionarán específicamente con los antígenos fijados a dicho soporte. A continuación se adicionan anti-anticuerpos conjugados con una enzima, y estos reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos anteriormente. Se adiciona un sustrato que debe reaccionar con la enzima y generar un producto coloreado para cuantificar el analito problema.

-ELISA sándwich

En este tipo de ensayo se fijan anticuerpos específicos al soporte insoluble, y a continuación se adiciona la muestra problema, si ésta tiene presente el antígeno, reaccionará con los anticuerpos específicos fijados en el soporte. En el siguiente paso se adicionan anticuerpos específicos del antígeno a detectar y después se adicionan anti-anticuerpos conjugados con una enzima. Se añade el sustrato sobre el que la enzima es capaz de actuar y se genera un producto coloreado como resultado de dicha reacción.

-ELISA competitivo

En este tipo de ensayo se fijan anticuerpos específicos al soporte insoluble del antígeno a detectar. Se adiciona a continuación una concentración conocida de antígenos del anticuerpo usado anteriormente conjugado con una enzima, y de antígenos desconocidos (objeto de estudio). Paralelamente se añaden solo antígenos del anticuerpo usado en la etapa anterior. Para finalizar se adiciona un sustrato capaz de reaccionar con la enzima y tras esta reacción se produce un producto coloreado. En este caso se comparan ambos resultados y así se sabe si el antígeno (objeto de estudio) tiene que ver o no con los anticuerpos empleados en el soporte.

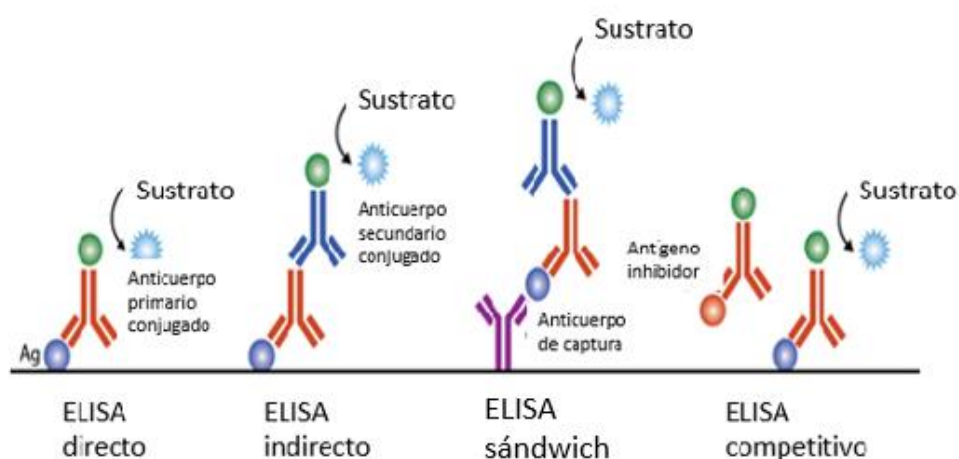


Figura 6. Etapas de un inmunoensayo enzimático (ELISA)⁶.

3. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo principal la realización de una revisión de los diferentes métodos de análisis utilizados habitualmente para la determinación de AFB1 y AFM1 en piensos y leche, haciendo especial hincapié en los métodos de pretratamiento de la muestra. Por otra parte, se pretende discutir la problemática de la existencia de AFM1 en leche como consecuencia de la contaminación de piensos animales con AFB1 y revisar las concentraciones de ambas aflatoxinas encontradas en muestras de leche y pienso de diferente procedencia.

⁶ <https://www.linkedin.com/pulse/all-you-need-know-elisa-learn-buy-experiment-innovate-biotech-kart>

4. REVISIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS B1 Y M1.

4.1. Determinación de aflatoxina B1 en piensos.

La determinación de AFB1 en piensos se puede llevar a cabo de diversas formas, tanto en lo que respecta a la etapa de extracción y purificación del analito, como a la etapa de detección y cuantificación de éste.

Según la revisión bibliográfica realizada, se puede decir que la SLE con acetonitrilo es una técnica común para la extracción de la AFB1 en los piensos, según Arroyo-Manzanares (Arroyo-Manzanares et al., 2015), seguida de una determinación cuantitativa de esta aflatoxina haciendo uso de la técnica HPLC-FLD, con un reactor fotoquímico posterior a la columna, para aumentar la fluorescencia de AFB1 y evitar el uso de reactivos de derivatización. Este autor usa una columna de fase inversa (C18), y el porcentaje de recuperación de la muestra sería del 88%.

Según Ullah (Ullah et al., 2016), la extracción y purificación de la aflatoxina se haría igual pero después de la SLE se llevaría a cabo una purificación de la muestra a través de una SPE y se utilizaría una columna de inmunoafinidad (Mycosep, 226 aflazone+ multifunctional columns, Romer Labs, USA). La utilización de las columnas de inmunoafinidad (IAC) hace que los extractos salgan bien limpios con un mínimo de interferentes en la matriz, se dice que es una técnica específica, pero a la vez presenta algunas desventajas, como que dichas columnas son caras y desechables. Después de pasar la muestra por una IAC, ésta se derivatiza con trifluoroacético y se cuantificaría la AFB1 de la misma manera, a través de HPLC-FLD.

Otra posibilidad, según Oplatowska-Stachowiak (Oplatowska-Stachowiak et al., 2016), sería hacer una SLE con metanol y después determinar la aflatoxina a través de la técnica ELISA competitiva. El porcentaje de recuperación de la muestra en este caso sería de un 101% y el porcentaje del coeficiente de variación de un 8.8 %.

La extracción y purificación de la AFB1 se puede llevar a cabo directamente haciendo una SPE, como se dice en los estudios realizados por Reiter (Reiter et al., 2009), con su correspondiente detección después a través del HPLC-FLD. Para potenciar la fluorescencia de la AFB1 se puede usar bromuro de piridinio perbromuro

(PBPB). El rango de detección en este caso sería 1-18.99 µg/kg y el porcentaje de recuperación del 80%.

Se ha estudiado también un artículo de revisión de Rahmani (Rahmani et al., 2009) en el que se comparan diferentes métodos de determinación de la AFB1 en piensos dependiendo de los autores, se vuelve a confirmar que la técnica HPLC-FLD junto con la técnica ELISA son de las más usadas, y a parte otros autores nombran otra técnica que no se ha dicho anteriormente, la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), es una técnica que sirve para detectar pero no para cuantificar el analito deseado.

Gizachew (Gizachew et al., 2016) han realizado un estudio donde se analizan 114 muestras de pienso de productores de leche y 42 muestras de pienso de productores, procesadores y comerciantes de piensos en Etiopía para saber el contenido de AFB1 en éstas. La técnica de extracción y purificación de la AFB1 utilizada es una SLE con una mezcla de acetonitrilo:agua (80%) y después una centrifugación. A continuación el analito es detectado y cuantificado a través de un ensayo ELISA. El resultado de este ensayo demuestra que todas las muestras de piensos estaban contaminadas por AFB1, donde las concentraciones encontradas variaban entre 7-419 µg/kg.

En un estudio realizado en Beja (Túnez) por Abbès (Abbès et al., 2012) se analizan 58 muestras de piensos destinados al consumo de las vacas para ver la concentración de AFB1 que contienen estas muestras. La extracción de esta aflatoxina se hace a través de una SLE con una mezcla de metanol:agua (80:20, v/v) y después se hace una purificación de esta toxina con una columna de inmunoafinidad (SPE), donde el analito, en este caso se trata de la AFB1, se eluye con metanol. Después esta aflatoxina es cuantificada a partir de la técnica ELISA competitiva, y el resultado es que 49 de las muestras analizadas dan positivo en contenido de esta aflatoxina, con una concentración media de 18.66 µg/kg.

Se ha realizado un estudio en el sur y norte de China por Han (Han et al., 2013), donde se analizan 200 muestras de piensos para vacas recogidas en 2010, para determinar su contenido en AFB1. Para llevar a cabo la extracción de esta aflatoxina se realiza una SLE con metanol al 70% (v/v) y la purificación de ésta se lleva a cabo a través de una IAC (Aflaprep, R-Biopharm Rhone Ltd, Scotland, UK). Esta aflatoxina en este estudio es cuantificada por la técnica HPLC-FLD, donde se usa de fase móvil metanol-acetonitrilo-agua (22-22-56, v-v-v). Con el resultado de

este estudio se concluye que el 42% de las muestras de pienso analizadas contienen AFB1 en un rango de concentración de 0.05-3.53 µg/kg. Este valor está por debajo de los límites legales, tanto en la UE que el límite es de 5 µg/kg, como en China, donde este límite es de 10 µg/kg.

En un estudio realizado en el sur de Irán por Hashemi (Hashemi, 2016b) se analizan 359 muestras de piensos diferentes, para conocer el contenido de AFB1 en éstas. La extracción de esta toxina se ha llevado a cabo a través de una SLE con una mezcla de metanol:agua (70:30 v/v), y a continuación su correspondiente determinación con la técnica ELISA competitiva, dónde esta aflatoxina se mide a una absorbancia de 450 nm. Después de realizar este análisis, se ha obtenido como resultado que el 94.81% del total las muestras están contaminadas por AFB1, con una concentración media de ésta de 4.12 µg/kg. El límite de detección en este análisis es de 1µg/kg.

Se ha realizado un estudio en Portugal por Martins (Martins et al., 2007), donde se analizan 1001 muestras de piensos entre el período de 1995-2004 para determinar el contenido de AFB1 en éstas. La extracción de esta aflatoxina se realiza a través de una SLE con una mezcla de cloroformo estabilizado con 0.5 % de etanol (250:25). Para purificar dicha aflatoxina, se pasa a través de una mini-columna Sep-Pak Florisil acondicionada previamente con cloroformo, y se eluye esta aflatoxina con una mezcla de agua:acetona (85+15). A continuación se cuantifica esta aflatoxina a través de la técnica HPLC-FLD, donde se usa de fase móvil una mezcla de agua-acetonitrilo-metanol (6+2+3, v/v/v), dónde el tiempo de retención de esta aflatoxina es de 13.35 minutos y el límite de detección de 1 µg/kg. Tras la realización de este análisis, se puede observar que 347 muestras del total están contaminadas con AFB1, y en 62 muestras del total se observan niveles de AFB1 por encima del límite máximo permitido en Portugal (5 µg/kg), con un rango de concentraciones entre 5.1-74 µg/kg. En los dos últimos años de estudio, 2003 y 2004, ninguna muestra ha superado el límite máximo permitido de esta aflatoxina.

En otro de los estudios realizado en Croacia por Pleadin (Pleadin et al., 2014), se analizan 633 muestras de piensos para determinar el contenido de AFB1 en éstas. Esta toxina se ha extraído de la matriz a través de una SLE con metanol al 70 %, y después se ha llevado cabo su correspondiente cuantificación a través de la técnica ELISA. En este estudio se realiza una confirmación de los resultados, cuantificando de nuevo la AFB1 a través de LC-MS/MS, previamente haciendo de

nuevo la extracción de la aflatoxina, en este caso a través de una SLE con una mezcla de acetonitrilo:agua (80:20). Para la realización de la LC, se usó una columna C18 y la fase móvil usada es una mezcla de 0.1% de ácido fórmico disuelto en agua más acetonitrilo. La concentración media de AFB1 detectada en las muestras de pienso es de 81 µg/kg.

Se ha realizado otro de los estudios en Turquía por Sahin (Sahin et al., 2016), donde se analizan 76 muestras de pienso para saber su contenido de AFB1 en estas muestras. La aflatoxina se extrae de la matriz a través de una SLE con metanol:agua (8/2, v/v) y se purifica ésta haciendo una SPE, eluyendo el analito con metanol. Esta aflatoxina se cuantifica a través de la técnica HPLC-FLD, donde la fase móvil utilizada es agua:acetonitrilo:metanol (6/2/3, v/v/v) y el tiempo de retención de esta toxina es de 15.3 minutos. Los resultados del análisis demuestran que el 26.3% de las muestras analizadas están contaminadas con AFB1, con una concentración media de 2.25 µg/kg.

En otro de los estudios realizados en Navarra (España) por Hernández-Martínez (Hernández-Martínez et al., 2015) se analizan 78 muestras de pienso para determinar el contenido de AFB1 en éstas. La extracción de esta toxina se lleva a cabo a través de una SLE con acetonitrilo/agua (60/40, v/v) y a continuación se realiza una purificación del analito con una IAC (SPE), donde el analito se eluye con agua ultrapura. Para la cuantificación de esta aflatoxina se hace uso de la técnica HPLC-FLD, donde el soporte de la columna es una C18, y después se realiza una derivatización. El 85% de las muestras analizadas dan positivo en contenido de AFB1, con una media de 0.040 µg/kg.

Más adelante se presenta una tabla resumen, tabla 7, de todo lo dicho anteriormente, comparando las diferentes maneras de hacer tanto la extracción y purificación de la aflatoxina de la matriz principal, como la detección de ésta.

A parte de las técnicas utilizadas tanto para la extracción y purificación de la AFB1, como las técnicas utilizadas para la cuantificación de esta toxina, otro aspecto importante a conocer es el rango de concentraciones de esta aflatoxina en piensos para vacas obtenidos en los estudios realizados. En la tabla 8, se van a presentar diferentes países del mundo donde se han recogido muestras de piensos para vacas, con el rango de concentraciones obtenido en cada caso tras la realización del análisis y junto a la técnica utilizada para realizar dicha cuantificación.

Tabla 7. Técnicas de extracción y purificación de AFB1 y técnicas de determinación cuantitativa de la misma en piensos. Nota: se presentan algunos datos de % de recuperación, % C.V, etc, dependiendo del autor (Elaboración propia).

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	TÉCNICA DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE AFB1	REFERENCIA
SLE con acetonitrilo Recuperación (n=5) : 88%	HPLC-FLD	(Arroyo-Manzanares et al., 2015)
SLE con metanol Recuperación (n=18): 101% % C.V : 8.8	ELISA competitivo	(Oplatowska-Stachowiak et al., 2016)
SLE con acetonitrilo SPE	HPLC-FLD	(Ullah et al., 2016)
SPE Rango de detección : 1-18.99 µg/kg Recuperación: 80%	HPLC-FLD (Kobra cell)	(Reiter et al., 2009)
-	HPLC-FLD	(Rahmani et al., 2009)
-	ELISA	(Rahmani et al., 2009)
SLE con acetonitrilo:agua	ELISA	(Gizachew et al., 2016)
SLE con metanol:agua SPE Elución con metanol	ELISA competitivo	(Abbès et al., 2012)
SLE con metanol al 70%	HPLC-FLD Fase móvil: metanol-acetonitrilo- agua	(Han et al., 2013)
SLE con metanol:agua	ELISA competitivo	(Hashemi, 2016b)
SLE con cloroformo estabilizado con 0.5% de metanol	HPLC-FLD Fase móvil: agua-acetonitrilo- metanol Tiempo de retención: 13.35 min.	(Martins et al., 2007)
SLE con metanol al 70%	ELISA	(Pleadin et al., 2014)
SLE con metanol:agua SPE Elución con metanol	HPLC-FLD	(Sahin et al., 2016)
SLE con acetonitrilo/agua SPE Elución con agua ultrapura	HPLC-FLD	(Hernández-Martínez et al., 2015)

Tabla 8. Presencia de AFB1 en muestras de pienso para vacas en diferentes países del mundo (Elaboración propia).

PAÍS	AÑO DE RECOLECCIÓN	MUESTRAS TOTALES	CONCENTRACIÓN MIN. Y MÁX. DE AFB1 (µg/kg)	CONCENTRACIÓN MEDIA DE AFB1 (µg/kg)	TÉCNICA DE ANÁLISIS	REFERENCIA
Túnez	2008-2010	58	<5.00 - >30 (*)	18.66	ELISA competitivo	(Abbès et al., 2012)
Etiopía	-	156	7.00 - 149 (*)	-	ELISA	(Gizachew et al., 2016)
Portugal	1995-2004	1001	1.00 - 80 (*)	-	HPLC-FLD	(Martins et al., 2007)
China	2010	200	0.05 - 3.53	-	HPLC-FLD	(Han et al., 2013)
Irán	-	359	-	4.12	ELISA competitivo	(Hashemi, 2016b)
Croacia	2013	633	1.1 - 2072 (*)	81	ELISA	(Pleadin et al., 2014)
Turquía	2012-2015	76	0.278 - 6.89 (*)	2.25	HPLC-FLD	(Sahin et al., 2016)
España	2008	78	-	0.040	HPLC-FLD	(Hernández-Martínez et al., 2015)

(*) Concentraciones por encima de 5 µg/kg (límite UE)

Como se puede observar en la tabla 8, la mayoría de las concentraciones de AFB1 en piensos superan el límite de la UE (5 µg/kg). China es uno de los países donde no se supera este límite, ya que el rango de concentraciones de AFB1 detectado en muestras de piensos es muy bajo, es decir, los piensos provenientes de China tienen un contenido aceptable de AFB1 y pueden ser ingeridos perfectamente por las vacas. En el caso de Irán, sólo se da el dato de concentración media de AFB1 encontrada en las muestras de piensos recogidas, y este dato es menor a 5 µg/kg, pero como no se dan datos de concentraciones mínima y máxima de esta aflatoxina, no se sabe si alguna de las muestras de piensos recogidas superan este límite o no.

4.2. Determinación de aflatoxina M1 en leche.

La determinación de la AFM1 en leche se puede llevar a cabo a través de diversas técnicas, tanto en lo que respecta a la etapa de extracción y purificación del analito, como a la etapa de detección y cuantificación de éste.

Ullah (Ullah et al., 2016) ha estudiado que una de las formas de extracción y purificación de la AFM1 de la leche sería a través de una SPE, pasando la muestra por una IAC (AflaStar M1, Romer Labs, USA). La AFM1 se eluye con acetonitrilo, se evapora y se vuelve a eluir con la fase móvil que es una mezcla de agua:acetonitrilo (25:75) y a continuación ésta se cuantifica a través de la técnica HPLC-FLD (No se dan datos analíticos).

En el estudio realizado por Al-Mossawei (Al-Mossawei et al., 2016) se han analizado 50 muestras de leche recolectadas en 2015 en Bagdad. Estas muestras de leche se analizan a través de las 3 técnicas más conocidas, TLC (análisis cualitativo), HPLC-FLD (análisis cuantitativo) y ELISA (análisis cuantitativo). La extracción y purificación de la AFM1 para después realizar el análisis a través de TLC o ELISA, sería haciendo una SPE con una columna C18, se eluye la aflatoxina con una mezcla de acetonitrilo:metanol (3/2 v/v) y a continuación se analiza a través de las dos técnicas nombradas anteriormente. Otra forma de analizar la AFM1 es a través de ELISA, en este caso no se hace ninguna extracción de la aflatoxina, se utiliza la leche directamente solo centrifugándola. De las 50 muestras de leche analizadas, 25 son importadas y otras 25 son locales; una vez realizado el análisis a

través de HPLC-FLD, el rango de concentración de AFM1 en las muestras importadas es de 96.81-0.0 ng/L y en las muestras locales es de 251.57-1.6 ng/L. Cuando el análisis se realiza a través de la técnica ELISA, el rango de concentración de AFM1 en las muestras importadas es de 50.2-0.0 ng/L y en las muestras locales es de 380-32.1 ng/L.

Con la investigación de Muscarella (Muscarella et al., 2007) se puede decir que la extracción y purificación de la AFM1 se hace a través de una SPE con una IAC (Rida R-Biopharm), donde la AFM1 se eluye de la columna con metanol. A continuación esta aflatoxina se cuantifica a través de la técnica de HPLC-FLD, donde la fase móvil usada es agua, acetonitrilo y metanol.

Otra posibilidad según Chen (Chen et al., 2005) es extraer la AFM1 a través de una LLE con agua desionizada, seguida de una SPE para su purificación, con una IAC Mycosep 226, Romer Labs, donde la AFM1 se eluye con una mezcla de acetonitrilo:metanol (3:2, v/v). A continuación, la aflatoxina se cuantifica a través de HPLC acoplado a un MS/MS.

En un estudio realizado por Hashemi (Hashemi, 2016a) en el sur de Irán se analizan 168 muestras de leche cruda y 12 muestras de leche pasteurizada, para realizar la determinación de AFM1 en éstas. La extracción de esta aflatoxina se lleva a cabo por centrifugación y a continuación se realiza directamente un inmunoensayo con la técnica ELISA competitiva para la detección de la toxina. La absorbancia a la que se mide esta aflatoxina es de 450 nm. Después de la realización de este análisis, se puede concluir que el 55.56% de las muestras de leche están contaminadas por AFM1 con una concentración media de 21.31 ng/L. Las concentraciones en todas las muestras de leche son inferiores al límite nacional iraní, 100 ng/L; pero el 30 % de las muestras de leche de vaca cruda son superiores al límite de tolerancia máximo permitido en la UE, 50 ng/L.

Otra forma distinta de extraer la AFM1 de la leche es a través de una DLLME, como han estudiado Arroyo-Manzanares (Arroyo-Manzanares et al., 2014); se extrae la aflatoxina con acetonitrilo a través de una LLE y después se purifica el extracto con una DLLME usando cloroformo y agua; posteriormente se cuantifica esta toxina a través de HPLC-MS. El límite de cuantificación de este análisis es de 2 ng/kg.

En el estudio realizado por Armorini (Armorini et al., 2016) se analizan 58 muestras de leche para la cuantificación de la AFM1 en Bolonia (Italia), de las cuales 22 son muestras de leche orgánicas, y 36 muestras de leche convencionales. Dentro

de estas dos categorías de leche se encuentran leche fresca y leche tratada a altas temperaturas (UHT), y también leche entera y descremada. La técnica de extracción y purificación utilizada para extraer la AFM1 es una SPE (previamente se centrifuga la muestra), a través de una IAC (Afla M1, HPLC). Se usa una mezcla de acetonitrilo: alcohol etílico (3:2) para eluir la AFM1 de la columna, y esta muestra resultante es la que se inyecta en el HPLC-FLD, técnica a través de la cual se realiza la cuantificación de dicha aflatoxina, donde la fase móvil utilizada es una mezcla de agua-acetonitrilo-alcohol metílico (60:33:7, v/v/v). En este estudio realizado, 35 muestras de leche de 58 totales, dan positivo en el contenido de AFM1. Los niveles de contaminación de la AFM1 están entre 0.009-0.026 ng/mL, por lo que no superan el límite impuesto por la UE de 0.05 µg/kg. El límite de detección es de 0.008 ng/mL, el de cuantificación de 0.025 ng/mL y el porcentaje de recuperación de la muestra de 88.3 %.

En el estudio realizado por Gizachew (Gizachew et al., 2016) se analizan 100 muestras de leche cruda de productores de leche y 10 de comerciantes de leche cruda en Etiopía. No se ha utilizado ninguna técnica de extracción y purificación, solo centrifugación y posteriormente la detección de esta aflatoxina a través del ensayo ELISA. Los resultados de este estudio muestran la presencia de AFM1 en todas las muestras de leche analizadas, cuyo nivel de contaminación varía entre 0.028 y 4.98 µg/L.

En otro de los estudios realizado por Abbès (Abbès et al., 2012) se analizan 112 muestras de leche de vaca cruda en Beja (Túnez) para saber la cantidad de AFM1 que éstas contienen. La extracción y purificación de la AFM1 se lleva a cabo a través de una IAC (SPE) para análisis de aflatoxinas. La aflatoxina se eluye con acetonitrilo y a continuación se cuantifica a través de la técnica ELISA, donde la absorbancia para medir esta aflatoxina es 450 nm. Tras hacer esta cuantificación, se puede afirmar que 67 muestras de leche dan positivo en presencia de AFM1, con una concentración media de esta aflatoxina de 13.6 µg/L, una concentración mayor al nivel máximo admitido.

En el estudio realizado en el norte y sur de China por Han (Han et al., 2013) donde se analizan muestras de piensos para saber el contenido de AFB1 en éstas, como ya se ha explicado anteriormente, también se analizan 200 muestras de leche cruda para saber el contenido de AFM1 en éstas. No se lleva a cabo ninguna técnica de extracción de esta aflatoxina, simplemente se realiza una centrifugación y a

continuación se usa directamente el extracto para la realización de un inmunoensayo ELISA competitivo. El resultado de este análisis es que el 32.5 % del total de muestras de leche dan positivo en contenido de AFM1, con un rango de concentraciones de 5.2-59.6 ng/L, muy por debajo del límite legal en China que es de 500 ng/L, pero 3 de estas muestras dan un valor superior a 50 ng/L, que es el límite de la UE. En este estudio la temperatura y la humedad son más bajas en el norte que en el sur de China. Como ya se ha dicho anteriormente, la temperatura y la humedad son dos factores importantes en la formación de AFB1 en piensos, y ésta a su vez determina la cantidad de AFM1 en leche. Se producen mayor cantidad de aflatoxinas en ambientes de mayor temperatura y con mayor humedad, por lo que en el sur de China, como las temperaturas y la humedad son mayores que en el norte, piensos provenientes del sur tienen mayor cantidad de AFB1 y por tanto la leche tendrá mayor cantidad de AFM1. Como se sabe la AFM1 es un metabolito de la AFB1, por tanto, limitando la AFB1 en piensos animales es la mejor solución para controlar la AFM1 en leche.

En la tabla 9 se resume todo lo dicho anteriormente, haciendo una comparación de las diferentes técnicas de extracción y purificación de la AFM1 de la matriz principal, como de la cuantificación de ésta según varios autores.

Chalyan (Chalyan et al., 2016) estudiaron que aparte de la técnica de HPLC (técnica selectiva, lenta, costosa, y que necesita un pretratamiento de muestra) y ELISA (técnica selectiva, cara y consume tiempo) para la detección de la AFM1, existen otras técnicas menos comunes y no por ello menos importantes. Como por ejemplo la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR), que aunque es una técnica cara, es selectiva y rápida. Otro tipo de técnica también menos común sería la utilización de inmunosensores de microelectrodos, destaca por su bajo coste pero consume mucho tiempo en realizar el análisis y no es portátil. Estas técnicas destacan por sus bajos límites de detección, es decir, la concentración a la que la técnica puede detectar el analito es baja, y mientras más baja sea esta concentración, mejor será la técnica.

En la tabla 10, se puede observar algunas de las técnicas más y menos comunes por las que se puede determinar la AFM1, junto con sus límites de detección.

Tabla 9. Técnicas de extracción y purificación de la AFM1 y técnicas de cuantificación de la misma en leche. Nota: se presentan algunos datos de % de recuperación, LOD Y LOQ (Elaboración propia).

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	TÉCNICA DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE AFM1	REFERENCIA
SPE Elución con agua:acetonitrilo	HPLC-FLD	(Ullah et al., 2016)
SPE (C18) Elución con acetonitrilo:metanol	HPLC-FLD	(Al-Mossawei et al., 2016)
Ninguna	ELISA	(Al-Mossawei et al., 2016)
SPE Elución con metanol Recuperación: 91%	HPLC-FLD Fase móvil: agua, acetonitrilo y metanol Rango de detección :2 µg/kg LOD: 0.006 µg/kg	(Muscarella et al., 2007)
LLE con agua desionizada SPE Elución con acetonitrilo:metanol Recuperación: 31-33.5%	HPLC-MS/MS Rango de detección: 8 µg/kg LOD: 0.009 µg/kg LOQ: 0.014 µg/L	(Chen et al., 2005)
Ninguna	ELISA competitivo	(Hashemi, 2016a)
LLE con acetonitrilo DLLME	HPLC-MS LOQ: 2 ng/kg	(Arroyo-Manzanares et al., 2014)
SPE (IAC) Elución con acetonitrilo:alcohol metílico Recuperación: 88.3%	HPLC-FLD Fase móvil: agua-acetonitrilo-alcohol metílico LOD: 0.008 ng/mL LOQ: 0.025 ng/mL	(Armorini et al., 2016)
Ninguna	ELISA	(Gizachew et al., 2016)
SPE Elución con acetonitrilo	ELISA	(Abbès et al., 2012)
Ninguna	ELISA competitivo	(Han et al., 2013)

Tabla 10. Técnicas de detección de AFM1 (Elaboración propia).

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE AFM1	LOD DE AFM1 (nM)
SPR	$1.82 \cdot 10^{-3}$
ELISA	$1.31 \cdot 10^{-2}$
HPLC	$1.37 \cdot 10^{-2}$
Inmunosensores de microelectrodos	$2.43 \cdot 10^{-2}$

LOD: Límite de detección.

Como se puede observar en la tabla 10, la técnica SPR para la detección de la AFM1 es la más selectiva, ya que tiene el límite de detección más bajo. Un estudio realizado por Karczmarczyk (Karczmarczyk et al., 2016) muestra la utilización de SPR para la detección de esta aflatoxina. En él se va a comparar las características de rendimiento del sensor basado en poli (2-hidroxietil metacrilato), también conocido como p-(HEMA), con una arquitectura basada en polietilenglicol de uso habitual basada en una monocapa mixta de tiol autoensamblada. La respuesta del sensor SPR es proporcional a la masa de la molécula, es decir, se puede realizar con este tipo de sensor la detección directa de moléculas pequeñas, como es el caso de las aflatoxinas. Este tipo de biosensor detecta bajas concentraciones de AFM1 en leche en poco tiempo de análisis; esto se puede afirmar observando los resultados de este estudio realizado, donde el límite de detección de la AFM1 es de 0.018 ng/mL, con un tiempo total de análisis de 55 minutos.

Gracias a los estudios realizados, se puede afirmar que el tipo de alimentación que recibe el animal afecta a la concentración de AFM1 en la leche; la leche extraída de animales alimentados simplemente con pasto, presenta una cantidad menor de AFM1 comparada con la leche extraída de animales que han sido alimentados con piensos y alimentos almacenados. El estudio realizado por Panariti (Panariti, 2001) demuestra que los niveles de AFM1 son más altos en vacas alimentadas por piensos almacenados. Según Díaz (Díaz et al., 2006) los lotes de leche contaminados han sido producidos en granjas donde se han usado suplementos alimenticios, por el contrario, en granjas donde no se han usado estos complementos y solo se alimentaban de pasto, no se ha detectado ninguna contaminación de leche. Thirumala-Devi (Thirumala-Devi et al., 2002) analizaron

leche proveniente de zonas rurales y zonas un poco más urbanas y observaron que la leche proveniente de las zonas más urbanas tenía una mayor concentración de AFM1, ya que las vacas habían sido alimentadas con paja, tortitas de algodón...

Gracias a otros estudios realizados por Ghanem (Ghanem et al., 2009), Hassan (Hassan et al., 2014), Rahimi (Rahimi et al., 2010) y Srivastava (Srivastava et al., 2001), se puede decir que la cantidad de AFM1 es mayor en leche de vaca comparada con otros animales como son el búfalo de agua, camellos, ovejas y cabras, ya que estos animales se suelen alimentar de pasto y por eso la cantidad de AFM1 en leche es más baja.

Se ha podido comprobar que los cambios estacionales también afectan a la concentración de AFM1 en leche. Como se sabe, los climas calurosos y húmedos favorecen el crecimiento de hongos y por tanto la producción de aflatoxinas, aunque hay estudios que no están de acuerdo con esto. El estudio realizado por Blanco (Blanco et al., 1988) y por El Marnissi (El Marnissi et al., 2012) demuestra que las muestras recogidas de leche en otoño presentan una alta concentración de AFM1. Díaz (Díaz et al., 2006) dicen que la concentración de AFM1 es mayor en épocas de lluvia. Como se ha dicho anteriormente, hay estudios que no están de acuerdo con esto, y dicen que la estación del año no influye en el contenido de AFM1 que presentan las muestras de leche recogidas, como dicen Markaki (Markaki et al., 1997), y Rodríguez Velasco (Rodríguez Velasco et al., 2003).

La mayor contaminación de AFB1 se debe a que en el invierno, los piensos están almacenados y se mantienen en condiciones húmedas, por tanto se favorece el crecimiento de los hongos. Los estudios realizados en un futuro deberán contener un registro de las condiciones climáticas, como son la humedad, temperatura, precipitación, y de las condiciones de almacenaje.

Por otro lado se ha estudiado la presencia de la AFM1 en diferentes tipos de leche, cruda, pasteurizada, en polvo, orgánica, concentrada, ultra temperatura (UHT), de oveja, de cabra, etc. La mayoría de los estudios dicen que los tratamientos como el pasteurizado y la esterilización no producen ningún cambio en la concentración de la AFM1 en el alimento. Por el contrario, el calentamiento, la evaporación, la concentración o secado, conllevan grandes pérdidas de AFM1 en algunos estudios, en otros se dice que estos tratamientos no afectan al contenido de AFM1.

Otro aspecto importante a considerar en los estudios es el período de lactancia cuando sean recogidas las muestras de leche de la vaca, las vacas en etapa de lactancia temprana permiten una transmisión mayor de AFM1.

En la tabla 11 se presenta una gran variedad de diferentes países del mundo, donde se han analizado y cuantificado la AFM1 en muestras de leche de diversas categorías, y a través de diferentes métodos de análisis. En esta tabla se dan datos del año de recolección de la leche, junto con el tipo de leche que se ha recogido y tratado, el número de muestras totales recogidas, la concentración mínima y máxima de AFM1, el método de análisis utilizado para cuantificar dicha aflatoxina y la referencia.

Algunas de las muestras de leche analizadas en la tabla 11 presentan una concentración de AFM1 en leche superior a 50 ng/L, por lo que el nivel de esta aflatoxina está por encima del nivel máximo permitido en la UE; como se puede observar esto ocurre en países asiáticos y americanos.

Las aflatoxinas en la leche podrían ser un riesgo tanto para los seres humanos como para los animales. La aflatoxina más estudiada en la leche es la AFM1. Los estudios anteriormente realizados a diferentes especies de animales, han demostrado que puede ser posible la transmisión de aflatoxinas a la leche, y que la ingesta de estas toxinas puede provocar un cambio tanto en la producción de la leche, reduciéndola, como en la composición de la leche.

Tabla 11. Presencia de AFM1 en muestras de leche animal en diferentes países del mundo (Elaboración propia).

PAÍS DE ORIGEN	AÑO DE RECOLECCIÓN	TIPO DE LECHE	MUESTRAS TOTALES	CONCENTRACIÓN MÍN. Y MÁX. DE AFM1	TÉCNICA DE ANÁLISIS	REFERENCIA
Croacia	2009	Leche de vaca cruda	61	0.6 - 58.6 ng/L (*)	ELISA	(Bilandzic et al., 2010)
Grecia	2010	Leche de vaca cruda, orgánica y tratada a altas temperaturas	196	10 ng/L	ELISA	(Tsakiris et al., 2013)
Italia	2012	Leche de vaca cruda Leche de cabra cruda Leche de oveja cruda	12 3 34	<3 - 10 ng/L <3 - 5 ng/L <3 - 20 ng/L	LC-FLD	(Santini et al., 2013)
Portugal	1999	Leche de vaca cruda Leche de vaca tratada a altas temperaturas	31 70	5 - 50 ng/L 5 - 61 ng/kg	No informado	(Martins et al., 2000)
España	2000	Leche de vaca cruda	92	14 - 24.9 ng/L	ELISA	(Rodríguez Velasco et al., 2003)
Reino Unido	2001	No informado	100	10 - 50 ng/kg	No informado	(EFSA, 2004b)
Egipto	2010	Leche de vaca en polvo	125	0.3 - 21.8 ng/L	ELISA	(El-Tras et al., 2011)
Marruecos	2009-2010	Leche de vaca cruda	48	10 - 100 ng/L (*)	LC-FLD	(El Marnissi et al., 2012)
Kenia	2006	Leche de vaca pasteurizada y leche tratada a altas temperaturas	613	5 - 780 ng/kg	ELISA	(Kang'ethe et al., 2009)
China	2006-2007	Leche tratada a altas temperaturas	233	21.49 - 95.73 ng/kg	ELISA	(Guo et al., 2013)
Irán	2012	Leche de vaca pasteurizada	45	8.8 - 64 ng/L (*)	ELISA	(Riahi-Zanjani et al., 2013)
Japón	2004	Leche de vaca cruda	299	5 - 11 ng/L	LC-FLD	(Sugiyama et al., 2008)
Tailandia	2006-2007	Leche de vaca cruda	240	14 - 197 ng/L (*)	LC-FLD	(Ruangwises et al., 2010)
Turquía	No informado	Leche de vaca cruda	135	5 - 68.3 ng/L(*)	ELISA	(Ozsunar et al., 2010)
Argentina	2007	Leche de vaca cruda	94	10 - 70 ng/L(*)	LC-MS/MS	(Alonso et al., 2010)
México	No informado	Leche de vaca cruda	40	6 - 65 ng/L(*)	ELISA	(Reyes Velázquez et al., 2009)

(*) Concentraciones de AFM1 por encima de 50 ng/L (límite UE)

A partir de la leche se van a fabricar otro tipo de alimentos, como es el caso de la nata, la mantequilla o el queso, donde la concentración de AFM1 inicial en la leche va a variar cuando se transforme en el producto deseado. Cuando la leche es sometida a procesos de evaporación, se elimina parcial o completamente el agua de ésta, consiguiendo así una concentración mayor de AFM1 en la leche. En algunos casos se pueden observar grandes pérdidas de AFM1 en leche cuando ésta es sometida a tales procesos, mientras que en otros casos se concluye que la concentración de la leche sea mayor o menor no afecta al contenido de AFM1 en ella. Algunos estudios demuestran que cuando se fabrica nata, una pequeña proporción de AFM1 en la leche se transporta a la nata, y cuando se fabrica mantequilla, se transporta una cantidad de AFM1 aún más pequeña de la leche a ésta. En la fabricación del queso se puede observar que la concentración de AFM1 es tres veces mayor en quesos blandos que en la leche, y en quesos duros cinco veces mayor que en la leche. Se puede decir por tanto que la maduración del queso hace que el contenido de AFM1 sea mayor en quesos más maduros (Prandini et al., 2009).

5. CONCLUSIONES

Del estudio de la problemática que para la salud animal y humana representa la presencia de AFB1 en piensos y de AFM1 en leche y de la revisión y comparación de las técnicas de determinación propuestas hasta para ambas aflatoxinas, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- La contaminación de la leche por AFM1 es debida principalmente a la continua contaminación de alimentos para animales (piensos) por la AFB1, al encontrarse dichos alimentos en unas condiciones inadecuadas. La AFB1 es metabolizada por enzimas, que se encuentran primariamente en el hígado, en AFM1. Una vez formada la AFM1, es excretada en la orina y la leche.

- Para la reducción de la presencia de AFB1 en las raciones finales para vacas lecheras es muy importante el análisis previo de los ingredientes utilizados para la elaboración de los ensilados y una de las recomendaciones principales es la de mantener una atmósfera seca y anaerobia durante su elaboración, ya que la mayor parte de los hongos son aerobios.

- La prevención y control de la contaminación con AFB1 evitará o reducirá significativamente los problemas de contaminación de la leche y productos lácteos con AFM1.

- La técnica más comúnmente utilizada para llevar a cabo la extracción de la AFB1 en piensos es la SLE, y en el caso de la AFM1 en leche es mediante una SPE.

- Las técnicas más empleadas para llevar a cabo la detección y cuantificación de estas aflatoxinas son HPLC-FLD y ELISA.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbès, S., Ben Salah-Abbès, J., Bouraoui, Y., Oueslati, S., Oueslati, R. (2012). Natural occurrence of aflatoxins (B1 and M1) in feed, plasma and milk of lactating dairy cows in Beja, Tunisia, using ELISA. *Food Additives & Contaminants: part B Surveillance*, 5(1), 11-15.

Alonso, V. A., Monge, M. P., Larriestra, A., Dalcero, A. M., Cavaglieri, L. R., Chiacchiera, S. M. (2010). Naturally occurring aflatoxin M1 in raw bulk milk from farm cooling tanks in Argentina. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(3), 373-379.

Al-Mossawei, M.T., Al-Zubaidi, L.A., Hamza, I.S., Abduljaleel, S.Y. (2016). Detection of AFM1 in milk and some dairy products in Iraq using different techniques, 41, 74-81.

Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A., Roncada, P. (2016). Occurrence of aflatoxin M1 in conventional and organic milk offered for sale in Italy. *Mycotoxin Research*, 32 (4), 237-246.

Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J.F., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín Graseqa*, 7, 16-31.

Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J.F., García-Campaña, A.M., Gámiz-Gracia, L. (2015). Aflatoxins in animal feeds: A straightforward and cost-effective analytical method. *Food Control*, 54, 74-78.

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., & Pulina, G. (2005). Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88, 3063-3069.

Bhat, R., Raj, R.V., Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57-81.

Bilandzic, N., Varenina, I., Solomun, B. (2010). Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control*, 21(9), 1279-1281.

Blanco, J. L., Domínguez, L., Gómez-Lucía, E., Garayzabal, J. F., García, J. A., Suárez, G. (1988). Presence of aflatoxin M1 in commercial ultra-high-temperature-treated milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1622-1623.

Boletín Oficial del Estado (BOE) (1988). Real Decreto 475/1988, de 13 de mayo, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para consumo humano, nº 121 de 20 de mayo de 1988.

Campagnollo, F.B., Ganev, K.C., Khaneghah, A. M., Portella, J., Cruz, A.G., Granato, D., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F., Sant'Ana, A.S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, 68, 310-329.

Chalyan, T., Pasquardini, L., Gandolfi, D., Guider, R., Samusenko, A., Zanetti, M., Pucker, G., Pederzoli, C., Pavesi, L. (2016). Aptamer-and Fab'- functionalized microring resonators for aflatoxin M1 detection. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 23(c), 1-8.

Chen, C.-Y., Li, W.-J., Peng, K.-Y. (2005). Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using High-Flow Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (22), 8474-8480.

Comisión Europea (2003). Directiva 2003/100/CE de la Comisión de 31 de octubre de 2003 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal, L285,33-37.

Comisión Europea (2016). Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, 020.001, 1-40.

Díaz, G. J., Espitia, E. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogota, Colombia. *Food Additives & Contaminants*, 23(8), 811-815.

EFSA. (2004b). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, *39*, 1-27.

El Marnissi, B., Belkhou, R., Morgavi, D. P., Bennani, L., Boudra, H. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *50(8)*, 2819-2821.

El-Tras, W. F., El-Kady, N. N., Tayel, A. A. (2011). Infants exposure to aflatoxin M1 as a novel foodborne zoonosis. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *49(11)*, 2816-2819.

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

Ghanem, I., Orfi, M. (2009). Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control*, *20(6)*, 603-605.

Gimeno, A. (2004). Aflatoxina M1 en la leche. Riesgos para la salud pública, prevención y control. *Associação Portuguesa Dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA), Alimentação Animal*, *49*, 32-44.

Gizachew, D., Szonyi, B., Tegegne, A., Hanson, J., Grace, D. (2016). Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control*, *59*, 773-779.

Guo, Y., Yuan, Y., Yue, T. (2013). Aflatoxin M1 in milk products in China and dietary risk assessment. *Journal of Food Protection*, *76(5)*, 849-853.

Han, R.W., Zheng, N., Wang, J.Q., Zhen, Y.P., Xu, X.M., Li, S.L. (2013). Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food Control*, *34*, 35-39.

Hashemi, M. (2016a). A survey of aflatoxin M1 in cow milk in Southern Iran. *Journal of food and drug analysis*, *24 (4)*, 888-893.

Hashemi, M. (2016b). Aflatoxin B1 levels in feedstuffs from dairy cow farms in south of Iran. *Food and Agricultural Immunology*, *27 (2)*, 1-13.

Hassan, H. F., Kassaify, Z. (2014). The risks associated with aflatoxins M1 occurrence in Lebanese dairy products. *Food Control*, *37(0)*, 68-72.

Hernández-Martínez, R., Navarro-Blasco, I. (2015). Surveillance of aflatoxin content in dairy cow feedstuff from Navarra (Spain). *Animal Feed Science and Technology*, *200*, 35-46.

Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different absorbents. *Toxicology Letters*, 122 (2), 179-188.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans-Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs, 139.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans, 100F, 225-248.

Kang'ethe, E. K., Lang'a, K. A. (2009). Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. *African Health Sciences*, 9(4), 218-226.

Karczmarczyk, A., Dubiak-Szepietowska, M., Vorobbi, M., Rodriguez-Emmenegger, C., Dostálek, J., Feller, K-H. (2016). Sensitive and rapid detection of aflatoxin M1 in milk utilizing enhanced SPR and p-(HEMA) brushes. *Biosensors and Bioelectronics*, 81,159-165.

Karlovsy, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I.P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32 (4), 179-205.

Markaki, P., & Melissari, E. (1997). Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. *Food Additives & Contaminants*, 14(5), 451-456.

Martins, M. L., Martins, H. M. (2000). Aflatoxin M1 in raw and ultra-high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Additives & Contaminants*, 17(10), 871-874.

Martins, H.M., Mendes Guerra, M.M., D'Almedia Bernardo, F.M. (2007). Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Iberoam Micol*, 24, 69-71.

Mishra, H.N., Das, C. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43:3, 245-264.

Muscarella, M., Magro, S.Lo., Palermo, C., Centonze, D. (2007). Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 594 (2), 257-

264.

Nachtmann, C., Gallina, S., Rastelli, M., Ferro, G. L., Decastelli, L. (2007). Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk in Italy. *Food Control*, 18, 623–629.

Oplatowska-Stachowiak, M., Sajic, N., Xu, Y., Haughey, S.A., Mooney, M.H., Gong, Y.Y., Verheijen, R., Elliott, C.T. (2016). Fast and sensitive aflatoxin B1 and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients. *Food Control*, 63, 239-245.

Ozsunar, A., Gumus, T., Arici, M., Demirci, M. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in Trakya Region, Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 22(3), 1879-1884.

Panariti, E. (2001). Seasonal variations of aflatoxin M1 in the farm milk in Albania. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 52, 37-41.

Perrone, G., Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic fungi: methods and protocols, methods in molecular biology*, 1542, 33-49.

Pleadin, J., Vulic, A., Persi, N., Skrivanko, M., Capek, B., Cvetnic, Z. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.

Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984-991.

Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M., Kazemeini, H. R. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 129-131.

Rahmani, A., Jinap, S., Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8 (3), 202-251.

Reiter, E., Zentek, J. Razzazi, E. (2009). Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53 (4), 508-524.

Reyes Velázquez, W., Patricio Martínez, S., Isaías Espinosa, V. H., Nathal Vera, M. A., De Lucas Palacios, E., Rojo, F. (2009). Total aflatoxins in cows feed and

AFM1 in milk in dairy herds from Jalisco State, Mexico. *Téc Pecu Méx*, 47(2), 223-230.

Riahi-Zanjani, B., Balali-Mood, M. (2013). Aflatoxin M1 contamination in commercial pasteurized milk from local markets in Fariman, Iran. *Mycotoxin Research*, 29(4), 271-274.

Rodríguez Velasco, M. L., Calonge Delso, M. M., Ordonez Escudero, D. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives & Contaminants*, 20(3), 276-280.

Ruangwises, N., Ruangwises, S. (2010). Aflatoxin M1 contamination in raw milk within the central region of Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(2), 195-198.

Sahin, H.Z., Celik, M., Kotay, S., Kabak, B. (2016). Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. *Food additives & contaminants, Part B, Surveillance*, 9(2), 152-158.

Santini, A., Raiola, A., Ferrantelli, V., Giangrosso, G., Macaluso, A., Bognanno, M., et al. (2013). Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). *Food Additives & Contaminants: Part B*, 6(3), 181-186.

Srivastava, V. P., Bu-Abbas, A., Alaa-Basuny, Al-Johar, W., Al-Mufti, S., Siddiqui, M. K. (2001). Aflatoxin M1 contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait. *Food Additives & Contaminants*, 18(11), 993-997.

Sugiyama, K., Hiraoka, H., Sugita-Konishi, Y. (2008). Aflatoxin M1 contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B1 in corn supplied to dairy cattle in Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi/Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 49(5), 352-355.

Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Hall, A. J., Craufurd, P. Q., Wheeler, T. R., Waliyar, F., et al. (2002). Development and application of an indirect competitive enzymelinked immunoassay for aflatoxin M1 in milk and milk-based confectionery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 933-937.

Tsakiris, I. N., Tzatzarakis, M. N., Alegakis, A. K., Vlachou, M. I., Renieri, E. A., Tsatsakis, A. M. (2013). Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. *Food and Chemical Toxicology*, 56(0), 261-265.

Ullah, H.A., Durrani, A.Z., Ijaz, M., Javeed, A., Sadique, U., Hassan, Z.U., Rahman, A.U., Shah, M., Khattak, I. (2016). Dietary mycotoxins binders: a strategy to

reduce aflatoxin M1 residues and improve milk quality of lactating Beetal goats. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 11 (4), 305-309.

Xie, L., Chen, M., Ying, Y. (2016). Development of methods for determination of aflatoxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (16), 2642-2664.