

José Miguel Soriano
Juan Carlos Moltó
Jordi Mañes

1. INTRODUCCIÓN

La importancia del análisis de micotoxinas en alimentos reside en el cumplimiento de las reglamentaciones y en la verificación de los sistemas de control de seguridad alimentaria con el fin de preservar la salud de la población (8, 32, 33). Los métodos normalizados de análisis para diferentes micotoxinas, validados por estudios interlaboratorios, han sido recomendados por parte de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Association of Official Analytical Chemists, AOAC) (2) y el Comité Europeo de Normalización (European Committee for Standardization) (9). Como Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional se pueden encontrar alrededor de cuarenta métodos validados para análisis de micotoxinas pertenecientes a diferentes familias químicas, mientras que el Comité Europeo de Normalización ha publicado un documento con criterios específicos para varios métodos de análisis de micotoxinas. Los análisis de micotoxinas requieren un alto grado de exactitud, precisión y reproducibilidad, por esta razón se recomienda el uso de procedimientos de garantía de la calidad, incluidos los materiales de referencia certificados y las comparaciones interlaboratorio (20, 41, 43, 50, 52, 53). Los materiales certificados son caros porque requieren para su desarrollo y control la participación de numerosos especialistas altamente cualificados. Algunos laboratorios, para abaratar costes, desarrollan sus propios materiales de referencia para usos rutinarios y cuyo contenido de micotoxinas se fija, siempre, sobre la base de los materiales certificados (7, 11-14, 48, 49, 54). Las comparaciones interlaboratorio ayudan más a validar los métodos analíticos empleados y mejoran la competitividad entre laboratorios (17, 51).

En el presente capítulo se abordan las técnicas analíticas más empleadas en el análisis de micotoxinas. Para ello, se dividen en tres grandes bloques:

1. Extracción y purificación.
2. Técnicas de presunción o *screening*.
3. Técnicas de confirmación.

2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

La preparación de la muestra a analizar requiere procesos de extracción y purificación. Las micotoxinas en los alimentos presentan una distribución poco uniforme por lo que se requiere una cuidadosa homogeneización de la matriz previa a la extracción de los residuos que se encuentran en concentraciones muy bajas. Por otra parte, la alta complejidad de los alimentos, donde se encuentran presentes cantidades importantes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y otros componentes minoritarios, de carácter nutricional o no, requiere, en no pocas ocasiones, una purificación para eliminar las sustancias interferentes.

Si la matriz es líquida se puede utilizar un disolvente inmiscible con ella, sin embargo existen varios inconvenientes para llevarlo a cabo, como es el elevado volumen de muestra y disolventes que se requieren, la baja selectividad junto a recuperaciones en ocasiones insuficientes y su dificultad de automatización. Por eso hoy en día, la extracción líquido-líquido ya no es la técnica de elección. Cuando la matriz es de naturaleza sólida, los disolventes orgánicos más empleados son el metanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, hexano y mezclas de ellos (37). La selección del disolvente se realiza dependiendo de la polaridad de la micotoxina y de la naturaleza de la muestra. La adición de sales y el ajuste del pH pueden contribuir a mejorar el rendimiento de las extracciones. Después de la extracción convencional con disolventes es importante llevar a cabo una etapa de purificación o limpieza (*clean-up*) que permita obtener cromatogramas más limpios. Las técnicas de extracción y limpieza utilizadas para el análisis de las micotoxinas son las siguientes:

— Extracción en fase sólida:

- Extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) convencional.
- Extracción con columnas Mycosep®.
- Dispersión de matriz en fase sólida (*Matriz Solid Phase Dispersión*, MSPD).
- Microextracción en fase sólida (*Solid Phase MicroExtraction*, SPME).

- Extracción con columnas de intercambio iónico (*Ion Exchange Column*).
- Extracción con columnas de inmunoafinidad (*ImmunoAffinity Column*, IAC).
- Extracción por fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction*).
- Extracción asistida por microondas (*Micro-Wave Assisted Extraction*).
- Extracción acelerada por disolventes (*Accelerated Solvent Extraction*).

Las principales ventajas e inconvenientes de estas técnicas se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Ventajas e inconvenientes de algunas técnicas de extracción y purificación.

Extracción	Ventajas	Inconvenientes
Extracción en fase sólida	* Ideal para muestras líquidas * Menor gasto de disolvente	* A veces extractos sucios
Extracción en columnas de inmunoafinidad	* Ideal para muestras líquidas * Menor gasto de disolvente * Extractos limpios	* Elevado coste de las columnas de inmunoafinidad * No reutilizables
Extracción con fluidos supercríticos	* Rápido (30-60 minutos) * Se puede conseguir alta selectividad modificando algunos parámetros * Baja cantidad de disolventes (5-10ml) * No es necesaria la filtración posterior del extracto	* Tamaño de muestra limitado (<10g) * Necesidad de modificadores para mejorar la eficiencia de la extracción * Coste elevado del equipo
Extracción con microondas	* Rápido (15 minutos) * Bajo consumo de disolventes (15-40ml) * Sencillo	* El extracto obtenido debe ser filtrado * Es necesaria la adición de un disolvente polar * Es necesaria la limpieza posterior del extracto * Coste moderado del equipo

(Continúa)

Tabla 5.1. Ventajas e inconvenientes de algunas técnicas de extracción y purificación. (Continuación)

Extracción	Ventajas	Inconvenientes
Extracción acelerada con disolventes	* Rápido * Baja cantidad de disolventes (15-40ml) * Control absoluto de los parámetros de extracción (temperatura y presión entre otros)	* Elevado coste del equipo * Dependiente del tipo de matriz

2.1. Extracción en fase sólida

Es una técnica que evita los inconvenientes asociados a la extracción con disolventes como son el elevado consumo de los mismos, formación de interfases persistentes, la necesidad de procesar una alta cantidad de muestra y largos tiempos de análisis. Además de la extracción en fase sólida convencional, existen dos variantes aplicadas a la extracción de micotoxinas como son la dispersión de matriz en sólida y la microextracción en fase sólida.

2.1.1. Extracción en fase sólida convencional

Esta técnica consiste en extraer las micotoxinas disueltas en una matriz acuosa al atravesar un soporte sólido, previamente acondicionado, donde quedan retenidas, y eluir posteriormente con una cantidad pequeña de disolvente (Figura 5.1). La elección de la fase sólida depende de la polaridad de las micotoxinas y del tipo de matriz utilizada. Por ejemplo, las más empleadas para tricotecnos del grupo A son octadecilsilíce (C_{18}), Florisil y cianopropilsilíce (CN).

2.1.2. Extracción con columnas Mycosep®

Las columnas de limpieza multifuncional llamadas Mycosep® se desarrollaron en EEUU por la compañía Romer Labs Incorporation. Consisten en una mezcla de varios adsorbentes (carbón, celita, resinas de intercambio iónico entre otras) empaquetadas en un tubo de plástico (Figura 5.2). Cuando se introduce

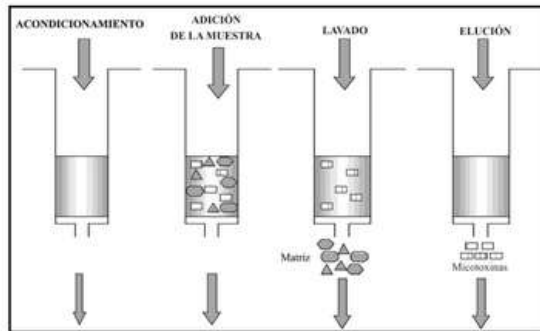


Figura 5.1. Extracción en fase sólida.

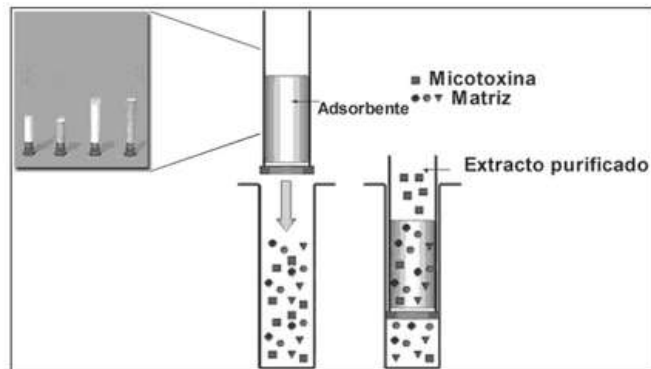


Figura 5.2. Extracción con columnas Mycosep®.

el tubo de plástico origina la separación de las micotoxinas al cabo de 10 a 30 segundos. Se ha empleado para varias micotoxinas tales como los tricotecenos del grupo B, ocratoxina A, fumonisinas y patulina.

2.1.3. Dispersión de matriz en fase sólida

Se dispersa la muestra problema con una fase sólida comercial como C_{18} , octilsilíce (C_8), aminopropilsilíce (NH_2), CN, etc., hasta conseguir una mezcla homogénea, que se introduce en una columna de vidrio, a la que se le puede añadir una fase sólida de diferente polaridad (Florisil, silicagel) para purificar simultáneamente la muestra. Las micotoxinas se eluyen de la dispersión con diferentes disolventes orgánicos como acetonitrilo, hexano, acetato de etilo y/o diclorometano. Esta técnica permite la extracción de micotoxinas desde pequeñas cantidades de muestras sólidas y semisólidas y se ha propuesto para la extracción de la zearalenona⁽²⁴⁾ y de aflatoxinas^(5,6).

2.1.4. Microextracción en fase sólida

Se basa en la absorción de las micotoxinas sobre una fase absorbente emplazada en el extremo de una microjeringa modificada, las cuales se desorben posteriormente en el inyector de un cromatógrafo de gases o de líquidos. La extracción se puede realizar por inmersión directa de la fibra en la muestra líquida, o por espacio de cabeza (un sistema cerrado, donde la fibra se encuentra suspendida sobre la muestra). La principal ventaja de esta técnica es que elimina la utilización de disolventes y no requiere apenas mano de obra; sus inconvenientes son que requieren tiempos largos, que la extracción es reproducible, pero no necesariamente cuantitativa, y que para cada alimento deben estudiarse los efectos de la matriz. Esta técnica se ha aplicado a la extracción de la ocratoxina A, ácido ciclopiazónico y ácido tenuazónico⁽³⁾.

2.2. Extracción con columnas de intercambio iónico

El intercambio iónico requiere que la micotoxina a analizar se encuentre en forma iónica en un disolvente acuoso y para ello juega un papel importante la regulación del pH del medio que dependerá de la constante de acidez (K_a) de la micotoxina. Los compuestos en forma aniónica se aíslan mediante columnas de intercambio aniónico (SAX: *Strong Anion Exchange*) que consisten en resinas con grupos funcionales débilmente básicos, como por ejemplo $-NH_2$, $-NHCH_3$ o $-N(CH_3)_2$, o con grupos de amonio cuaternario fuertemente básicos ($-N(CH_3)_3OH$) en los que el $-OH$ es reemplazable por la micotoxina. Se ha utilizado para la extracción de fumonisinas y moniliformina⁽²³⁾.

2.3. Extracción con columnas de inmunoafinidad

Ha cobrado una gran popularidad en los últimos años, por su facilidad de uso y alta selectividad frente a otras técnicas de extracción. Las micotoxinas tienen, por lo general, un tamaño molecular bajo comportándose como sustancias haptenos. Los anticuerpos producidos requieren una unión a distintos transportadores tales como agarosa, sefarosa o dextrano, para fijarlo en la fase estacionaria (Figura 5.3). En la Figura 5.4 se observa uno de los dispositivos utilizados para llevar a cabo la extracción mediante columnas de inmunoafinidad. El procedimiento consiste en acondicionar previamente la columna, para luego añadir el extracto objeto de análisis. La micotoxina problema se unirá a los anticuerpos monoclonales fijados en la columna de inmunoafinidad y mediante un líquido de lavado podrán eliminarse los restos del extracto. Por último, la elución de la micotoxina permitirá continuar el análisis. Uno de los sistemas empleados es el que se muestra en la Figura 5.5.

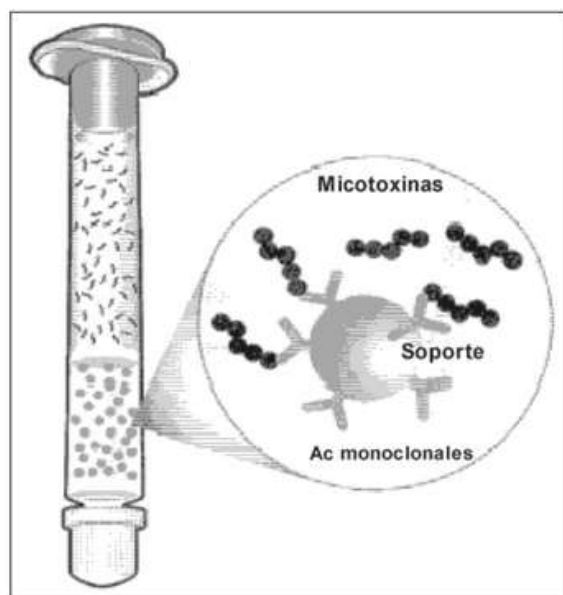


Figura 5.3. Columna de inmunoafinidad.

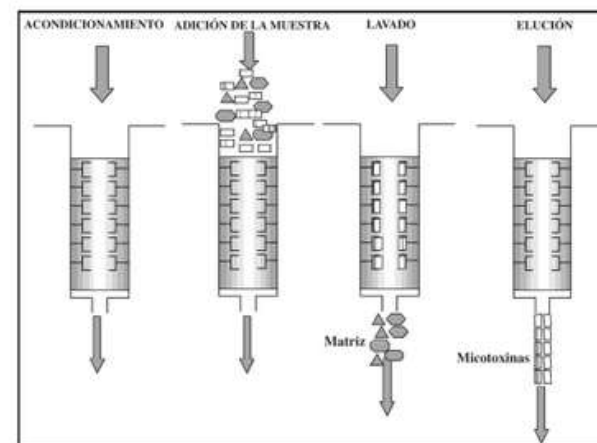


Figura 5.4. Extracción con columnas de inmunoafinidad.

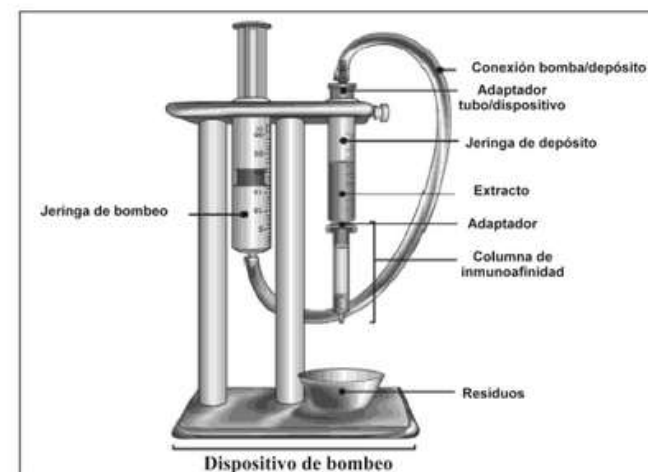


Figura 5.5. Conexión columna de afinidad/columna.

Actualmente se comercializan columnas de inmunoafinidad para aflatoxinas del grupo B, G y M, ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisinas, toxina T-2 y zearalenona. También se han desarrollando columnas de inmunoafinidad que permitan la extracción y purificación simultánea de varias micotoxinas al mismo tiempo como puede ser la OchraAflaprep para aflatoxinas y ocratoxina A.

2.4. Extracción por fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es aquel que se encuentra a presión y temperaturas superiores a las que definen su correspondiente punto crítico. La región supercrítica se puede alcanzar a partir de un gas por elevación de la temperatura y compresión. El resultado es un fluido con características de gas en transición a líquido, es decir aumenta su densidad y viscosidad y disminuye su coeficiente de difusión, por lo que presentan poder de solvatación y facilidad de penetración en la matriz. Aunque para la extracción supercrítica pueden utilizarse diversos gases, el dióxido de carbono es el más empleado por ser inerte, no tóxico y económico. También pueden utilizarse sistemas binarios de fluidos supercríticos con objeto de extraer micotoxinas más polares. Para ello se añade un modificador orgánico, generalmente metanol o isopropanol al 3-5%. Esta técnica se puede acoplar en línea con sistemas de cromatografía gaseosa, líquida o de fluidos supercríticos aumentando así su poder de resolución. Se ha empleado en la extracción de aflatoxina B1⁽³⁹⁾, y en diversas micotoxinas del género *Fusarium*⁽²¹⁾. Sin embargo presenta los inconvenientes de tener una baja reproducibilidad e interferencias de matriz.

2.5. Extracción asistida por microondas

Se basa en la absorción de energía de microondas por el disolvente y la muestra, produciéndose un incremento de la temperatura que facilita la difusión de compuestos desde la matriz al disolvente⁽²⁹⁾. Esta técnica se ha aplicado en la extracción de zearalenona seguido de cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas y con ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) en maíz y trigo obteniendo límites de cuantificación de 20 y 30 ng/g, respectivamente⁽³⁰⁾.

2.6. Extracción acelerada por disolventes

Consiste en una extracción sólido-líquido a temperatura y presión prefijadas. Para ello se rellena una columna con el alimento deseado y se bombea el disolvente, o la mezcla de disolventes, consiguiéndose en ocasiones una extracción más eficaz con menor cantidad de disolvente. Se ha aplicado a la determinación de ocratoxina A en arroz y derivados⁽¹⁹⁾, zearalenona en cereales y derivados^(31, 47) y fumonisina B₁, zearalenona y deoxinivalenol en maíz⁽³⁶⁾.

3. TÉCNICAS DE EXPLORACIÓN O SCREENING

La finalidad analítica de las técnicas de exploración o *screening* es la de descartar, de una manera rápida, las muestras negativas y reducir al máximo el número de análisis. Se aplican cuando existe un gran número de muestras, sin embargo es recomendable usar alguna técnica de confirmación para validar los resultados positivos dado que en general los métodos de *screening* son relativamente sensibles pero poco selectivos. Las técnicas de exploración más empleadas para el análisis de micotoxinas son los inmunoensayos y los biosensores.

3.1. Inmunoensayos

Dos técnicas se han utilizado para el análisis de micotoxinas: el radioinmunoensayo (*Radio Immuno Assay*, RIA) y el ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). El primero de ellos consiste en añadir al medio de reacción un anticuerpo específico y una cantidad conocida de la micotoxina marcada radioactivamente (³H, ¹⁴C o ¹²⁵I), la cual se incuba con la muestra problema. Tras un lavado del medio, se mide la radioactividad emitida por la muestra con un contador de centelleo, siendo la medida inversamente proporcional a la concentración de la micotoxina en la muestra problema. La concentración de la micotoxina se determina comparando los resultados con una recta patrón. Cada vez se utilizan menos por varias razones: el laboratorio debe estar autorizado para manipular radioelementos y además los costes de los patrones y de la gestión de los residuos es elevado. Su uso ha sido desplazado por el ELISA.

La técnica de ELISA, o enzimoimmunoensayo, se basa en la reacción específica antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y puede ser de tipo competitivo directo o indirecto. Es directo (Figura 5.6) cuando se añade al medio un extracto de la muestra y una disolución de la micotoxina unida covalentemente a un enzima (normal-

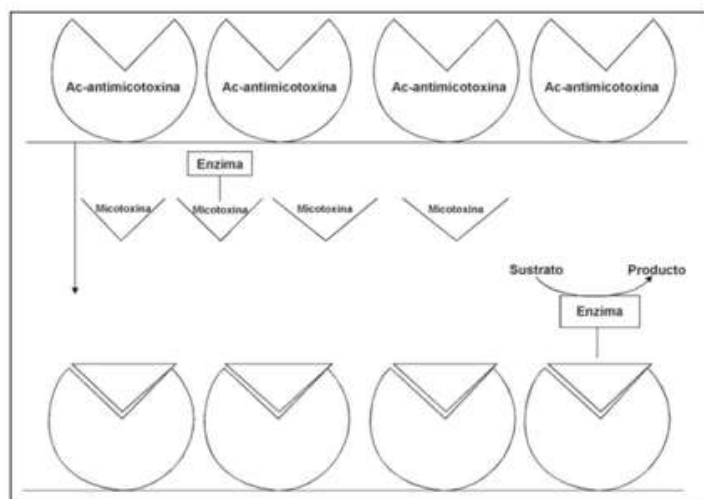


Figura 5.6. ELISA competitivo directo.

mente peroxidasa de rábano). Cuantas más moléculas de micotoxina existan en la muestra a estudiar, menos moléculas de micotoxina conjugadas a peroxidasa se unirán al anticuerpo y el color desarrollado por la acción de la peroxidasa sobre el sustrato que posteriormente se añade será inferior. Este tipo de técnica no se suele utilizar mucho por la dificultad que entraña la conjugación del anticuerpo específico y la enzima.

El ELISA de tipo competitivo indirecto (Figura 5.7) utiliza un segundo anticuerpo dirigido a la región constante del primer anticuerpo. La unión del primer anticuerpo dependerá de la cantidad del antígeno presente en la muestra a estudiar. La principal diferencia con respecto a la directa radica en que el segundo anticuerpo, que se añade en exceso, se unirá tanto más cuanto mayor sea la cantidad que se haya formado del complejo antígeno-1.^o anticuerpo. Es más económico que el directo porque el producto conjugado se comercializa a un precio razonable y actualmente se encuentra disponible para aflatoxinas, ocratoxina A, T-2, deoxinivalenol, zearalenona y fumonisinas⁽³⁷⁾.

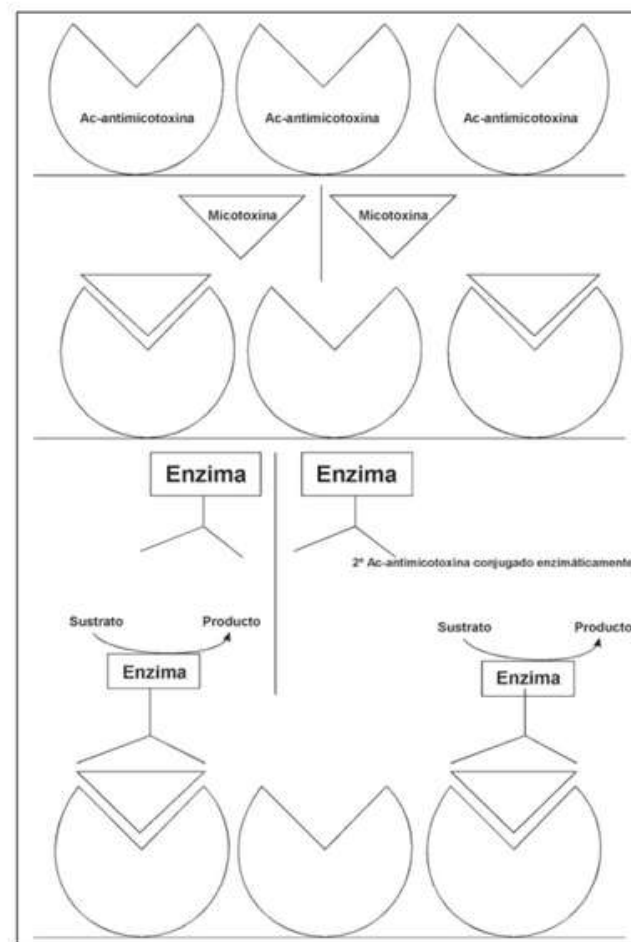


Figura 5.7. ELISA competitivo indirecto.

3.2. Biosensores

El biosensor es un dispositivo compacto de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico (un anticuerpo) asociado a un sistema de transducción, que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y la micotoxina. Cuando la micotoxina reacciona con el elemento de reconocimiento se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia de la micotoxina a estudiar y proporcional a su concentración en la muestra. Los sistemas de transducción más utilizados en el análisis de micotoxinas son de tipo óptico y piezoeléctrico. Las principales aplicaciones, ventajas e inconvenientes se exponen en la Tabla 5.2.

Los de tipo óptico, se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz como consecuencia de la interacción física o química entre la micotoxina a detectar y el elemento biológico de reconocimiento del biosensor. Los transductores que tienen propiedades ópticas y que son utilizados para el análisis de las micotoxinas son fundamentalmente los sensores de resonancia de plasmones (*Surface Plasmon Resonante*, SPR) y sensores de onda evanescente (*evanescent wave fibre optic*).

La resonancia de plasmones (que son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de un metal) superficiales es un fenómeno óptico que ocurre cuando una luz polarizada se dirige desde un prisma (con alto índice de refracción) hacia una capa de oro o de plata (con menor índice de refracción) y que se sitúa entre el prisma y la muestra. La luz que incide en la interfase entre el metal y el prisma provoca la excitación de un plasmón superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz, llamado ángulo de resonancia.

El ángulo de resonancia depende del índice de refracción del medio colindante a la lámina metálica, por lo que las variaciones que se produzcan en el mismo van a ser detectadas como cambios del ángulo de resonancia y este cambio es proporcional a la concentración. La unión de la micotoxina al elemento de reconocimiento supone un cambio de índice de refracción sobre la superficie del metal y, como consecuencia, un desplazamiento del ángulo de resonancia. Esta técnica favorece medidas directas en tiempo real, así como el análisis de muestras complejas sin purificación previa. Con este procedimiento se han analizado aflatoxina B₁, deoxinivalenol, fumonisina B₁ y zearalenona en cereales ⁽¹⁰⁾.

Tabla 5.2. Aplicaciones, ventajas e inconvenientes de los biosensores al análisis de micotoxinas.

Transductor	Micotoxina	Muestra	Ventajas	Inconvenientes
<i>Óptico</i>				
Resonancia de plasmones superficiales	Aflatoxina B ₁ Deoxinivalenol Fumonisin B ₁ Zearalenona	Cereales	Fáciles de usar. Detección directa. Detección en tiempo real. Elevada sensibilidad. Muestras sin purificar.	Sensibles a temperatura. Elevado coste.
Onda evanescente	Aflatoxinas Fumonisin	Maíz	Rapidez. Selectividad. Detección directa.	Requiere marcaje.
<i>Piezoeléctrico</i>				
Ondas acústicas de superficie	Ocratoxina A	Muestras líquidas	Detección directa. Análisis on-line. Fáciles de usar. Bajo coste.	Tiempos de incubación relativamente largos. Problemas con la regeneración de la superficie del cristal Número de pasos de lavado y secado elevado. Es necesaria la calibración de cada cristal. Interferencias.

Por otro lado, los sensores de onda evanescente se basan en un fenómeno conocido como reflexión interna total de fluorescencia, que consiste en la absorción y emisión de fotones. En este sensor, una radiación viaja a través de una guía de ondas y por reflexión interna total crea un campo electromagnético (campo evanescente), que puede penetrar a una determinada distancia desde la superficie dependiendo del ángulo de incidencia en la interfase y la longitud de onda de la radiación de excitación. Cualquier interacción molecular que se produzca en este campo (como la unión de la micotoxina a un receptor inmovilizado en la superficie de la guía de ondas) produce cambios en las características de la luz que se propaga por la guía de ondas y que pue-

den medirse y relacionarse con la concentración de la micotoxina objeto de estudio. Es una técnica directa, rápida y selectiva, pero es necesario utilizar marcaje con moléculas de propiedades fluorescentes. Los sensores de onda evanescente se han utilizado para la detección de fumonisinas y aflatoxinas en maíz ^(26, 28).

Los sistemas de transducción de tipo piezoeléctrico miden cambios directos de masa inducidos por la formación del complejo antígeno-anticuerpo. El material empleado son cristales recubiertos con el elemento de reconocimiento, el cual se pone en contacto con la muestra que contiene la micotoxina a detectar. La frecuencia de oscilación viene determinada por la masa del cristal, que varía cuando se produce la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito y da lugar a una variación en la frecuencia de oscilación. La resonancia puede tener lugar en toda la masa de cristal o sólo en la superficie. Este último lleva el nombre de ondas acústicas de superficie (*Surface Acoustic Wave*, SAW) y es el que se ha utilizado para la determinación de ocratoxina A en muestras líquidas ⁽¹⁰⁾.

4. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

En la Tabla 5.3 se observan las técnicas de confirmación más empleadas en los últimos treinta años para el análisis de las micotoxinas. A continuación se exponen con detalle cada una de estas técnicas.

4.1. Cromatografía en capa fina

Desde 1961, fecha en la que se descubrieron las aflatoxinas ⁽⁴⁾, la cromatografía en capa fina (CCF) (*Thin-Layer Chromatography*, TLC) ha sido uno de los métodos de elección para la investigación y determinación de micotoxinas. En la CCF normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar, siendo los componentes de la muestras, con características más polares, arrastrados más despacio y permitiendo la separación de las micotoxinas a analizar. Esta técnica es extremadamente útil cuando trabajamos con extractos muy limpios y en donde el desarrollo en una sola dirección (CCF-unidimensional) es suficiente para la separación. Sin embargo, cuando existen muchas sustancias interferentes o necesitamos aislar más de una micotoxina, se utiliza la CCF-bidimensional, y en donde se realiza la rotación de la placa 90°, después del secado de un primer desarrollo. En la CCF reversa, la fase móvil es polar y la fase estacionaria es apolar, siendo este tipo de CCF menos utilizada. Cabe destacar el estudio de

Tabla 5.3. Porcentaje de técnicas cromatográficas utilizadas en los últimos treinta años para el análisis de las micotoxinas (datos calculados basándose en las revistas citadas en el Index Citation).

Micotoxina	%				Método cromatográfico más usado
	CCF	EC	CG	CL	
Ác. bisoclámico	-	-	-	100	CL-DAD/CL-EM ²
Ác. ciclopiazónico	40	-	-	60	CL-UV/CL-DAD
Ác. kójico	22	-	22	56	CL-UV/CL-DAD
Ác. β-nitropropiónico	37	-	13	50	CL-UV/CL-DAD
Ác. penicílico	29	-	14	57	CL-UV/CL-DAD
Ác. tenuazónico	16	-	16	68	CL-UV/CL-DAD
Ácidos secalónicos	-	-	-	100	CL-UV
Aflatoxinas B y G	28	2	-	70	CL-DF/CL-EM
Aflatoxina M ₁	25	-	-	75	CL-DF/CL-EM
Alternariol	16	-	16	68	CL-UV
Altertoxina I-III	16	-	16	68	CL-UV/CL-DAD
Beauvericina	-	-	-	100	CL-UV/CL-DAD
Butenólido	25	-	25	50	CL-EM
Citreoviridina	25	-	-	75	CL-UV/CL-DF
Citrinina	24	-	1	75	CL-DF
Deoxinivalenol	-	-	25	75	CL-EM
Diacetoxiscirpenol	5	-	65	25	CG-EM
Esterigmatocistina	25	-	-	75	CL-DF/CL-DAD
Fumonisinas	8	10	-	82	CL-DF/CL-EM
Fusaproliferina	-	-	-	100	CL-EM
Fusarenona X	10	-	40	50	CL-EM
Fusarina C	25	-	25	50	CL-UV/CL-DAD
Fusarocromanona	25	-	25	50	CL-DF
Luteosquirina	75	-	-	25	CCF
Micotoxinas del género <i>Claviceps</i>	11	9	2	78	CL-EM
Moniliformina	10	10	10	70	CL-UV
Monoacetoxiscirpenol	-	-	60	40	CG-EM
Neosolanol	2	-	48	50	CL-EM ²
Ocratoxina A	30	-	4	66	CL-DF
Patulina	8	2	30	60	CL-UV/CL-EM
Penitremos	40	-	-	60	CL-UV/CL-EM
Roquefortina	40	-	-	60	CL-UV/CL-DAD
Rubratoxinas	3	-	-	97	CL-EM
Rugulosina	75	-	-	25	CCF
Sambutoxina	-	-	-	100	CL-UV
T-2 y HT-2	2	-	90	8	CG-EM
Toxina PR	48	-	-	52	CL-DAD
Xantomegnina	25	-	-	75	CL-DE
Zearalenona	5	5	10	80	CL-DF

CCF: cromatografía en capa fina; EC: electroforesis capilar; CG: cromatografía gaseosa; CL: cromatografía líquida; DAD: detector de diodos en línea; DF: detector de fluorescencia; EM: detector de espectrometría de masas; EM²: detector de espectrometría de masas en tándem; UV: detector de ultravioleta; DE: detector electroquímico. (Tomado de ⁽¹⁵⁾, con autorización de la Revista Iberoamericana de Micología).

Abramson *et al.* (1989) ⁽⁴¹⁾ que consiguieron la separación de dieciocho micotoxinas usando placas de octadecilsilíce.

Durante la década de los 80, se desarrolló la cromatografía en capa fina de alta resolución (*High-Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC) con desarrollo bidimensional. Tomlins *et al.* (1989) ⁽⁴⁴⁾ desarrollaron unas placas, con una altura de de 0,1 a 0,3 mm, formada por partículas de muy pequeño tamaño, en general de 2 a 10 μm , que presentan una alta eficacia y permiten una rápida separación de las aflatoxinas. En la década de los 90, Tripathi *et al.* (1991) ⁽⁴⁵⁾ combinaron el uso de la CCF con la espectroscopia de masas para la separación de aflatoxinas y tricotecenos. Sin embargo, en los últimos veinte años el número de publicaciones ha ido decreciendo desplazadas por otras técnicas cromatográficas.

4.2. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE) es una técnica basada en la migración de las moléculas polares en el interior de un capilar en cuyo interior fluye disolución tampón, cuando se les aplica una corriente eléctrica. La migración de un determinado ion depende de la relación carga/tamaño. A su vez el tamaño depende del peso molecular, de la estructura tridimensional y del grado de solvatación. Las dos versiones más ampliamente utilizadas de esta técnica son la electroforesis capilar en zona (*Capillary Zone Electrophoresis*, CZE), que utiliza un tampón simple, y la cromatografía electrocinética micelar (*Micellar Electrokinetic Chromatography*, MEKC), en la que se añade al tampón un tensioactivo (generalmente dodecilsulfato de sodio) que forma micelas. La electroforesis capilar en zona sólo es útil para compuestos ionizados, mientras que la cromatografía electrocinética micelar puede separar tanto compuestos ionizados como no-ionizados puesto que la migración de estas sustancias es función de su afinidad por las micelas presentes en la fase móvil. De las dos versiones, es la cromatografía electrocinética micelar la más empleada para el análisis de las micotoxinas, habiendo sido propuesta para la determinación de aflatoxinas ⁽³⁴⁾, fumonisinas ⁽²⁷⁾, zearalenona ⁽⁵⁵⁾ y patulina ⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, el principal inconveniente es la dificultad para determinar las bajas concentraciones a las que se encuentran las micotoxinas en las muestras reales. En la Figura 5.8 se observa un electroferograma de piensos en los cuales se detectan ocratoxinas y aflatoxinas del grupo B y G.

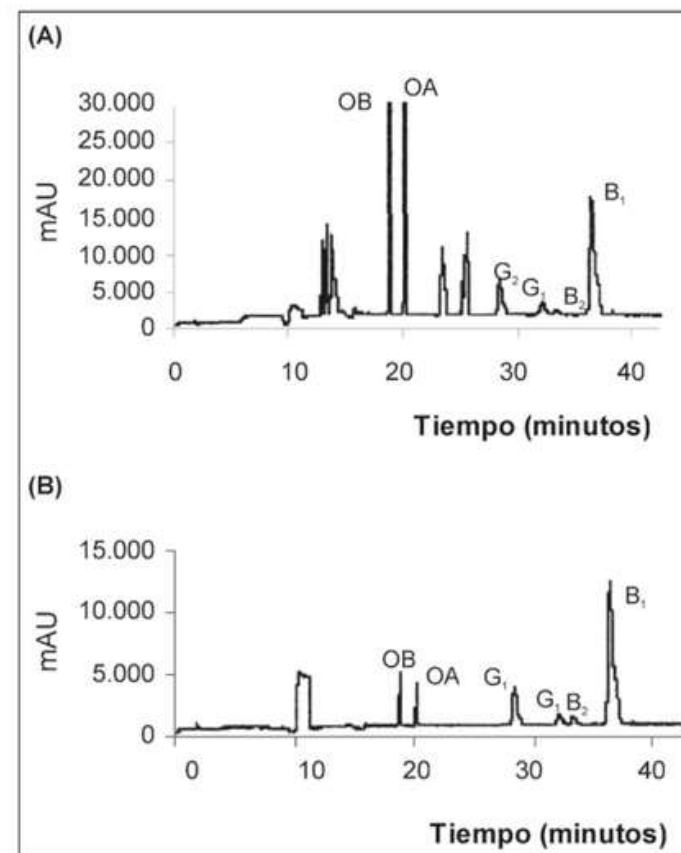


Figura 5.8. Electroferograma de piensos adicionada con ocratoxinas y aflatoxinas del grupo B y G. El electrolito estaba formado por 50 mM de SDS, 7 mM γ -ciclodextrina, 5% de acetonitrilo, 10 mM de NaH_2PO_4 y 6 mM de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ajustado a pH 8,0. La separación se realizó a 10 kV. (A) 214 nm y (B) 362 nm. (Tomado de Peña *et al.* (2002) *J. Chromatogr. A*, 967, págs. 303-314, con autorización de Elsevier).

4.3. Cromatografía gaseosa

La cromatografía gaseosa (CG) (*Gas Chromatography*, GC) es una técnica basada en la separación de compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria. Las micotoxinas son sustancias poco volátiles y se requiere una derivatización previa para analizarlas por CG. Algunas micotoxinas, entre ellas los tricotecnos, poseen grupos hidroxilos reactivos que pueden formar derivados trimetilsililo (TMS, *trimethylsilyl*), trifluoroacetilo (TFA, *trifluoroacetyl*) y heptafluorobutirilo (HFB, *heptafluorobutyl*), siendo los productos de reacción, susceptibles de ser determinados, por ejemplo, con un detector de captura de electrones (*Electron Capture Detector*, ECD). En los últimos años, se ha generalizado, tanto para el análisis de tricotecnos como para otras micotoxinas, el empleo de columnas capilares y el uso del detector de espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS). Las columnas capilares tienen una serie de ventajas como son su alta eficacia en la separación y la facilidad de acoplamiento a detectores de espectrometría de masas. Los detectores de espectrometría de masas se aplican cada vez más en el análisis de micotoxinas, tanto en sus modalidades de impacto electrónico o de ionización química. El modo de adquisición de iones mediante la monitorización de iones seleccionados (SIM, *Selective Ion Monitoring*) suele elegirse cuando se requiere el máximo de sensibilidad. El modo de barrido de iones (*full scan*) proporciona el máximo de información estructural para la identificación inequívoca de los analitos. La formación del heptafluorobutiril derivado se usa tanto en el detector de captura de electrones en espectrometría de masas como para determinar tricotecnos, patulina y zearalenona.

La primera aplicación de la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) para el análisis de micotoxinas, la realizó en 1981 para el deoxinivalenol el grupo de investigación del doctor Scott⁽³⁸⁾. Jiao *et al.* (1992)⁽¹⁸⁾ realizaron el primer análisis de ocratoxina A por CG-MS mediante la formación del éster metílico *O*-metilocratoxina A. Sin embargo, el uso más extendido de esta técnica se realiza en el análisis de tricotecnos del grupo A (diacetoxiscirpenol, toxinas T-2 y HT-2) que no presentan propiedades fluorescentes y no absorben en la zona del espectro UV. En la Figura 5.9 se observa un cromatograma de muestra de sémola de maíz obtenido con un CG-EM.

4.4. Cromatografía líquida

Las micotoxinas representan a una gran variedad de compuestos de distinta estructura, polaridad y propiedades ácido-base. Desde hace treinta años se dis-

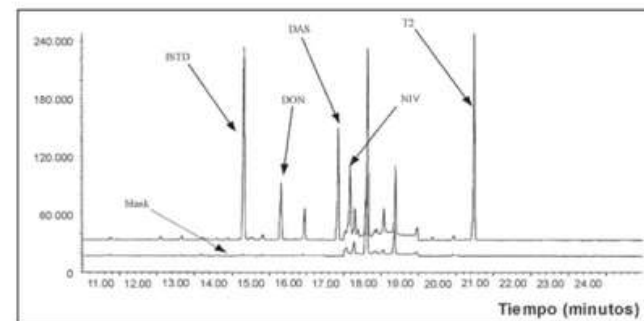


Figura 5.9. Cromatograma de una muestra de sémola de maíz obtenido por cromatografía gaseosa acoplada a un detector de espectrometría de masas. El cromatograma inferior y el superior corresponden a una muestra sin adicionar y a una muestra adicionada con cuatro tricotecnos: deoxinivalenol (DON), diacetoxiscirpenol (DAS), nivalenol (NIV), toxina T2 (T2) a una concentración de 1 mg/kg cada una, respectivamente. (Tomado de Eke *et al.* (2004). *Microchemical Journal*, 78, págs. 211-216, con autorización de Elsevier).

pone de métodos de cromatografía líquida (CL) (*Liquid Chromatography*, LC) para el análisis de gran cantidad de compuestos. La primera publicación sobre la aplicación de la CL en el análisis de micotoxinas es de 1973⁽³⁵⁾ y desde entonces se ha aplicado cada vez más a este cometido. Entre las ventajas más importantes que presenta la CL se encuentra la posibilidad de separar sustancias termolábiles, no volátiles, polares y apolares con aceptable resolución entre sustancias químicamente similares, de manera rápida y reproducible. Tal y como se observa en la Tabla 5.3 es la técnica más habitual para el análisis de micotoxinas, acoplada a distintos detectores.

Se encuentra en la literatura diversas revisiones sobre el análisis de las micotoxinas por esta técnica^(22, 40), se observa una clara preferencia de la fase reversa sobre la fase normal. En este último caso, las fases estacionarias están compuestas por partículas de sílice o aluminio, bien libres o bien unidas covalentemente a terminales alquilo de grupos ciano, diol, nitro y amino. La fase móvil consiste en mezclas de un componente de débil polaridad como el hexano, diclorometano, metil tert-butil éter, acetato de etilo o acetonitrilo, normalmente como mezclas binarias o ternarias. La CL en fase normal fue muy utilizada en un principio para el análisis de aflatoxinas, pero ha sido relegada por los sistemas en fase reversa.

La CL en fase reversa usa fases estacionarias hidrocarbonadas y fases móviles acuoorgánicas. La interacción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria

depende en principio de las fuerzas de dispersión (interacciones hidrófobas no específicas) separándose los compuestos según su hidrofobicidad, los componentes más polares se eluyen primero. Las fases estacionarias apolares se preparan uniendo grupos octilo (C_8), octadecil (C_{18}) o cadenas cortas de grupos fenilo, cianopropilo y n-alquilo a la superficie del sílice a través de los grupos silanoles (SiOH). La retención de las sustancias está controlada principalmente por la fase móvil, jugando en segundo plano la fase estacionaria; el óptimo en la selectividad se alcanza combinando correctamente los componentes de la fase móvil. Los solventes orgánicos más empleados son el metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano en diferentes combinaciones con agua destilada. La elución isocrática es útil cuando se estudian compuestos de estructura química y polaridad similares, mientras que la elución en gradientes es preferible en la separación de muestras que contienen micotoxinas de diferente polaridad. Las muestras con compuestos ionizables se pueden analizar añadiendo aditivos a la fase móvil de forma que podamos servirnos de dos técnicas: la supresión iónica y el par iónico, empleando el contraión adecuado. Añadiendo a la fase móvil ácido acético, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético (TFA), trietilamina (TEA), o soluciones reguladoras (fosfato, acetato, borato, etc.), se puede controlar el pH de forma que se suprima la posible ionización de las moléculas de la muestra e incluso la de los grupos del relleno de la columna. O bien se puede formar un par iónico empleando el contraión adecuado de signo opuesto a la sustancia problema; el complejo resultante, al no poseer carga eléctrica y ser voluminoso interactuará más fácilmente con la fase estacionaria apolar. Se suelen utilizar alquilsulfonatos (heptanosulfonatosódico) para la separación de bases protonadas y bases de amonio cuaternario (hidróxido de tetrabutilamonio) para grupos carboxilo u otros aniones. Por ejemplo, la moniliformina ⁽⁴²⁾ y el ácido tenuazoico ⁽²⁵⁾ han sido analizados usando la cromatografía de par iónico.

Los detectores utilizados son: UV, que es universal pero poco selectivo ya que muchas moléculas absorben a la misma longitud de onda que las micotoxinas; fluorescencia, que por el contrario es muy selectivo, y espectrometría de masas (EM) que genera detecciones específicas. La espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida ha experimentado en la última década un importante desarrollo gracias a las mejoras introducidas en las interfases, por lo que se ha convertido en la técnica de elección para la identificación y cuantificación de micotoxinas termolábiles. El acoplamiento cromatografía líquida-espectrometría de masas no es tan sencillo como en el caso de la cromatografía de gases-espectrometría de masas, debido a que la transferencia de analitos debe realizarse desde una fase líquida en lugar de una fase gaseosa. En la práctica, las interfases más difundidas son la termonebulización (*Thermospray*, TSP) que nebuliza utilizando calor, la electronebulización (*Electrospray*, ES) aplica un campo eléctrico en el extremo de un capilar, y la ionización química a presión

atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) donde la nebulización se consigue con ayuda de una corriente de nitrógeno a alta velocidad. Otra técnica menos extendida es el haz de partículas (*Particle Beam*, PB), en la cual se hacen llegar las moléculas neutras de la micotoxina hasta la fuente de ionización mediante una difusión selectiva. También se han aplicado al análisis de micotoxinas sistemas de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), mediante los cuales se seleccionan un ion de interés en una primera etapa y se vuelve a fragmentar en una segunda; estos sistemas pueden proporcionar información estructural adicional y facilitan la identificación y cuantificación de los analitos en mezclas complejas. Sin duda, los detectores de MS/MS, como la trampa iónica y el triple cuadrupolo, serán en el futuro de uso imprescindible al menos para la confirmación de resultados positivos obtenidos por cromatografía líquida con detectores UV o fluorescencia. En la Figura 5.10 se observa un cromatograma de una muestra de cacahuete conteniendo AFB₁ y AFG₁ mediante el análisis de CL con detector de fluorescencia y de espectrometría de masas.

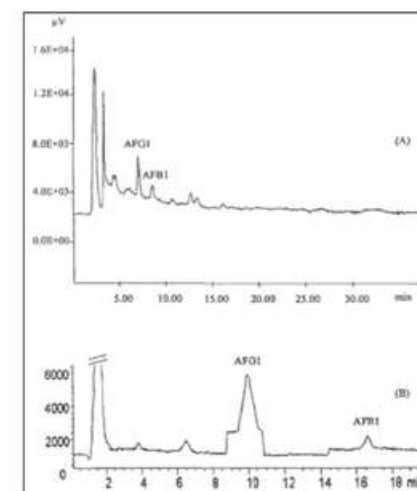


Figura 5.10. Cromatograma de una muestra de cacahuete conteniendo AFB₁ (0,25 ng/g) y AFG₁ (1,68 ng/g) mediante el análisis de cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia (A) y de espectrometría de masas con ionización por electronebulización (B). (Tomado de Blesa et al. (2003). *J. Chromatogr. A*. 1011, págs. 49-54, con autorización de Elsevier).