



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO



FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

MÉTODOS DE ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE
OCRATOXINA A.

TRABAJO RECEPCIONAL EN LA MODALIDAD DE:

TESINA.

PRESENTA:

THOMAS CORDOVA ROMERO.

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

ASESOR:

D.C.VIRGINA ANGELICA ROBINSON FUENTES.

MORELIA, MICHOACÁN, OCTUBRE DEL 2015

INDICE.

I. RESUMEN.	2
II. ABSTRACT.	3
III. ABREVIATURAS.	4
IV. INTRODUCCIÓN.	7
V. CLASIFICACIÓN DE MICOTOXINAS.	8
5.1. AFLATOXINAS.	8
5.2. FUMONISINAS.	9
5.3. PATULINA.	9
5.4. ZEARALENONA.	10
5.5. DEOXINIVALENOL.	10
5.6. OCRATOXINAS.	10
VI. CARACTERÍSTICAS DE LA OCRATOXINA A.	11
6.1. FORMACIÓN EN EL ALIMENTO.	11
6.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.	11
6.3. CLASIFICACIÓN Y TOXICIDAD.	11
6.4. VIAS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA.	11
VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE EL ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN EL PERIODO 2007-2014.	13
7.1. DETERMINACIÓN DE OTA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS.	13
7.2. DETERMINACIÓN DE OTA EN TEJIDOS Y FLUIDOS ANIMALES.	20
7.3. PRESENCIA DE OCRATOXINA A EN PRODUCTOS VEGETALES.	28
7.4. DETERMINACIÓN DE OTA EN GRANOS Y CEREALES.	32
7.5. DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA EN ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO.	40
7.6. DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA ESTUDIAR A LA OTA.	49
7.7. MODIFICACIONES A LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MEDIR LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A.	52
7.8. DETERMINACIÓN DE OTA EN BEBIDAS.	54
7.9. DETERMINACIÓN DE OTA MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	62
7.10. CONCENTRACIONES MÁXIMAS PERMITIDAS PARA LA OCRATOXINA A EN PRODUCTOS ELABORADOS.	67
VIII. CONCLUSIÓN.	68
IX. REFERENCIAS.	69
X.- GLOSARIO.	80

I. RESUMEN.

MÉTODOS DE ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A.

Las micotoxinas son producidas por ciertos hongos pertenecientes a los géneros de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, principalmente. Dichos hongos suelen encontrarse en una gran variedad de productos agrícolas siendo los contaminantes naturales de alimentos más comunes a nivel mundial. La ingesta diaria de alimentos contaminados por micotoxinas de hongos en altas concentraciones, tienen efectos mutágenos, cancerígenos e inclusive producen malformaciones en los fetos (teratógenos) y disminuyen la inmunidad (inmunosupresores).

Su presencia en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de animales debido a su gran variedad de efectos tóxicos. De la amplia variedad de micotoxinas existentes, la Ocratoxina A (OTA) es el motivo de estudio de este trabajo por su alta toxicidad, sobre todo a nivel renal y por que es muy poco estudiada; de hecho, en México no esta reportado su incidencia y/o consumo además de no existir normas que limiten su contenido en alimentos de consumo humano o animal.

La determinación de la presencia de OTA en productos alimenticios y en fluidos biológicos, requiere de metodologías de análisis muy sensibles, específicas y aprobadas. La revisión aquí presentada, se enfoca en las diversas técnicas de análisis así como sus metodologías para la determinación de OTA en diversos tipos de muestras.

Palabras clave: Micotoxina, Ocratoxina A, Alimentos, Contaminación, Métodos.

II.ABSTRACT.

METHODS OF ANALYSIS AND DETERMINATION OF OCHRATOXIN A

Mycotoxins are produced by fungi of the genus *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, among others. Such fungi are found in a large variety of agricultural products and mycotoxins represent the most common world-wide food contaminants. Daily consumption of contaminated food with high concentrations of mycotoxins can have mutagenic, carcinogenic, teratogenic and immunosuppression effects.

Mycotoxins presence in food is considered of high risk to human and animal health due to the large variety of toxic effects. There is a large number of mycotoxins; however only Ochratoxin A (OTA) is covered in this study. This work is focus on OTA due to its high toxicity, at renal level mainly, and because it is not very well studied in Mexico. Actually, there are no reports related to consumption or presence of this mycotoxin in foods or feeds.

Successful determination of OTA requires robust techniques and methodologies for its analysis. In this review, we focus on the different available methods for OTA analysis in a wide variety of food products as well as in biological fluids.

Keywords: Mycotoxins, Ochratoxin A, Foods, Contamination, Methods.

III. ABREVIATURAS.

AFB	Aflatoxinas	FBS	Fumonisin
ALP	Fosfatasa alcalina	FDA	Administración de alimentos y medicamentos de estados unidos
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos	FLD	Detección de fluorescencia
ASSS	Anfífilo supramoleculares	FP	Polarización de fluorescencia
BaPy	Pireno	FTIR-ATR	Espectroscopia infrarroja de Fourier de reflexión total atenuada
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas	GFP	Proteína verde fluorescente
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación	HACCP	Puntos de Control Crítico y de Análisis de Riesgos
BPS	Buenas Prácticas de almacenamiento	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
BSA	Albumina sérica bovina	HRP	Peroxidasa de rabano picante
CV	Coeficiente de variación	HSA	Albumina sérica humana
CIT	Citrinina	IAC	Columnas de inmunoafinidad
CL/MS/MS ó LCMS-MS	Cromatografía líquida por espectrometría de masas en tándem o de electro spray	IARC	Agencia internacional para la investigación en cáncer
CL-UV	Cromatografía líquida y ultravioleta	IDA	Ingesta diaria admisible
COV	Compuestos orgánicos volátiles	IgG	Inmunoglobulina G
DON	Deoxinivalenol	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EDMA –	Fabricación de un Nano reactor de alto	PEG	Polietilenglicol

GMA	rendimiento de politripsina		
LC/EST- MS/MS.-	Cromatografía líquida con ionización electro spray y espectrometría de masas	PTFE	Politetrafluoretileno
LC-Q- TOF-MS	Cromatografía líquida/ tiempo de vuelo/espectrometría de masas	PVP	Poli vinilpirrolidona
L-L	Líquido – líquido	RGN	Regucalcina
LOD	Límite de detección	ROS	Nivel de especies reactivas de oxígeno
LOQ.	Límite de cuantificación	RPD	Razón de desviación del rendimiento
LRQ	Coeficientes de correlación múltiple	RSD	Desviación estándar relativa
Mab	Anticuerpo monoclonal	RSDr	Desviación estándar relativa de reproducibilidad
MNPs	Nanopartículas magnéticas modificadas	RTI- PCR.	PCR en tiempo real
Msam	Monocapa de auto ensamblado	SCF	Comité Científico de la Alimentación Humana
MS-MS	Espectrometría de masas en tandem	SIAN	Coordinación del Servicio Cosas Higiene de los Alimentos y Nutrición
MWF	Fibras de trigo micronizadas	SLM	membrana líquida soportada
NIRS	Espectroscopía de infrarrojo cercano	SPE - off-line	Extracción en fase sólida fuera de línea
NIV	Nivalenol	SPR	Plasmones superficiales
OTA	Ocratoxina A	SWNT	Nanotubos de carbono de pared simple
OTB	Ocratoxina B	SWV	Voltamperometría de onda

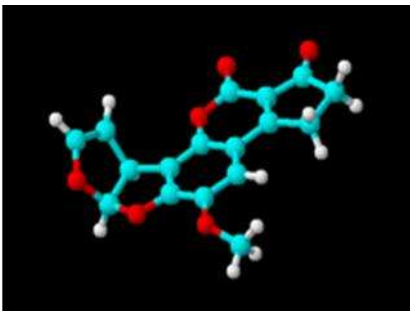
			cuadrada
PAB	Anticuerpo policlonal	UE	Unión Europea.
PCL	Paredes de las células de levadura	UFC	Unidades formadoras de colonias
ELISA	Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas	UV	Ultra Violeta
ESI +	Electro ionización	ZEA	Zearalenona

IV. INTRODUCCIÓN.

El presente trabajo de investigación está enfocado a un grupo de sustancias denominadas micotoxinas, porque son producidas por ciertos hongos pertenecientes a los géneros de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, principalmente. Dichos hongos suelen encontrarse en una gran variedad de productos agrícolas siendo los contaminantes naturales de alimentos más comunes a nivel mundial; son altamente tóxicos y en altas concentraciones pueden ser mutágenos, cancerígenos, producen malformaciones en los fetos (teratógenos) y disminuyen la inmunidad (inmunosupresores). Debido a su gran variedad de efectos tóxicos, y sobre todo a su extrema resistencia al calor, la presencia de las micotoxinas en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de animales. La contaminación de los alimentos depende de las condiciones ambientales en las que se producen; cuando las condiciones no son las apropiadas, puede haber crecimiento fúngico lo que probablemente de lugar a la producción de micotoxinas. La mayoría de los productos agrícolas pueden ser susceptibles de contaminación casi en cualquier momento, desde su producción en el campo, durante la cosecha, en el transporte y en el almacenamiento (Abraham y Ernesto, 2009). Aún cuando hay muchas micotoxinas, este trabajo sólo abarca a la Ocratoxina A (OTA) porque tiene una alta incidencia, produce cáncer a nivel renal, está muy poco estudiada en México y no existen leyes que regulen su presencia en alimentos. La incidencia de la OTA resultó una problemática a nivel mundial por lo que los investigadores se enfocaron a desarrollar nuevos métodos para su identificación tanto cualitativos como cuantitativos. Como se ha mencionado, la ocratoxina A se encuentra en diversos alimentos por lo que al ingerirla se distribuye en distintos sitios del organismo a través de la sangre. Es por eso que se realizan estudios para su detección. Se demostró que hay presencia de OTA en muestras humanas y estudios documentan los niveles y/o concentraciones obtenidos en distintos países, por lo que su búsqueda se derivó a diversas muestras obtenidas. Existe una gran preocupación porque los hongos se encuentran en el medio ambiente y fácilmente puede contaminar todo tipo de sustratos lo que representa una amenaza para los animales que se encuentran expuestos a estas toxinas. Entonces, los animales destinados a consumo humano que a su vez consumen OTA de alimentos contaminados y los humanos los consumen también directamente de alimentos contaminados por lo que se puede decir que hay una doble exposición a esta micotoxina. Por lo tanto, es importante contar con métodos adecuados para evaluar la calidad de los alimentos destinados tanto a consumo humano, animal y los derivados. Para lo cual se han desarrollado metodos de extraccion, cuantificación y determinación de OTA, mostrando gran desempeño en el análisis (Prieto et al, 2008). Son de varios tipos pero destacan los métodos que utilizan columnas de inmuno afinidad (IAC), HPLC con varios detectores incluyendo de espectrometría de masas, fluorescencia, etc. (Noba et al, 2008). A continuación, se

muestran aspectos generales de las micotoxinas para después enfocarse a una revisión de artículos publicados que abarcan el periodo de 2007 al 2014 y que sólo se refieren a la determinación de OTA en diversas muestras biológicas, de alimentos, etc.

V. CLASIFICACIÓN DE MICOTOXINAS.



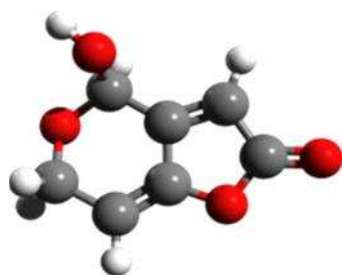
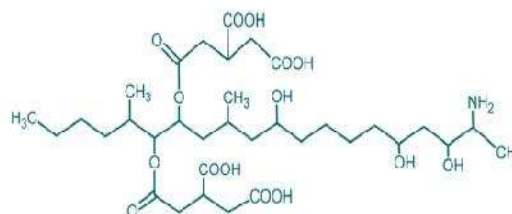
5.1. AFLATOXINAS.

Son un grupo de aproximadamente 20 compuestos producidos por especies de *Aspergillus* (*flavus* y *parasiticus*). Hay cuatro principales aflatoxinas: AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. Generalmente, la AFB1 es la de mayor ocurrencia y se presenta en mayor concentración en los productos alimenticios. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

clasificó a las AFS en el grupo 1 como sustancias o mezclas con alto poder cancerígeno en humanos. La producción de AF es un problema serio de salud pública asociado a materiales como el cacahuate, pistaches, semillas de algodón, y nueces. Pero es sobre todo un problema en el maíz, por su amplio uso en la alimentación humana así como animal. Los alimentos con relativamente bajo riesgo de contaminación con AFS son: almendras, pasas, higos y especias. De estas últimas, las que han mostrado una mayor incidencia de contaminación con AF, son los chiles, pimentones y el jengibre: los frijoles, soya, sorgo, trigo, avena y arroz son moderadamente susceptibles a la contaminación (Abraham y Ernesto, 2009). La toxicidad aguda de las AFS se manifiesta principalmente como lesiones hepáticas. En la forma subaguda, los animales jóvenes pueden presentar retardo en el crecimiento, pérdida del apetito, se compromete el sistema inmune por su acción degenerativa sobre el timo, aumento de la fragilidad capilar afectando el tiempo de coagulación sanguínea y de allí, la presencia de hematomas, postración y muerte (Rivero et al, 1998). También son inmunosupresoras que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma (Sharna, 1993). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), estableció en 1977 un límite permisible de 20 µg/kg para las AFS totales en los alimentos destinados al consumo humano. Sin embargo, en algunos países europeos se han establecido límites de tolerancia más estrictos, específicamente para la AFB1, reglamentando 5 µg/kg para los alimentos destinados tanto al consumo humano y animal. (Abraham y Ernesto, 2009).

5.2. FUMONISINAS.

Las Fumonisin (FBS) son compuestos polares, solubles en agua y solventes como el metanol y el acetonitrilo, pero insolubles en compuestos apolares. No presentan una estructura cíclica como se puede encontrar en la mayoría de micotoxinas. Bajo condiciones alcalinas, los grupos del ácido tricarbálico se rompen, convirtiéndose en la forma hidrolizada correspondiente. Las FBS son producidas por *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y otras especies del género *Fusarium*, que se pueden encontrar como contaminantes naturales en cereales de todo el mundo, especialmente el maíz (Marasas et al, 1996). Existen al menos tres FBS de ocurrencia natural: se conocen como FB1, FB2 y FB3. La FB1 es siempre la más abundante, seguida por la FB2 y la FB3. Las FBS son relativamente estables y no son destruidas por tratamientos con calor moderado, luego del tratamiento del maíz con CaOH (nixtamalización) no se han detectado FBS en las tortillas. Existen diferencias entre países respecto al límite de tolerancia establecido para estas micotoxinas. Se ha propuesto 5mg/kg para proteger a los animales más susceptibles, como los caballos, 50 mg/kg para cerdos y para el humano de 1mg/kg (Abraham y Ernesto, 2009).



5.3. PATULINA.

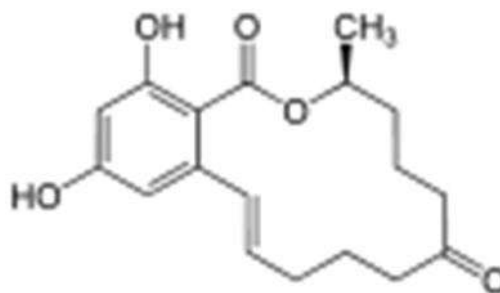
Es un compuesto tóxico producido por una gran variedad de especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. De ellos, *P. expansum* es el más importante, pues es un contaminante común de las manzanas y otros frutos. Se ha reportado que la patulina posee actividad antibiótica, la cual ha sido evaluada en humanos para probar su utilidad en el tratamiento de los resfríos comunes; sin embargo, su efectividad aún no ha sido claramente demostrada debido a que es altamente irritante al estómago y además suele ocasionar náuseas y vómito (Abraham y Ernesto, 2009).

La patulina se ha detectado en una gran variedad de frutas, pero en manzana se encuentran concentraciones más elevadas. Normalmente, las manzanas después de la cosecha son almacenadas en condiciones de refrigeración para prolongar la vida útil algunas semanas o incluso algunos meses. En estas condiciones *P. expansum* continúa creciendo y produciendo PAT (JECFA, 2002).

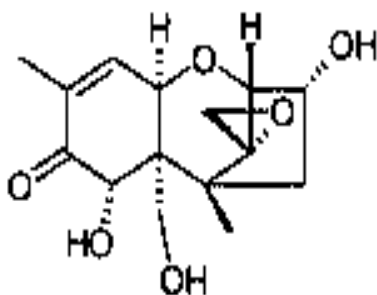
5.4. ZEARALENONA.

Esta micotoxina también es conocida como toxina F-2 o ZEN, y es producida por especies del hongo *Fusarium*, comúnmente *F. graminearum* y *F. culmorum*. El efecto más importante de la zearalenona es sobre el sistema reproductivo, causando exceso de producción de estrógenos

(hiperestrogenismo), particularmente en las cerdas. Hay poca evidencia de que la zearalenona cause cáncer; sin embargo, la evidencia respecto a su capacidad de causar mutaciones (genotoxicidad) es contradictoria, pues se ha reportado que es genotóxica en ratones (Abraham y Ernesto, 2009).



5.5. DEOXINIVALENOL.

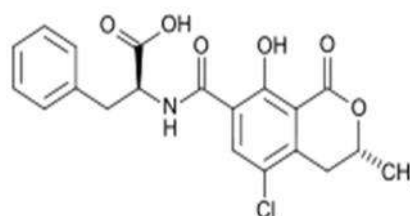


El deoxinivalenol (DON) pertenece al grupo de las micotoxinas producidas por hongos que contaminan los cereales y alimentos a base de cereales, pudiendo provocar al ser humano una intoxicación al consumir dichos alimentos contaminados con altas concentraciones (ELIKA, 2013). Es uno de los 150 compuestos conocidos como tricotecenos, y su toxicidad ha sido difícil de relacionar con los resultados experimentales de situaciones reales,

debido a que generalmente se presenta acompañado de otros tipos de tricotecenos. En particular, la toxicidad del DON se caracteriza por vómito y diarrea, mientras que en una intoxicación aguda puede observarse necrosis en el tracto gastrointestinal y en los tejidos linfoides (Abraham y Ernesto, 2009).

5.6. OCRATOXINAS.

Las ocratoxinas son micotoxinas que afectan al sistema nervioso (neurotóxicas) y pueden causar cáncer de riñón (nefrocarcinógenas) y son producidas por *Penicillium verrucosum* en regiones con clima frío, y por algunas especies de *Aspergillus* (*A. ochraceus*) en regiones con clima tropical. La mayoría de estos hongos producen principalmente la micotoxina y raras veces otra especie B. La IARC clasificó a OTA en el grupo 2B, como una sustancia posiblemente cancerígena en humanos, son moléculas moderadamente estables y por tanto suelen resistir la mayoría de los procesos de elaboración de los alimentos, como el hervido, el tostado, el horneado, el freído y la fermentación. La ocurrencia natural de la OTA



es evidente en la mayoría de los cereales como maíz, trigo, cebada, sorgo, arroz, avena y centeno. También se han encontrado en otros alimentos como los frijoles, la soya, el café, las nueces, los frutos secos, el cacao, los jugos y los vinos de uva, la cerveza y en algunas especias. E.U y la Comisión Europea establecieron un límite máximo de tolerancia de 5µg/kg para los cereales no destinados al consumo humano, 3 µg/kg para los destinados al consumo humano, 3 µg/kg para los granos de café tostado; 10 µg/kg para el vino procedente de frutos deshidratados, 2 µg/kg para los granos de cacao, 0.5 µg/kg para el vino de mesa y los jugos de uva, y 0.2 µg/kg para la cerveza (Abraham y Ernesto 2009).

VI. CARACTERISTICAS DE LA OCRATOXINA A.

6.1. FORMACIÓN EN EL ALIMENTO.

Pueden formarse tanto en el cultivo del alimento en campo, principalmente cereales (trigo, arroz cebada y maíz) como en la recolección, transporte, almacenamiento y secado por inadecuadas prácticas de higiene y manipulación de los cereales (ELIKA, 2013).

6.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Dichos hongos requieren ciertas condiciones favorables para su crecimiento y producción de ocratoxinas, generalmente, altas temperaturas y elevada actividad de agua (en el ambiente y en el suelo). Así mismo, los daños físicos de las cosechas (por golpes, ataques de insectos, roedores, aves etc) favorecen a la proliferación de hongos y su consecuente producción de dichas toxinas. Fue de vital importancia conocer los valores óptimos de humedad (95-99%) y de temperatura (24°C) en los que, el hongo *A. ochraceus* puede producir OTA a temperaturas entre 12-37°C y *P. verrucosum* entre 4-31°C (ELIKA, 2013).

6.3. CLASIFICACIÓN Y TOXICIDAD.

Existen varios tipos de ocratoxinas pero la OTA es la más frecuente en alimentos y la que presenta mayor toxicidad, está clasificada como “posiblemente cancerígena para el ser humano” por sus propiedades carcinógenas, mutagénicas, teratogénicas siendo específicamente nefrotóxica e inmunotóxica (ELIKA, 2013).

6.4. VÍAS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA.

La OTA puede entrar en la cadena alimentaria transmitiéndose al ser humano:

- Directamente a través del consumo de alimentos vegetales (cereales y productos a base de cereales, café, cacao, frutos secos, frutas y productos derivados).

- Indirectamente a través del consumo de productos derivados de animales que han consumido alimentos contaminados con OTA (ELIKA, 2013).

A continuación, la siguiente tabla muestra el límite de tolerancia permitido en la ingesta de productos alimenticios por la agencia internacional para la investigación en cáncer.

TABLA 1. MICOTOXINAS ENCONTRADAS COMO CONTAMINANTES EN LOS ALIMENTOS

<i>Micotoxina</i>	<i>Efectos</i>	<i>Hongo productor</i>	<i>Grupo IARC*</i>	<i>Límite de tolerancia</i>
Ocratoxina A	Nefrotóxicas	<i>Penicillium verrucosum</i>	2B	3 mg/kg (cereales)
	Nefrocancerígenas	<i>Aspergillus ochraceus</i>		
Zearalenona (F-2 o ZEN)	Estrógenas	<i>Fusarium graminearum</i>	3	1 mg/kg (cereales)
	Genotóxicas	<i>F. culmorum</i>		
Patulina	Poca evidencia experimental o clínica, de sus efectos en humanos	<i>Penicillium expansum</i>	3	50 mg/L (jugo de manzanas)
Tricotecenos	Citotóxicas	<i>Fusarium graminearum</i>	3	0.5 mg/kg (cereales)
Deoxinivalenol (DON)	Inmunosupresoras	<i>F. verticillioides</i>		0.75 mg/kg (harinas)
		<i>F. culmorum</i>		
Fumonisin FB ₁ , FB ₂ y FB ₃	Leucoencefalomalacia en equinos	<i>Fusarium verticillioides</i>	2B	1 mg/kg para FB ₁ y FB ₂ (maíz)
	Edema pulmonar en porcinos	<i>F. proliferatum</i>		
	Cáncer en humanos			
Aflatoxinas AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	Cancerígenas	<i>Aspergillus flavus</i>	1	20 mg/kg para aflatoxinas totales
	Mutágenas	<i>A. parasiticus</i>		
	Teratógenas			5 mg/kg para AFB ₁ en cereales

* International Agency for Research on Cancer.

Fuente: (Abraham y Ernesto 2009).

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE EL ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN EL PERIODO 2007-2014.

7.1. DETERMINACIÓN DE OTA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS.

Durante el 2008 se demostró la presencia de OTA en muestras humanas por lo que se documentaron los niveles de consumo en distintos países. Su búsqueda se realizó en diversas muestras obtenidas, para conocer los niveles de exposición a esta micotoxina. En Eslovaquia se realizó un estudio para medir la OTA en leche materna, mediante HPLC utilizando 76 muestras, analizando como prueba 23 de ellas, se encontró contaminación en 9 muestras presentando una concentración de entre 2.3/0.99 ng/L a 60.3/25.93 ng/L de OTA niveles por encima de lo permitido (Dostal et al, 2008).

Continuando con la identificación de OTA en plasma, se ha encontrado presente en muestras de sangre obtenidas de personas provenientes de la mayoría de los países europeos: sin embargo, en Latinoamérica se realizó un estudio en Argentina donde no se encontró un informe relativo a la presencia de OTA. El objetivo de tal estudio fue evaluar la concentración de la micotoxina en el plasma humano en dos áreas diferentes de la provincia de Buenos Aires. La OTA se determinó por HPLC en 199 muestras de plasma de donantes de sangre en Mar del Plata y 236 muestras de General Rodríguez. Se empleó la extracción en fase sólida con cartucho Bakerbond C-18 y una purificación final con IAC "Ochraprep". El Límite de cuantificación (LOQ) de la OTA fue de 0.019 ng/ml y la confirmación de OTA fue por la adición de la misma. Los resultados obtenidos mostraron que 63.8% de las muestras de plasma de Mar del Plata y 62.3% de General Rodríguez, fueron positivos para OTA, con niveles de 0.15 y 0.43 ng/ml, respectivamente. Concluyeron que sería importante continuar la investigación para detectar la fuente de OTA en algún producto que pudiera contenerla y realizar más estudios (Pacin et al, 2008).

En la zona central de Portugal se realizó un estudio donde hubo una cierta exposición a OTA por lo cual se investigó en tres lugares: Coimbra, Verride y Ereira. Para su identificación se propusieron métodos analíticos para la determinación de la micotoxina involucrados en la extracción con ácido ortofosfórico-cloroformo, donde se realizó una limpieza a través de la IAC; posteriormente mediante HPLC-FLD se separó, identificó y se confirmó la presencia de OTA después de la metilación en el suero. El LOQ del método propuesto para suero fue de 0.1 µg/L y 0.05 µg/L de sangre. Obteniendo recuperaciones de OTA en el suero que oscilaron entre el 70.3% y el 115.3% para niveles de 0.25 µg/L y 0.5 µg/L, respectivamente, con una desviación entre 8.0% y

16.2%. Los niveles séricos de OTA se evaluaron en 104 donantes de las ciudades mencionadas de Portugal. El estudio reveló una frecuencia de detección del 100%, y las concentraciones se mostraron entre 0.25 a 2.49 µg/L, 0.14 a 1.91 µg/L, y 0.19 a 0.96 µg/L, para muestras de las poblaciones de Verride, Ereira, y Coimbra, respectivamente. Teniendo que la concentración media y desviación estándar fueron 0.78 +/- 0.53 µg/L; 0.44 +/- 0.31 µg/L, y 0.42 +/- 0.18 µg/L para el mismo número de muestras. Concluyendo que se encontró una diferencia significativa en la población Verride de los niveles de OTA que son claramente superiores en los hombres de las zonas rurales que en las mujeres y para todas las muestras, se encontró una diferencia significativa en los varones de 0.014 µg/L (Lino et al, 2008).

Otro estudio se llevó a cabo para investigar la variabilidad regional y estacional de la población que estuvo expuesta a la OTA cerca del Mar Negro y en el Mediterráneo de Turquía mediante un análisis de las concentraciones séricas. La concentración sérica promedio de OTA se determinó en 0.137ng/ml (0.0306-0.887 ng/ml) y 0.312 ng/ml (0.028-1.496 ng/ml) en las muestras analizadas en verano e invierno por el método de ELISA. Las diferencias entre los valores medios de la OTA en todas las muestras de suero recolectadas en el verano y el invierno fueron estadísticamente significativas. La mayor concentración de OTA se determinó en los niños que viven en la región del Mar Negro en verano. Los niveles medios de ingesta diaria de OTA en todas las muestras se estimaron como 0.182 ng/kg de peso corporal/día y 0.408 ng/kg de peso corporal/día en invierno y verano, respectivamente. Como resultados se mostró que las concentraciones séricas de ocratoxina de OTA en la población sana de ambas regiones no excedieron del 1ng/ml, que es la la distribución reportada en la mayoría de los países europeos: los niveles están por debajo de la ingesta tolerable, lo cual esta establecido por las autoridades reguladoras de la salud (Erkekoğlu et al, 2009).

Como se ha mencionado previamente las micotoxinas son comúnmente encontradas en productos naturales, y son capaces de intoxicar a animales y seres humanos que inhalan partículas de hongos de alimentos contaminados por micotoxinas. La OTA es producida por *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*, y a menudo se encuentra en los cereales y los productos agrícolas (Abraham y Ernesto, 2009). Se realizaron estudios previos los cuales se han centrado en la potente nefrotoxicidad y carcinogenicidad renal de OTA. Un estudio reciente dice que se acumula en el riñón causando estrés oxidativo y daño del ADN en varias regiones del cerebro y en poblaciones neuronales. Se realizó un estudio para investigar el posible daño causado por la exposición ambiental a la OTA en términos de sus efectos sobre los perfiles de viabilidad celular y proteoma neuronales. Se encontró que OTA puede reducir significativamente la viabilidad del neuroblastoma humano, en células HT22, SH-SY5Y del hipocampo según la evaluación de la liberación de la deshidrogenasa láctica en medios de cultivo se detectó la generación de especies reactivas del oxígeno en las células SH-SY5Y y

HT22 tratadas con OTA, sin embargo, la activación de caspasas y el aumento de la fosforilación de p53, sólo se detectaron en las células HT22, y se encontró que la expresión de varias proteínas se alteraba significativamente después de tratar las células HT22 con OTA. Los hallazgos sugieren que las regulaciones coordinadas de redes moleculares están involucrados en la citotoxicidad inducida por OTA y que la respuesta proteómica pueden ser un indicativo para la neurodegeneración (Yoon et al, 2009).

Se realizó una investigación en lactantes de Alemania para determinar las concentraciones a las que están expuestos a OTA al alimentarse con leche materna. Estudios realizados en diferentes países han mostrado una amplia gama de concentraciones de la micotoxina. El objetivo de este estudio fue evaluar la exposición de los lactantes a OTA mediante el análisis de muestras de leche materna de donde se tomaron 2 muestras de leche por cada madre alemana de una muestra de 90 madres quienes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. El método analítico validado previamente tuvo un LOD de 10 ng/L y LOQ de 30 ng/L. Esto implicó la extracción L-L y el análisis por HPLC y con detección por MS/MS. Una evaluación preliminar del riesgo se hizo utilizando el equipo de "TDI approach.More" obteniendo que del 50% de las 90 muestras de leche contenían niveles de OTA detectables. En general, la concentración media en la leche de Dortmund contenía entre 24.4 ± 21.1 ng/L de un total de 30 muestras con un rango menor de 10-100 ng/L, lo que resultó significativo a los medidos en la cohorte de Hannover con 14.4 ± 15.1 ng/L de 60 muestras y un rango: menor de 10-78 ng/L. La carga de la leche materna en las diferentes etapas de lactancia, diferenciados por el calostro, la leche de transición y leche madura, lo cual no fue diferente en las 2 muestras recolectadas de Dortmund y Hannover. La exposición de los lactantes se evaluó mediante el cálculo de la ingesta de OTA a través de la leche materna. Estos resultados fueron comparados con la ingesta diaria tolerable reevaluado de 3 ng/kg de peso corporal/día en un 29% de los casos con 26 muestras de leche. La exposición infantil a la OTA en leche humana en Alemania suele ser baja en comparación con otros países. Teniendo en cuenta que en algunos casos los niveles permitidos se superan, se debe contar con métodos que permitan conocer los niveles de la micotoxina y así para regular los contenidos de OTA en los alimentos con el objetivo de reducir la exposición de OTA en mujeres que amamantan a los bebés (Muñoz et al, 2008).

Se ha descrito que la lactancia materna es muy importante en el primer año de vida; sin embargo, la leche materna puede estar contaminada con residuos xenobióticos y toxinas de origen natural como las micotoxinas. Una de ellas es la OTA la cual es una de las micotoxinas que pueden jugar un papel causante de enfermedades observadas en los recién nacidos. Por tanto, para evaluar esta problemática se llevó a cabo un estudio para determinar los niveles de OTA en muestras de leche materna; para tal objetivo se recolectaron 75 muestras de leche materna de madres cuyos bebés estaban hospitalizados en la Sección de

Neonatología, del departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina, en la Universidad Hacettepe, de Ankara, Turquía. Todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis. Después de su extracción, los niveles de OTA se determinaron por HPLC. El porcentaje de recuperación de OTA era 91.70 y 136.6 para dos concentraciones diferentes, añadidos a muestras de leche materna. Los investigadores concluyeron que teniendo el potencial de riesgo de OTA para la salud humana, y sobre todo la vulnerabilidad de los lactantes, se requiere una mayor investigación sobre la OTA en Turquía, para monitorizar sus niveles en fluidos biológicos y alimentos así como de las estrategias de protección (Gürbay et al, 2009).

Otro estudio enfocado a los lactantes, ya que la leche representa una importante fuente de alimento o con frecuencia única para ellos durante los primeros meses de vida. Dicho estudio se realizó sobre la presencia de AFM1 y OTA en las 14 principales marcas de fórmulas infantiles comercializadas en Italia. Se determinó mediante IAC y HPLC-FLD. Obteniendo que la AFM1 se encontró en dos de las 185 muestras, pero en niveles por debajo del límite de la legislación europea que son de 25 ng/L. OTA fue detectada en 133 muestras representando el 72% de muestras con un intervalo de 35.1 a 689.5 ng/L. La contaminación por OTA fue del 80% en las preparaciones listas para su uso y 63% en las muestras en polvo. A todo esto el Comité Científico de la Alimentación Humana examinó la toxicología sobre OTA y llegó a la conclusión de que sería prudente reducir la exposición a la micotoxina y asegurar que sea hacia el extremo inferior del intervalo de ingesta diaria tolerable de 1.2 a 14 ng/kg día y peso corporal. La OTA también fue evaluada por la FAO y la OMS estableciendo una ingesta semanal tolerable provisional de 100 ng/kg/ de peso corporal. Así mismo los niveles de OTA en las fórmulas infantiles para prematuros fueron suficientes para causar una mayor ingesta de OTA arrojando los resultados que señalan la necesidad de realizar controles para los programas de prevención, especialmente cuando se trata de identificar marcadores de riesgo de la calidad de la alimentación infantil (Meucci et al, 2010).

En otro trabajo realizaron la determinación de OTA en plasma sanguíneo, para encontrar al metabolito secundario tóxico de algunas de las especies de hongos pertenecientes a los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium*, estos hongos se determinaron en 168 muestras de sangre en la población de Valencia en España, utilizando el método de LC-FLD. Se obtuvo información detallada para establecer el tipo de dieta de los participantes. Esto se realizó por medio de un cuestionario que abarcó una amplia gama de productos que pudieran estar potencialmente contaminados por la toxina. Esta investigación reveló la detección en prácticamente el 100% de las muestras con un nivel promedio de 1.09 µg de OTA/L de plasma y las concentraciones variaron entre 0.15 y 5.71 µg de OTA/L de plasma. Los niveles en hombres fueron ligeramente superiores a los niveles observados en las mujeres, teniendo que los resultados se analizaron por la

prueba de correlación de Spearman y estadística de correlación Gamma. Durante la realización de las pruebas no se encontró una correlación entre el consumo individual de 26 grupos de alimentos y plasma, donde se describió como una posible contaminación con OTA. La ingesta dietética diaria de OTA se calculó sobre la base de niveles de la toxina en plasma, utilizando las fórmulas de Breitholtz y Klassen; para la población en general, y los valores medios obtenidos fueron de 1.47 ± 1.25 y 2.16 ± 1.88 ng/kg de peso corporal/día, respectivamente. Con ello se compararon todos los resultados de la región de España (Medina et al, 2010).

En el siguiente estudio se analizaron muestras de orina humana para determinar la concentración de OTA, las cuales se recogieron de cuatro diferentes regiones de Turquía. Estas muestras fueron analizadas por dilución de NaHCO_3 , y con los métodos de la IAC y HPLC-FLD. En la repetibilidad del método, se encontraron valores de la RSD de entre 3.83 y 8.86, de la exactitud, y se encontraron valores de recuperación entre 85.7% y 110.5%; el límite de detección (LOD) así como el límite de cuantificación (LOQ) del método se fueron de 0.006 y 0.018 ng/mL respectivamente. Para llevar a cabo el análisis se recogieron las primeras muestras de orina de la mañana y los resultados se ajustaron con los niveles de creatinina. El 83% del total recolectado de un total de 233 muestras se consideró estar contaminado con grandes cantidades de OTA. Se encontró OTA en 90.1%, y la concentración de OTA promedio con creatinina fue de 14.34 ng/g y el valor más alto de creatinina con OTA fue 75.60 ng/g, logrando definir el perfil de exposición a OTA en humano entre los voluntarios. Pero por otra parte en relación con género, edad, hábitos dietéticos, el consumo de café, tabaco, alcohol en hábitos de los voluntarios, no se encontró correlación a la exposición a la OTA (Akdemir et al, 2010).

Se realizó otro análisis simultáneo de OTA en plasma y orina utilizando el biomonitorio para su evaluación como consecuencia de la ingesta y por la intoxicación en muestras de 13 voluntarios. La OTA se une a las proteínas del suero y es eliminada por vía renal, el método utiliza una hidrólisis enzimática con extracción L-L analizándose mediante CL-UV, revelando la presencia de OTA y OTA alfa, con un límite de cuantificación de 0.05 ng/ml en orina, y 0.1 ng/ml en plasma, como resultado no se encontró presencia del glucuronidos para OTA por otra parte para fueron los principales productos de OTA alfa confirmándose por MS/MSy concluyendo que la OTA alfa se encontró en gran parte; se propuso incluir un análisis de este metabolito a futuros estudios de biomonitorio (Muñoz et al, 2010).

Se realizó un análisis para establecer la exposición a OTA, a través de sus metabolitos α ocratoxina detectados en orina humana en un grupo de 72 personas adultas de la ciudad de Lleida en España. Dichas muestras fueron tratadas enzimáticamente; OTA y α -OTA se separaron por extracción líquido-líquido y se midieron por HPLC-FLD. La exposición a la OTA también fue evaluada por la

estimación de su ingesta diaria de datos de contaminación de los alimentos de la literatura y de los datos de consumo de alimentos proporcionados por los participantes, que llenaron un cuestionario de frecuencia de alimentos y un registro del consumo de alimentos de tres días. La presencia de OTA se encontró en 12.5%, y LOD de 0.034 ng/mL fue menor que la α -OTA que fue 61.1%, LOD de 0.023 ng/ml. El intervalo de concentraciones era 0.057 y hasta 0.562 ng/ml y 0.056 a 2.894 ng/ml para la OTA y para α -OTA, respectivamente. Como resultado se mostró en las muestras positivas los datos de frecuencia del alimento que se relaciona con la concentración de OTA en la orina, por otra parte los datos registros del consumo por tres días estaban relacionados con los niveles α -OTA en la orina. Se concluyó que la ingesta diaria de OTA estimada de los participantes fue menor a 30% de la última ingesta diaria tolerable provisional de 14 ng/kg de peso corporal/día (Coronel et al, 2011).

Se realizó una investigación de OTA que se encuentra en los alimentos y por hábitos nutricionales de las mujeres embarazadas se puede encontrar en sangre y leche, dicho estudio se realizó en 130 mujeres embarazadas, tanto de nacionalidad italiana así como extranjeros en Italia. Teniendo en cuenta que el consumo de alimentos se evaluó durante el embarazo, el contenido de OTA se determinó en sangre del cordón y de la leche materna ambos por HPLC. Los resultados mostraron que la ingesta diaria media de OTA fue de 1.02 ± 1.20 y 0.87 ± 0.78 ng/kg de peso corporal para las mujeres italianas y no italianas respectivamente, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. La incidencia de las muestras leche positivas fue de 73% y 85% entre las madres italianas y no italianas respectivamente. El consumo de carne de cerdo, refrescos, dulces y vino tinto mostraron una relación significativa con el nivel de OTA en el suero. En lo que se refiere a leche, hubo una relación positiva con la carne de cerdo, dulces, bebidas gaseosas y aceites de semillas. Encontrándose una relación positiva entre el nivel de OTA suero y la OTA relación suero/leche. Por otra parte la ingesta de OTA no tuvo efecto sobre el nivel de creatinina en la sangre del cordón umbilical. Para lo cual se llegó a la conclusión de que este estudio confirma que la OTA se haya presente en la leche humana y por lo tanto podría suponer un riesgo para el recién nacido (Biasucci et al, 2011).

Se presentó un solo método por LCMS-MS para la determinación de OTA en distintos fluidos que resultó fiable. Se evaluaron las muestras para conocer el contenido de micotoxinas por espectrometría de masas en tándem, mostrando que 17 muestras de suero, 18 muestras de orina y 21 muestras de líquido amniótico contenían hasta 200 ng/L de OTA. Las muestras se obtuvieron de mujeres embarazadas y se observó que OTA se encontraba en mayor concentración en el líquido amniótico con 4.26 μ g/L. Se concluyó que las micotoxinas pueden atravesar placenta, mas no presenta riesgo alguno para el feto y menos a la madre, en este caso por las concentraciones encontradas que están por debajo de lo indicado por organismos internacionales (Ritieni et al, 2011).

La preocupación que se tiene de que OTA esté presente en los diferentes alimentos, exige contar con técnicas de alto rendimiento para su detección, calidad y evaluación de la misma. Una de ellas es ELISA desarrollada para el análisis durante la investigación de OTA, mediante electroquímica e inmunosensores que se basan en diferentes procedimientos de inmovilización. Los inmunosensores basados en avidina y biotina mostraron un mejor desempeño en comparación a los basados en la adsorción de albúmina de bovino. El rendimiento de los anticuerpos policlonales y monoclonales contra la OTA fueron comparados con 50 valores con un orden inferior, esto cuando se trabajó con el anticuerpo monoclonal (MAb). Por otra parte la fosfatasa alcalina (ALP) y peroxidasa de rábano picante (HRP) se evaluarón como anticuerpos secundarios (marcados respectivamente). Ambos llegaron a resultados similares cuando se trabajó con soluciones estándar de OTA en tampón. Sin embargo, las interferencias electroactivas presentes en las muestras obtenidas de vino no afectaron a los inmunosensores con HRP mostrando una desviación del 4% por lo que se oxidó en la aplicación de 0.225V de Ag/AgCl, y en los inmunosensores con ALP se obtuvo una desviación del 25%. Teniendo en cuenta que hubo un 80% de la unión al anticuerpo, el LOD de 0.7 para HRP y 0.3 ALP ng/ml, por lo cual se validó a estos inmunosensores para evaluar los niveles de OTA en vino (Prieto et al, 2008).

Se realizó un estudio para determinar OTA en 38 muestras de sangre de una población de rumanos sanos de ambos sexos. OTA se determinó por ELISA mediante el método directo, competitivo en fase sólida; el límite mínimo de cuantificación para la determinación en muestras de suero fue 0.0289 ng/mL teniendo que el porcentaje de muestras positivas fue del 100%. Las concentraciones de OTA variaron entre 0.04 ng/mL y 1 ng/mL. No teniendo diferencia significativa entre las concentraciones de OTA en los hombres frente a mujeres de 0.24 +/- 0.20 ng/ml frente a 0.17 +/- 0.15 ng/ml llegando a concluir que las muestras de sangre analizadas exhiben un grado muy alto de exposición a la OTA, pero en sólo aproximadamente el 10% de los sujetos superaron 0.5 ng/mL, lo que se considera el umbral de la patología renal inducida por OTA frente a una exposición a las micotoxinas productoras de OTA (Zlăvog et al, 2014).

En resumen...

De acuerdo a la información mostrada en los artículos anteriores se observa la preocupación que hay en diversos países por la presencia de la OTA en las muestras biológicas. Esto demuestra que la población, en general, está expuesta a esta micotoxina. En varios artículos se menciona que los niveles encontrados están por debajo de los límites permitidos; sin embargo, se deben seguir haciendo esfuerzos por contener la contaminación de los alimentos que consumen los humanos. Por otro lado, la determinación de OTA en las muestras biológicas muestra que las técnicas más utilizadas son HPLC con detección de fluorescencia principalmente, al UV y MS/MS. En algunos casos se utiliza ELISA.

7.2. DETERMINACIÓN DE OTA EN TEJIDOS Y FLUIDOS ANIMALES.

Los métodos por cromatografía líquida se han utilizado para la detección de la OTA y sus metabolitos como lo son: α -OTA, 10-hidroxi OTA, 4R-hidroxi OTA y el éster etílico, obtenidas de los experimentos de cultivo celular Caco-2 y en muestras de orina de ovejas. Se desarrollaron métodos por HPLC-FLD y LCMS/MSMS y se validaron para la detección de la micotoxina y los metabolitos mencionados, que fueron utilizados como un estándar interno. Los valores de LOD/ LOQ por el método de HPLC-FLD para: α -OTA, 4R-OHOTA y OTA fueron de 0.63/2.11, 0.99/3.31 y 0.84/2.81 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, y de 0.98/3.28, 1.11/3.72 y 0.88/2.96 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, para el método de LCMS/MSMS. Posteriormente, la precisión entre ambos fue menor del 12% para el método de HPLC-FLD y <10% para el método LC-MS/MSMS. Se determinó la recuperación de OTA y sus metabolitos entre 71 y 111% para el método de HPLC-FLD y entre 79 y 110% para el método LC-MS/MS. Ya que en el primer experimento sólo se añadió OTA a las células Caco-2, y por otra parte en el segundo experimento se añadió 3-metilcolantreno, el cual estuvo presente en los sistemas de cultivo celular. Además de la OTA, que fue recuperado en todas las muestras, se encontró un compuesto desconocido el cual también se observó en el segundo experimento, cuando se añadió el 3-Metilcolantreno. Los resultados mostraron que la concentración de OTA en las muestras se redujo en un 50%. Dichos métodos también se aplicaron para el análisis de orina de ovejas, a las que se les alimentó con cantidades crecientes de OTA. Concluyendo que con el método de HPLC-FLD se determinó el aumento de OTA y sus metabolitos según la cantidad ingerida, los resultados obtenidos se confirmaron con el método LCMS /MS MS (Schaut et al, 2008).

Se realizó un estudio para saber la eficacia de fibras de trigo micronizadas solas (MWF) y en asociación con levadura (MWF-JOC) como adsorbentes activos para disminuir los niveles de OTA *in vivo*, administrando a 48 ratas identificadas y distribuidas equitativamente en cuatro grupos como: 1.-control, 2.- dieta naturalmente contaminados con OTA con 2.2 $\mu\text{g/g}$, 3.- Dieta OTA naturalmente contaminados con 2.2 $\mu\text{g/g}$ y modificado con fibras de trigo micronizadas (MWF) 2%, 4.- dieta contaminada de manera natural con OTA con 2 $\mu\text{g/g}$ pero modificado con MWF (1.8%) y en asociación con JOC (0.2%). Esto se mantuvo en un período de 4 semanas correspondiente con una ingesta diaria entre 132.2 y 146.1 μg de OTA/kg de peso corporal. El resultado que se obtuvo fue la disminución en el peso corporal de la rata, en comparación con los controles. Los adsorbentes no aliviaron significativamente la depresión del crecimiento causado por la dieta contaminada. Se observó cierto efecto protector de MWF pues la concentración de OTA en el plasma disminuyó 40.5%, en riñón 28.1% y el hígado el 38.8%. Sin embargo, la mezcla MWF- JOC no mejoró su actividad protectora contra OTA. Los resultados de las concentraciones de OTA fecales fueron mayores por MWF y MWF-JOC en animales tratados respectivamente, la comparación con el control

positivo tomado en conjunto, mostraron resultados que sugieren que las dietas con MWF son mejor para contrarrestar los efectos de contaminación por OTA (Aoudia et al, 2008).

La siguiente investigación se realizó en ratas; el objetivo de este estudio fue identificar las vías que se modulan *in vivo* por OTA en ratas macho F344 con el fin de obtener una mayor comprensión de su mecanismo de toxicidad renal. La ingesta diaria para las ratas de OTA fue de 500 µg/kg de peso corporal. Se analizaron los perfiles de expresión génica en tejidos de los órganos después de la administración a 7 y 21 días. Obteniendo resultados de un aumento dependiente del tiempo de concentración de OTA encontrándose en el plasma, riñón e hígado, las concentraciones son similares; sin embargo, los exámenes histopatológicos sólo revelaron cambios en el riñón observándose signos de nefrotoxicidad lo que implicó la necrosis de células individuales y núcleos cariomegalicos (agrandamiento celular) en las ratas tratadas. El número de genes expresados en el riñón fue mucho mayor que en el hígado, 541 frente a 11, respectivamente. Se observaron características similares con otros datos de expresión génica *in vivo*. Sin embargo, hubo grandes diferencias que fueron encontradas con datos *in vivo* a la expresión anterior en el gen, con la excepción de respuesta al daño de ADN que no se observó a nivel de mRNA en cualquiera de las condiciones de estudio. El descenso de regulación fue por estrés oxidativo y los genes implicados en el metabolismo y el transporte que se inhibieron en ambos puntos temporales. La regucalcina, gen implicado en la homeostasis del calcio se inhibió en ambos momentos y los genes implicados en la supervivencia y proliferación celular estaban regulados hasta el día 21. Por tanto, los factores de traducción y los genes de anexina fueron regulados en ambos puntos temporales. Concluyendo que el estrés oxidativo, las alteraciones de la homeostasis del calcio y la estructura del citoesqueleto pueden estar presentes en los primeras etapas de toxicidad de la OTA (Arbillaga et al, 2008).

Se diseñaron experimentos para medir la circulación de OTA en riñones de rata. Se observó una concentración plasmática máxima a las tres horas de alimentación aguda con sonda. Los niveles se mantuvieron por 4 días antes de que las concentraciones empezaran a declinar. Se les administró una dosis diaria de 100 µg de OTA a diferentes razas de ratas, de tal manera que se estabilizaran sus niveles plasmáticos. En la raza Fisher, los niveles plasmáticos se estabilizaron primero y se encontro una vida media plasmática de 8 a 10 días. En cambio, en las ratas "Dark Agouti", se obtuvo un menor valor de concentración máxima al estado estacionario, las concentraciones plasmáticas fueron mínimas y el tiempo de vida media plasmática fue de dos a tres días. En las ratas híbridas F1 (Sprague Dawley-Fisher), los machos ingirieron 100 µg de OTA diariamente encontrándose un valor plasmático al estado estacionario similar al obtenido para las ratas Fisher en los machos después de una exposición de 5 meses. Aun cuando no se pueden establecer las causas de la presencia de tumores renales en las ratas Fisher y

Dark agouti, fue posible conocer las tasas de eliminación de OTA y otros datos toxicológicos importantes, sobre el riesgo de esta micotoxina en la dieta de humanos (Mantle, 2008).

Se realizó un estudio en un gallinero de China para evaluar las micotoxinas que se encuentran en el aire; para esto se utilizó un método por IAC y HPLC para cuantificar simultáneamente seis tipos de micotoxinas; OTA, ZEA y cuatro AFS, recolectándose 52 muestras de aire con el equipo "AGI-30" el cual utiliza agua pura como medio de recolección. En la que 20 muestras se mostraron positivas con 38.46% para cuatro micotoxinas. Obteniendo concentraciones en el aire para AFG, AFB, y ZEA de 0.189 +/- 0.024 en 9 muestras, 0.080 +/- 0.003 en 11 muestras y 2.363 +/- 0.030 en 5 muestras expresados en ng/m respectivamente, por otra parte la concentración de OTA fue 8.530 ng/m en 1 muestra. Llegando a resultados de que un pollo puede inhalar desde 0.019-0.057ng de AFG, 0.013-0.019 ng de AFB, 0.436- 0.513 ng de ZEA, y 1.706 ng de OTA, respectivamente, en un día. Por tanto un trabajador avícola puede inhalar de 0.504-1.512ng de AFB, 0.752- 2.28ng AFG, 68.240ng de OTA, y 17.432-20.512ng de ZEA en un día de trabajo en la granja. Este es el primer informe sobre micotoxinas que se encuentran en el medio ambiente del gallinero (Wang et al, 2008).

Este estudio se enfocó en evaluar 50 muestras para determinar la micobiota frecuente y la concentración de OTA en alimentos de marca comercial para aves que se producen en una empresa de Venezuela. La concentración de las muestras analizadas se determinó utilizando ELISA. Los géneros aislados fueron *Aspergillus* en un 36% y *Penicillium* 20%. De estos géneros, las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Penicillium citrinum*, especies como *Eurotium herbariorum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus glaucus*, también se encontraron pero en menor frecuencia especies como *Rhodotorula mucilaginosa* que fue aislada como única levadura en un 94% de muestras de alimentos contaminados en un intervalo entre 2.558 y 31.978 µg/kg en alimentación y 42% de ellos presenta niveles de OTA desde 10 a 20 µg/kg. Esta investigación concluyo con el 84% de las muestras de alimentos tienen una concentración que supera el límite máximo permitido para la OTA de 5 µg/kg, establecido en la mayoría de los países (Figueroa et al, 2009).

Se realizó un estudio para determinar la capacidad de trigo micronizado como dieta para cerdos, la cual se contaminó de manera natural. El estudio se realizó en un total de 96 cerdos, dándoles una alimentación consistente en cuatro diferentes dietas durante 28 días. La primera dieta fue control, la segunda dieta control modificado con 1% MWF, la tercera fue contaminada naturalmente con OTA (117.45 +/- 4.74 ng/g), y la cuarta contaminada naturalmente por OTA pero con niveles de 118.13 +/- 2.85 ng/g adicionada con 1% MWF. Para ello no mostró diferencia significativa en la eficacia entre las dietas. En el peso absoluto de los riñones e hígado fueron significativamente mayores en los cerdos alimentados con la dieta contaminada con OTA (dieta 3) como en comparación con la dieta de

control (dieta 1) o con la dieta control modificado con MWF (Dieta 2.) Sin embargo, el uso de MWF (dieta 4) fue protegida significativamente en contra de estos cambios de peso. El efecto protector significativo de MWF fue también observado en términos de concentración de OTA en el plasma con un 45,6% en disminución, en riñón con 40.8% disminuido e hígado en 26.5%. Estos resultados sugirieron que la adición de MWF es eficaz para la disminución en la biodisponibilidad de las dietas contaminadas con OTA en cerdos (Aoudia et al, 2009).

Estudios realizados en aductos de ADN por cromatografía para la detección de carcinogenicidad renal llamada 32 P-postlabeling, contrasta que los intentos experimentales para demostrar la ausencia de OTA en tales aductos. Se obtuvieron esquemas por los mecanismos epigenéticos alternativos para la carcinogenicidad lo cual resultó insatisfactorio, mientras que los datos estructurales que justifican a los aductos del ADN de OTA también se mostraron ausentes. Por tanto se decidió desarrollar mejor la metodología revelando un aducto directo aislando en pequeñas cantidades de los riñones de cinco ratas Dark Agouti a las que se les había administrado OTA por cuatro días consecutivos. Se describieron los datos estructurales para el aducto directo de la interacción entre OTA/ADN *in vitro* y su aislamiento por la metodología desarrollada “postlabeling”, creando esencialmente una B-guanina en el aducto de OTA, con lo que se muestra la falta de adaptación de los protocolos experimentales a la genotoxicidad de OTA. Se concluyó que la exposición *in vivo* de ADN renal a los ciclos de la aducción con OTA, necesariamente prolonga la ocurrencia de carcinogénesis, la cual es razonable y justificada por una neoplasia focal ocasional que puede desarrollar el carcinoma metastático (Mantle et al, 2009).

Se realizó una inspección en carne observándose con frecuencia nefropatías y se notó que se diferencia morfológicamente de la llamada “nefropatía micotóxica porcina” en pollos búlgaros. Se encontró que tenía una etiología multifactorial micotóxica al ser provocado principalmente por un efecto combinado de OTA, ácido penicillico y FB1, además de un metabolito que aún no es conocido. Los niveles de contaminación con OTA fueron consecutivamente bajos de 1.888 y 3.764 µg/kg, a diferencia de FB1 mostrando niveles altos de contaminación de 55.641 y 32.545 µg/kg y ácido penicillico de 8.386 y 9.049 µg/kg en los años comprendidos del 2006 y 2007 respectivamente. Algunas otras micotoxinas con menor importancia tales como *citrinina*, *Penitrem A*, entre otras, también influyeron en la imagen clínica patológica de esta nefropatía. Posteriormente, se observó una fuerte contaminación con *Gibberella fujikuroi* var. *moniliformis* (*Fusarium verticillioides*) y otros complejos (principalmente *Penicillium polonicum*) *Penicillium aurantiogriseum* se observaron en las muestras de alimento, casi todas examinadas procedentes de granjas de cerdos y pollos con problemas nefropáticos de Bulgaria. Por lo que la contaminación con *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *Penicillium citrinum* se dio en niveles bajos en las

mismas muestras de alimento aunque dichas especies se aislaron como componentes raras de la microbiota (Stoev et al, 2010).

En los meses correspondientes a septiembre 2006 a marzo 2009 se recolectaron muestras en granjas porcinas en el noroeste de Italia con el fin de identificar a OTA en comunidades. Se tomaron 30 muestras de alimento en 2 ocasiones para su análisis y 285 muestras de suero; su detección se dio mediante la utilización de IAC y CL/MSMS-FLD. Se obtuvieron muestras contaminadas por OTA en niveles que van desde 0.22 a 38.4 $\mu\text{g/mL}$. Todas las muestras de suero como consecuencia estuvieron contaminados con OTA en niveles que van desde 0.03 a 6.24 ng/mL , a lo que los investigadores llegaron a deducir que las muestras contenían un nivel máximo de 50 $\mu\text{g/kg}$ de OTA, considerando un contenido de humedad de 120 g/kg lo cual es recomendado por la Comisión Europea en complementos para cerdos y forrajes completos (Pozzo et al, 2010).

Se realizó la evaluación de un panel de biomarcadores para medir nefrotoxicidad aguda y subcrónica usando ratas como modelo. Dichos marcadores fueron aprobados recientemente en EE.UU, por la FDA y la EMA para mejorar la detección de nefrotoxicidad, pero son pocos los datos que se tienen sobre su desempeño. Este estudio, se dedicó a estudiar Kim-1, β -2-microglobulina, cistatina C, clusterina junto con seis proteínas de la lesión renal urinario (GST- α , TIMP-1, VEGF, calbindina, NGAL/ lipocalina-2, osteopenia) para detectar lesión renal aguda del túbulo proximal inducida por fármacos o nefrotoxicidad subcrónica durante el estudio en el modelo (rata). Las proteínas a analizar obtenidas se midieron en muestras de orina de las ratas tratadas con gentamicina con dosis de 0.60 y 120 mg/kg de peso corporal durante 7 días, con una dosis de OTA de 0.21, 70 y 210 mg/kg de peso corporal de hasta 90 días. La cistatina C y NGAL parecían ser los indicadores más sensibles de una nefrotoxicidad con gentamicina, con cambios significativos que ocurrieron desde el primer día. Se observó alterada la excreción urinaria de KIM-1, clusterina, calbindina y TIMP-1 acompañadas de un aumento del BUN en ratas con BI-3 a 1000 mg/kg de peso corporal durante 14 días. Las alteraciones histopatológicas inducidas por OTA mostraron efectos sobre los parámetros clínicos tradicionales y se reflejaron cambios en Kim-1 en la orina. En general como resultado los datos confirmaron el aumento de la sensibilidad con los nuevos marcadores, en comparación con los parámetros químicos clínicos tradicionales (Hoffmann et al, 2010).

La siguiente investigación realizada en el año 2010 tuvo como objetivo vigilar la presencia de OTA en el suero de los cerdos sacrificados y de investigar su distribución en 4 grandes regiones geográficas de Brasil. Un total de 400 muestras de suero se obtuvieron de los 4 principales estados de Brasil obteniendo 100 muestras de cada una. Las concentraciones de OTA se determinaron por HPLC. En la región de Santa Catarina, se encontró que el 60% de las muestras tenían concentraciones de OTA de entre 4.01 hasta 75.4 mg/L . En Mato Grosso, el 75% de las muestras tenían concentraciones de OTA que iban desde 0.17 hasta 46.79

mg/L; las muestras de Bahía tenían concentraciones de OTA que iban desde 2,72 hasta 4.13 mg/L en el 36% de las muestras; mientras que 68% de las muestras que se encontraron en Río de Janeiro con concentraciones de OTA que van desde 0.16 hasta 115 mg/L. Sólo en los estados de Santa Catarina y Río de Janeiro tenían muestras de suero que superaron los 75 mg/L de OTA en el 20% y el 2% de las muestras, respectivamente. Se encontró una relación directa entre las concentraciones más altas de OTA en el suero de los Estados de Santa Catarina y Río de Janeiro y las mayores concentraciones de OTA en los alimentos destinados al consumo animal en los mismos 2 estados brasileños. Se monitoreó OTA en productos de elaborados como un método alternativo y se realizó el análisis de las muestras de suero de cerdos, que reflejaron el contenido de toxinas de la alimentación que ingirieron. Esta estrategia podría prevenir la aparición de ocratoxicosis en la producción animal, reducir las pérdidas económicas, y reducir al mínimo los riesgos de OTA para la salud humana (Krüger et al, 2010).

Se evaluarón 90 muestras provenientes de cerdo: suero, riñón y de hígado procedentes de diferentes regiones de Serbia. Se donde se utilizaron 2 diferentes métodos analíticos para la determinación y confirmación de OTA, la extracción se realizó por extracción L-L. El análisis de OTA se realizó con HPLC en combinación con FLD y ionización por electro spray o CL/MSMS. El análisis obtenido con CL/MSMS ofreció buenos resultados comparables en el nivel de concentración con HPLC-FLD pero indican que es más selectivo y sensible para el análisis y confirmación de OTA en los tejidos del cerdo que con el método de HPLC-FLD después de la metilación de OTA (Milićević et al, 2010).

Se hizo un estudio acerca de la OTA porque puede causar insuficiencia renal posiblemente por citotoxicidad. La OTA es una micotoxina que se encuentra en alimentos, que tiene un efecto de citotóxico en dosis acumulativas bajas en los corpúsculos del tejido renal. Este estudio se utilizó dos grupos de ratas albinas recién destetadas que se dividieron en: 1) control, 2) ratas tratadas con OTA con 289 mg/kg/día. Después de 28 días de tratamiento, se logró detectar una disminución significativa en el peso corporal, el peso del riñón y el peso relativo en ratas tratadas con OTA. La creatinina sérica y el nivel de urea se elevaron ligeramente, estos resultados revelaron cambios histológicos significativos, así como lesiones ultraestructurales en el grupo que fue tratado con OTA. Las lesiones incluyeron, congestión global en el tejido renal y pérdida de demarcación entre la corteza y la médula. La arquitectura normal de los corpúsculos renales fue destruida y en la mayoría de los corpúsculos perdió su aspecto ordinario. Los cambios histopatológicos más evidentes fueron en la parte urinaria e hiper celularidad, las lesiones ultraestructurales observados en los corpúsculos renales en ratas tratadas con OTA incluyen: la proliferación y la inflamación de las células endoteliales con pérdida ocasional de fenestrae, estrechamiento de la luz capilar, podocitos con daños secundarios, células mesangiales hipertrofiadas y proliferado con la matriz mesangial ampliado. El endotelio fue claramente

desertado y vacuolado, por tanto perdió sus fenestraciones en muchos capilares glomerulares. Además, se encontró que la membrana basal glomerular (GBM) estaba engrosada y tortuosa. Se observaron células glomerulares necróticas con frecuencia, también se observaron células pre-apoptóticas. Se concluyó que la exposición a concentraciones relativamente bajas de OTA indujo lesiones significativas a los corpúsculos renales. Por otra parte, se activa el daño oxidativo y la necrosis que puede causar grandes daños en el riñón y en última instancia, la insuficiencia renal (Abdu et al, 2011).

Científicos de Serbia realizaron investigaciones toxicológicas e histopatológicas en tejidos de pollos sacrificados, estos análisis se llevaron a cabo para realizar una evaluación preliminar de la incidencia de OTA en el pollo que se venden en los mercados del país. En la mayoría de las muestras de tejido no se encontró cantidades mensurables de OTA, por otra parte, los niveles de la micotoxina que se encontraron en los tejidos analizados fueron en general bajos y no hubo correlación positiva entre la presencia de OTA y la frecuencia de los cambios histopatológicos. Los cambios histopatológicos degenerativos encontrados en riñones y en hígado diferían de la descripción clásica de la nefropatía micotóxica, indicando que la nefropatía de pollo observado en Serbia puede tener una etiología multitóxica con posible efecto sinérgico entre los microorganismos y toxinas naturales, presentes en concentraciones bajas. Como resultado de que OTA esté presente en baja concentración, se sugirió que la carne de pollo en el mercado minorista de Serbia, es posible que represente un riesgo para la salud para los consumidores debido a la toxicidad de la OTA (Milićević et al, 2011).

En el 2011 se desarrolló un método rápido para cuantificar OTA y AFB1 obtenido de plasma, hígado, riñón de rata. El método desarrollado fue por HPLC- FLD y se validó de acuerdo a criterios tales como: selectividad, estabilidad, linealidad, precisión, entre otras. Las muestras fueron extraídas con acetronilo y ácido fórmico (99:1) la separación cromatográfica se realizó con una mezcla de agua y acetronilo y metanol (50:50) y se acidifico con 0.5% de ácido fórmico. El método evita el IAC y permite la reducción de la muestra, volúmenes de disolventes, así como desechos tóxicos. La detección se basó en una reacción fotoquímica, que potencia la respuesta AFB1 sin afectar la señal de OTA antes de llegar al detector de fluorescencia. La recuperación de micotoxinas para cada matriz fue muy eficiente, entre el 93% y 96% para AFB1 y entre 94% y 96% para la OTA (Corcuera et al, 2011).

Los ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos para ganado fueron analizados para detectar la presencia de AFB1, citrinina, ácido penicillico T2, OTA y ZEA. Las muestras fueron recolectadas en diferentes ranchos ganaderos y granjas de Tamil Nadu. Las micotoxinas se determinaron en todas las muestras y se encontró una alta ocurrencia de citrinina, seguido por la AFB1 y OTA. Los niveles de AFB1 se encontraron entre 50 a 80 µg/kg, los niveles de OTA entre 20 a 160 µg/kg, los niveles de citrinina 20-350 µg/kg, y los niveles de ácido penicillico

entre 20 a 30 µg/kg, los niveles de toxina T2 variaron entre 75 a 450 µg/kg y los niveles de zearalenona se encontraron entre 150 y 1.000 µg/kg respectivos. Los resultados obtenidos del estudio para el control de micotoxinas de estos productos en la alimentación para ganado desalentó la comercialización para el desarrollo del ganado (Sarathchandra y Muralimanohar, 2014).

En resumen...

En los artículos revisados para este apartado se encontró que el método de elección es la HPLC con detección de fluorescencia (FLD) y MS/MS. Se utilizan otras aproximaciones ya que los resultados se miden en ganancia de peso de animales, pruebas histológicas y hasta cambios en cultivos celulares. Se analiza la carne de pollos, cerdos y hasta ratas. La investigación en ratas se realiza para conocer el mecanismo de acción de OTA, mientras que en cerdos y pollos, para conocer su exposición y la factibilidad de que llegue OTA a humanos a través del consumo de la carne contaminada. Se analiza la presencia de OTA en alimentos para el ganado y se investiga el efecto protector que pudiera tener el trigo micronizado contra OTA en cerdos y ratas. Los estudios se realizan principalmente en países del este de Europa e Italia; en Latinoamérica, sólo en Brasil.

7.3. PRESENCIA DE OCRATOXINA A EN PRODUCTOS VEGETALES.

Durante el siglo XX frecuentaba una plaga en el sur de Europa en sus viñedos llamada polilla de la baya ó *Lobesia botrana* siendo una plaga clave en los viñedos de este continente. Su estudio se realizó debido a los daños que provoca y a la necesidad de combatirla de forma sistemática todos los años. Esta se distribuye por casi todas las regiones vitícolas peninsulares, aunque su importancia es muy variable. Produce daños considerables en viñedos de las provincias de Aragón, La Rioja, Navarra, Andalucía y especialmente en las regiones costeras mediterráneas tal como Cataluña, Valencia, Murcia (Pérez y Mancebón, 1988). Los daños causados por las larvas de *L. botrana* puede fomentar el desarrollo de *A. niger*, que conduce a la producción de OTA y su acumulación en las uvas. Se llevaron a cabo ensayos en campo durante tres temporadas de uva del 2005 al 2007 en Apulia, Italia, para evaluar una estrategia de control con un insecticida para *L. botrana*, como un método indirecto de la reducción de la contaminación por OTA reduciendo *A.niger*. En los ensayos de campo realizados en el 2005 el tratamiento con insecticida controló los ataques de larvas, por lo que las concentraciones de OTA se redujeron hasta en un 66% de muestras de variedades de uva clasificadas como “Negro amaro” y “Primitivo”. Las condiciones ambientales en 2005 y 2007 dieron como resultado un bajo nivel natural de infestación por *L. botrana* y bajos niveles de OTA en ambas variedades, tratadas y no tratadas las muestras, llegando a concluir que existían diferencias significativas entre las muestras tratadas y no tratadas; los resultados del estudio en campo confirmaron informes de que las larvas son un factor de riesgo para la acumulación de OTA, por lo que se debe tener control en los viñedos para reducir las concentraciones de OTA en las uvas (Cozzi et al, 2009).

La OTA es una micotoxina nefrotóxica, carcinogénica, teratogénica y con efectos inmunotóxicos, esta micotoxina se encuentran de forma natural en productos agrícolas, incluidos en uvas y vinos. Las especies de *Aspergillus* siendo los principales responsables de la contaminación en las uvas para la elaboración de vino y en particular *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus niger* (Abraham y Ernesto, 2009). Se estudiaron en los viñedos franceses de la región mediterránea la biodiversidad de diferentes cepas de *Aspergillus* en Languedoc-Rosellón, de donde se aislaron 189 cepas de las uvas y fueron analizadas de acuerdo a la cosecha que se produjo en la zona ese año. Las cepas se identificaron y se clasificaron en dos grupos de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas: *A. carbonarius* como el grupo representativo y *A. niger* como el grupo representativo agregado; la biodiversidad de cada cepa se estudió de acuerdo al genotipo y fenotipo. La identificación se realizó utilizando el par de iniciadores ITS1/ CAR y ITS1/NIG, y se confirmó mediante PCR 24 metabolitos ocratoxigénicos pertenecientes a *A. carbonarius* y *A. niger*. Por tanto el uso de iniciadores específicos apoyó a la identificación basada en fenotipos y caracteres

morfológicos. La agrupación entre cepas de *A. niger* se asoció con la producción y la cosecha en la zona de Languedoc-Rosellón del año, pero no con la variedad de la uva o del tratamiento de la precosecha. Por otra parte la agrupación entre cepas de *A. carbonarius* no se asoció con ninguno de los parámetros anteriores. Por lo cual se mencionó que la producción de OTA de las cepas en medio de cultivos parecían tener una correlación mejor con los caracteres morfológicos masno con los perfiles genotípicos presentados, concluyendo que no hay una relación que pudiese establecerse entre los caracteres fenotípicos y genotípicos de la especie de *Aspergillus* estudiados y analizados (Dachoupakan et al, 2009).

El siguiente trabajo se realizó durante el año 2005 en el periodo de cosecha de uvas libanesas de donde se aislaron 510 cepas de hongos filamentosos de los cuales 487 pertenecían al género de *Aspergillus spp*: se hallaron en un 95.5% y 23% que pertenecían a *Penicillium spp*, con el 4.5%. También se hallaron especies de *A.niger* constituyendo el 56.9%, *Aspergillus japonicus* en 2.9% y 1.8% de *Aspergillus carbonarius*, mientras que la tasa de aislamiento de *Aspergillus flavus* no se encontró, por tanto un total del genero de *Aspergillus* se encontró habitualmente en la micobiota de la uva en el 43.1% aislado. Todos los aislados fueron probados en su la capacidad de producción de OTA y AFB1. *A. carbonarius* demostró que es la única especie capaz de producir la OTA en un 100% de producción y alcanzando una concentración máxima de 8.38 µg/g. Por otra parte, el 43,4% de los aislados aflatoxigénicos de *A. flavus* quien produce AFB1 con una producción máxima que alcanza 22.6 µg/g, mientras que ninguno de los otros aislados mostró una capacidad de producción de esta micotoxina. También se analizaron 47 muestras de mosto producidos a partir de las uvas recolectadas, ninguna de estas muestras fue contaminada por OTA en un límite detectable, mientras que se encontró que el 40% de estas mismas muestras contenían AFB1 en concentraciones que van desde 0,01 a 0 µg/L (El Khoury et al, 2008).

Como ya se ha mencionado la OTA es producida por hongos del genero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, entre otras especies (Elika, 2013). Se investigaron aislamientos bacterianos de Mississippi en tierra de sembradíos de maíz de campo y de rizósfera; las muestras se evaluaron por su potencial como agentes de control biológico contra *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*. Las cepas aisladas fueron desafiadas en un cultivo líquido contra *A. flavus* y en medios de agar contra *A. flavus* y *F. verticillioides*. Como resultado se obtuvo la identificación de 221 cepas que inhibieron el crecimiento de los hongos. Estas bacterias fueron identificadas por su producción de enzimas extracelulares que hidrolizaban la quitina, las paredes de levaduras y la producción de metabolitos antifúngicos. Además, se realizó la identificación molecular y bioquímica de las cepas bacterianas; los géneros más frecuentes aisladas de muestras de rizósfera eran *Burkholderia Pseudomonas* y los géneros que aislados de los suelos de sembradíos *Pseudomonas* y *Bacillus*. Géneros menos frecuentes incluyen *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Wautersia* y varios géneros de

bacterias corineforme y entéricas. En ensayos cuantitativos se aislaron cepas de *P.chlororaphis* y *P. fluorescens*, constantemente se inhibió la producción de *A. flavus* y *F. verticillioides*. Los resultados demostraron el potencial para el desarrollo de agentes individuales para un control simultáneo contra especies de *A. flavus* y *F. verticillioides* (Palumbo et al, 2011).

Otro factor de posible contaminación fúngica en plantas, es la presencia de contaminación fúngica en las semillas de quínoa de muestras obtenidas de lugares como el Salar de Uyuni, Bolivia; Salta y provincias de Tucumán, Argentina; se obtuvieron las muestras con y sin tratamiento, esto para quitar las saponinas (método húmedo). En muestras procesadas, el porcentaje de infección se redujo en los tres lugares, aunque *Penicillium* y *Aspergillus* fueron los que se encontraron con mayor frecuencia, independientemente del origen geográfico de las muestras. Otros géneros, tales como *Eurotium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Ulocladium*, *Mucor* y *Rhizopus* se aislaron con menor frecuencia. *Absidia*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Dreschlera*, *Epicoccum* *Monascus* se aislaron de forma esporádica. Hubo una diferencia significativa en la distribución de especies de hongos en las muestras con y sin saponinas de cada lugar. Concluyendo que en todos los casos el tratamiento provocó una disminución de *Aspergillus*, mientras que aumentó la proporción de *Penicillium*, *Eurotium*, *Mucor* y *Rhizopus* indicando que estos géneros se encuentran en la parte interna. *A. flavus* y *A. niger* fueron las especies dominantes del género *Aspergillus*. Un patrón similar de especies de *Penicillium* se observó en las muestras con y sin saponinas, ya que *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. crustosum* siempre estuvieron presentes en gran número, aunque su densidad relativa es variable según el origen geográfico de las muestras (Pappier et al, 2011).

Por otra parte, existen hongos asociados con OTA que están presentes en plantas como la raíz de regaliz. Investigadores consideraron que los medicamentos a base de esta planta podrían contener a la micotoxina. Se obtuvieron muestras de plantas de regaliz de mercados, ubicadas en Jiangxi, Zhejiang, en las provincias de Henan y Beijing, China, donde se encontraron especies mediante LC-MS/MS pertenecientes a *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Scopulariopsis*. La composición fúngica fue diferente en cada muestra de raíz de regaliz; la especie de *Penicillium polonicum* fue el hongo más predominante con el 54% del total de aislados de muestras de raíz de regaliz de la provincia de Jiangxi, que además, presentaba la mayor contaminación con OTA. En otras muestras con menor concentración de OTA, se encontró que las especies de *Aspergillus* y *Eurotium* eran predominantes. Por otra parte, la producción de OTA en cepas representativas de arroz fue detectado también LC-MS/MS, aislándose *Penicillium polonicum* y *P.chrysogenum* que son ocratoxigénicos, las concentraciones de OTA variaron desde 6.94 hasta 217.37 ng/g. Este fue el primer estudio realizado que informa que *P. polonicum* es considerado como hongo productor de OTA.

Concluyendo que la contaminación por OTA de la raíz de regaliz constituye un peligro para la salud durante su consumo (Chen et al, 2011).

Mediante HPLC-FLD se determinó la presencia de OTA en plantas medicinales de china comúnmente utilizadas como especias, aditivos o también como alimento. Debido a su procedencia, dichas plantas pueden estar contaminadas por varias especies de hongos, incluyendo hongos ocratoxigenicos. Por ello se desarrolló un método confiable para la determinación de OTA en plantas de diferentes orígenes y así poder controlar los niveles de la micotoxina en China. El análisis implicó la extracción de OTA con metanol/agua, por IAC y HPLC-FLD. Los resultados positivos fueron confirmados por LC-ESI-MS/MS, obteniendo un LOD de 0.3 μ /kg, basado en relación señal/ ruido de 3: 1. Del total de 57 muestras de las plantas medicinales de seis áreas diferentes, 31 presentaron contaminación visible por hongos debido a un mal almacenamiento, mientras que 26 muestras que fueron compradas en los mercados locales de plantas medicinales no presentaron contaminación visible. Los resultados mostraron que en 23 de las muestras con contaminación visibles y dos sin contaminación visible contenían OTA en niveles que iban de 1.2-158.7 y 2.5-5.6 μ g/kg, respectivamente (Yang et al, 2010).

En resumen...

Los artículos incluidos en este apartado muestran, principalmente, otro aspecto en el control de la contaminación por OTA: el control de las especies fúngicas ocratoxigénicas. Se muestra como controlar el crecimiento de dichos hongos en viñedos de Italia, España y Francia; se identifican especies bacterianas que pueden utilizarse en el control del crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium*. Se evalúa la presencia de saponinas en las semillas de quinoa en el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium*. Finalmente, se mide la presencia de OTA en la raíz de regaliz, plantas medicinales y arroz usando HPLC MS/MS y/o FLD. Entonces, estos últimos métodos siguen siendo de elección en la determinación de OTA. Lo interesante son las diversas estrategias usadas para controlar la presencia y crecimiento de hongos ocratoxigénicos.

7.4. DETERMINACIÓN DE OTA EN GRANOS Y CEREALES.

Se investigaron los granos de café vietnamitas para determinar la presencia de especies de *Aspergillus*. El 93% de las muestras de café resultaron positivas para *A. niger*. Ninguna otra especie ocratoxigénica estaba presente en ellos. Mediante HPLC se determinó que el 8.7% de las cepas de *A. niger* eran positivas para OTA. No se encontró diferencia significativa en el nivel de contaminación o en la incidencia de las cepas toxigénicas en las muestras que habían sido rechazadas por el manual de clasificación y los que estaban destinados para el consumo humano (Ilic et al, 2007).

Se desarrollaron métodos por HPLC-FLD y LCMS/MSMS, para la determinación simultánea de OTA, OTB y CIT en productos de cereales, frutas y café. Las muestras se extrajeron con acetato de etilo en condiciones ácidas, y luego se limpiaron con una extracción L-L. Las soluciones resultantes de la extracción se analizaron por HPLC-FLD y LCMS/MSMS. La adquisición de espectrometría de masas se realizó en modo de iones positivos. Las actuaciones de ambos detectores eran casi equivalentes obteniendo recuperaciones de OTA y OTB entre 87-111%, y de CIT 70-88%. Los LOQ de la OTA, OTB y CIT fue 0.1 µg/kg, En conclusión, estos métodos se consideraron útiles para la determinación de las tres micotoxinas a niveles bajos de 0.1 µg/kg (Tabata et al, 2008).

Se desarrolló un procedimiento rápido y fiable para la determinación de OTA en el café verde y tostado. El método consistió en la extracción de la muestra con metanol y carbonato de sodio (20:80) y 1% de PEG 8000, seguido por IAC y finalmente por HPLC-FLD. Las recuperaciones para el café verde y tostado se obtuvieron en niveles que van desde el 94 y el 105%. El límite se determinó por triplicado y se obtuvo de 0.032 ng/g y de precisión fue del 6%. El método descrito se ha utilizado para evaluar la influencia de calcinación de lotes comerciales de café verde y tostado con OTA y también en diferentes procesos para la elaboración de la cerveza. Los resultados mostraron que el café tostado tuvo una reducción significativa en los niveles de OTA del 65-100%. Un factor que afecta a OTA es la forma en que se prepara el café pues utilizando "Moka Express" (café italiano) se observó una reducción significativa de la concentración de OTA del 50-75%. Entonces cuando hay agua caliente en contacto con el café durante un corto tiempo hay disminución de la contaminación por OTA. Por contrario, el café por infusión durante 10 minutos causó bajas reducciones de OTA (La Pera et al, 2008).

Se realizaron estudios para comparar la determinación de OTA mediante dos procedimientos IAC y HPLC, en muestras de cereales (trigo y sémolas de maíz), uvas, pasas y granos de café verde, en diferentes laboratorios. La prueba de recuperación se llevó a cabo en dos diferentes concentraciones de la micotoxina (0.5 y 5.0 µg/kg), excepto para las uvas pasas contaminadas de forma natural. El

uso de la IAC, las tasas de recuperación, la repetibilidad y la reproducibilidad para el trigo, sémola de maíz y granos de café verde variaron desde 59.0 hasta 85.8, 4.2 a 7.8 y 22.9-29.2%, respectivamente. Para pasas contaminadas naturalmente, la recuperación, RSD (r) y la RSD (R) fueron 84.1, 1.8 y 5.1%, respectivamente. Y para el uso de la columna multifuncional, las tasas de recuperación, RSD (r) y la RSD (R) para el trigo, sémola de maíz y granos de café verde variaron desde 80.8 hasta 185.0, 0.7 a 6.9 y 15.2 a 33.9%, respectivamente. Para pasas contaminadas naturalmente, la recuperación, RSD (r) y RSD (R) fueron 128.7, 1.1 y 3.7%, respectivamente. Los resultados sugirieron que una columna multifuncional puede ser utilizado para detectar la OTA en trigo y sémola de maíz en una concentración baja de 0.5 µg/kg; sin embargo, era difícil de detectarla en los granos de café verde y pasas a un nivel tan bajo. Aunque IAC podría ser utilizada para todas las muestras de prueba en estos estudios se realizó desde un nivel bajo a un nivel alto, en lo cual concluyeron que las tasas de recuperación son más bajos con una columna multifuncional (Sugita et al, 2008).

El siguiente trabajo fue realizado en Argelia en granos de trigo pues es considerado como un alimento básico para la población. El objetivo de este estudio fue analizar a OTA que se produce en el trigo contaminado. El análisis se llevó acabo en un total de 85 muestras de trigo destinados para el consumo humano las cuales se obtuvieron de dos regiones de Argelia (Tizi Ouzou y Setif) durante las siguientes fases: antes de la cosecha, almacenamiento en silos, y después del procesamiento. Los recuentos del valor medio de los hongos variaron desde 275 hasta 1277 UFC/g. Como resultado se obtuvo el aislamiento del género dominante *Aspergillus*, especies como de *A. flavus*, *A. niger* y *A. versicolor*. Las otras especies aisladas fueron *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. candidus* y *Aspergillus spp*. La ocurrencia y los niveles del género *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Mucor* eran sustancialmente inferiores a los de *Aspergillus*. El almacenamiento en silos mostró niveles altos de *Aspergillus* de entre el 66 al 84%, especialmente *A.flavus*, *A.niger*, otros hongos fueron aislados en porcentajes relativamente bajos. El género *Aspergillus* se mantuvo presente en niveles altos en varias fases del proceso de producción; OTA se produjo en 135 aislados pertenecientes a once especies de este género y 23 aislados de *Penicillium spp*. Posteriormente se realizó un análisis por HPLC-FLD y se encontró 51 aislados de los cuales el 32.3% eran ocratoxigénicos. Todas las cepas aisladas de *A. ochraceus* y *A. alliaceus* produjeron la OTA en concentraciones que van desde 0.23 hasta 11.50 µg/g. La mayoría de las cepas de *A. carbonarius*, aproximadamente el 80%, eran productores de OTA con 0.01 a 9.35 µg/g; mientras que de *A. terreus* se encontró en 50%, *A. niger* en 28%, *A. fumigatus* en 40%, *A. versicolor* con 18% y *Penicillium spp* en 21.7%. Todos estos mostraron un nivel bajo de 0.01 a 0.07 µg/g de concentración de OTA al determinarse en 30 muestras de trigo. Se concluyó que OTA era detectado en 12 muestras con el 40% en niveles que van desde 0.21 hasta 41.55 µg/g (Riba et al, 2008).

La OTA es considerada como la principal micotoxina producida por especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que crecen en una gran variedad de productos agrícolas. Los alimentos con contaminación suponen un peligro para la salud de los consumidores, ya sean humanos o animales (Abraham y Ernesto, 2009). En Costa de Marfil, se realizaron numerosas investigaciones para encontrar la mejor manera de prevenir la contaminación por OTA de la materia prima del cacao. Los objetivos de esta investigación fueron evaluar el impacto de la industria con un tratamiento sobre el contenido de OTA en los productos derivados del cacao. Las muestras fueron obtenidas de vainas de cacao y preparadas bajo condiciones específicas que promueven la proliferación de hongos en los granos de cacao antes del procesamiento. Los granos fueron sometidos a los tratamientos industriales habituales al tueste, la trituración, prensado, aditivos, etc tomando una porción de muestra en cada etapa del proceso. La OTA se extrajo con hidróxido de sodio, metanol, solución de carbonato y se purificó usando una IAC antes de utilizar HPLC-FLD. OTA se detectó en granos contaminados de cacao en niveles que van desde 3.4 hasta 44.7 µg/kg, con un valor de 22.9 +/- 3,6 µg/kg. La OTA se concentró principalmente en la cáscara con 93%, la adición de aditivos disminuyeron significativamente los niveles de OTA por 24-40, 76 y 52%, respectivamente, con una reducción global de aproximadamente el 91%. Estos resultados indicaron que el procesamiento industrial de cacao tiene un impacto real en la reducción de la OTA en los productos finales de cacao (Manda et al, 2009).

Continuando con el grano de cacao, en España se realizó una investigación en granos de cacao con el objeto de identificar las poblaciones hongos presentes en el cacao sin tostar almacenado con el fin de evaluar la producción de OTA. Se tomaron 20 lotes de cacao de diferentes orígenes y con diferente contenido de OTA para el estudio. Se encontraron 3 cepas de *Aspergillus carbonarius* y 13 *Aspergillus niger*, las cepas aisladas de las muestras obtenidas de granos de cacao fueron seleccionados para evaluar la síntesis de OTA, siendo *A. carbonarius* quien es productor de OTA con un límite de detección 3.520 µg/kg. Se concluyó que no todos los granos de cacao tienen los mismos niveles de OTA ni se encuentran los mismos hongos productores de OTA (Amézqueta et al, 2009).

La OTA y tricotecenos tipo B son micotoxinas que ocurren con frecuencia en los cereales y por lo tanto se pueden encontrar en subproductos de cereales tales como el pan. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variación de los niveles de OTA, DON, 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y nivalenol (NIV) durante el proceso de panificación. Esto se hizo mediante el uso de la harina de trigo enriquecida con diferentes niveles de toxinas. Los niveles de micotoxinas fueron controlados después de la fermentación de la masa con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y después de la cocción; además, con diferentes combinaciones de tiempo y temperatura. El análisis de varianza o ANOVA de los resultados mostró una reducción significativa en el nivel de OTA durante la fermentación de la masa. La

reducción osciló entre 29.8% y 33.5%, dependiendo de la concentración inicial de la toxina en la harina. Durante este período, el nivel de las otras micotoxinas estudiadas no se modificó. Por el contrario, en la fase de cocción había cambios significativos en los niveles de las cuatro micotoxinas, aunque la reducción fue similar en todas las condiciones de cocción. Teniendo en cuenta el tiempo, la temperatura y las condiciones ensayadas, se concluyó que durante el período de horneado se obtuvieron reducciones en las concentraciones de OTA, NIV, 3-ADON, y DON de 32.9%, 76.9%, 65.6% y 47.9%, respectivamente (Valle et al, 2009).

Se realizó un análisis geoestadístico de la distribución de la concentración de micotoxinas como OTA y DON encontradas en cereales a granel de productos agrícolas que se sabe son de peligro para la salud humana y animal. (Abraham y Ernesto, 2009). Los lotes a granel mencionados se analizaron rutinariamente para la detección de micotoxinas; sin embargo, se reconoce que el diseño de los planes de muestreo puede ser particularmente problemático debido a la distribución heterogénea de las micotoxinas. Los estudios realizados anteriormente no consideraron las interacciones entre la distribución de las micotoxinas y la estrategia utilizada para la toma de muestra. Por lo tanto, los planes de muestreo se diseñaron en una supuesta distribución aleatoria. El objetivo de este estudio fue analizar la distribución de DON y OTA en productos a granel con la geoestadística, siendo la primera aplicación del análisis geoestadístico en este estudio sobre datos de contaminación de micotoxinas en productos a granel. Los conjuntos de datos para el DON y OTA en el almacenamiento a granel fueron obtenidos de información literaria, de los cuales sólo uno contenía datos adecuados para el análisis geoestadístico. Este conjunto de datos representó 26 toneladas de trigo en camiones con un total de 100 puntos de muestra. Las concentraciones de DON y OTA eran 1.342 y 0.59 µg/kg, respectivamente. Los resultados mostraron que DON representó una estructura espacial, mientras que la OTA distribuida al azar en el espacio. Esta diferencia entre el DON y OTA probablemente refleja que DON se produce en el campo, mientras que OTA se produce en el almacenamiento. La presencia de la estructura espacial de DON implica que los planes de muestreo deben tener en cuenta la ubicación de la muestra, además de la cantidad de puntos muestreados con el fin de obtener estimaciones fiables en la contaminación (Rivas et al, 2009).

Un estudio de agentes micotoxigenicos se realizó en 99 muestras de granos de arroz obtenidos de un mercado sueco. El principal objetivo de los investigadores fue estudiar el hongo y las micotoxinas contenidas en el arroz basmati, con un alto contenido de fibra, y en muestras de arroz jazmín, así como también fue incluido el arroz de grano largo. Las muestras se analizaron mediante HPLC para evaluar la presencia y contenido de OTA y las diferentes AFS; esto se realizó junto con un análisis morfológico. La mayoría de las muestras se tomaron de acuerdo con el Reglamento 401/2006 de la Comisión Europea. Los análisis se realizaron en el

arroz empacado y las submuestras obtenidas se combinaron y se mezclaron antes de la molienda. Los resultados obtenidos muestran una mayor contaminación de micotoxinas en arroz basmati, con un 71%, y las muestras de arroz jazmín con el 20%. Se encontraron niveles detectables de aflatoxina B1 con un nivel de 0.1 µg/kg de aflatoxina en el arroz. Dos muestras de arroz jazmín y diez muestras de arroz “basmati”, contenían niveles superiores al límite máximo del reglamento europeo de 2 µg/kg para la aflatoxina B1 y 4 µg/kg para el total de aflatoxinas. El género *Aspergillus* fue el más aislado pero también se encontraron *Penicillium*, *Eurotium*, *Wallemia*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, y *Trichotecium*. La presencia de la especie de *Aspergillus flavus* se detectó en el 21% de las muestras lo cual indicó un manejo incorrecto de arroz durante la producción y el almacenamiento lo que implicó un mayor riesgo de crecimiento del hongo. Concluyendo que la ingesta de arroz mostró estimaciones aproximadas de una concentración elevada de AF de 2-3 ng/kg de peso corporal mostrando que la AF es un contaminante común en el arroz y que fue importado a Europa (Fredlund et al, 2009).

Se utilizó un disolvente supercrítico para la extracción de compuestos de ácido decanoico, dispersados en Tetrahidrofurano (THF): agua, y se propuso como medio de extracción simple, rápida y eficiente de OTA en trigo antes de la determinación en CL-FLD. El método implicó la agitación de 300 mg de submuestras de trigo (tamaño de partícula 5 µm) y 350 µL de disolvente supramolecular durante 15 min, después 15 minutos de centrifugación y una cuantificación directa de OTA en el extracto. Al extracto se le hicieron 5 a 7 lavados con una mezcla de agua/ácido acético/etanol (49,5/49,5/1). Se investigaron las interacciones entre los componentes de la matriz con los disolventes supercríticos (es decir, hidratos de carbono, lípidos y proteínas). Se mostraron micelas inversas durante la extracción y floculación de gluten; la región de interés analítico (es decir, en porcentajes de THF por encima del 11%), mostró que la cuantificación de OTA era libre de interferencias. La idoneidad del análisis de 300 submuestras de trigo se comprobó mediante el análisis de un material de referencia. Se obtuvieron recuperaciones de OTA en el trigo de 84% y 95% y la precisión del método, en términos de la RSD fue del 2%. El LOQ del método fue 1.5 µg/kg y estaba por debajo del límite del umbral establecido para la OTA en los cereales crudos por organismos de la UE (5.0 µg/kg). El método desarrollado se validó mediante el uso de un material de referencia certificado y se aplicó con éxito a la determinación de la OTA en diferentes variedades de trigo a partir de cosechas en el sur de España. Concluyendo en que este método permite una extracción rápida y simple de la OTA con un mínimo consumo de disolventes, y que provee datos confiables y precisos (García et al, 2009).

Se realizó una determinación simultánea de 10 micotoxinas en granos de cereales mediante UHPLC-MS/MS. Las micotoxinas fueron: OTA, OTB, ZEA, DON, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, NIV, fusarenol, y moniliformina. Se extrajeron con una mezcla de acetonitrilo-agua (84:16), los analitos fueron

separados en una columna Acquity UPLC HSS eluyendose con una fase móvil de agua y amoniaco acuoso al 0.2% y acetonitrilo/metanol (90:10, v/v). Todas las micotoxinas se detectaron con LC-Q-TOF-MS. Esta determinación se logró mediante el empleo comercial de DON como patrón interno. Este método fue validado determinándose una linealidad de 0.9990, con un recobro de 75.8 a 106.5%, un límite de cuantificación de 0.09-8.48 mg/kg y precisión o RSD 6.9%. A todo esto se demostró que es un método adecuado para la determinación simultánea de las 10 micotoxinas en granos. Por último, se analizaron un total de 69 muestras de maíz recogidas al azar en el este y el norte de China. Los resultados mostraron que el DON era el contaminante más frecuentemente detectado, mientras que 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, NIV, ZEA, fusarenon X y moniliformina también se encontraron con frecuencia. La OTA y la OTB estuvieron presentes sólo en pequeñas cantidades en un pequeño número de muestras (Jin et al, 2010).

Se realizó el análisis a un centenar de muestras de arroz sin envasar, cada una con un peso de 500 g que se recogieron al azar de tiendas y mercados abiertos en el área de cultivo de arroz más grande de Tracia, Turquía. Las muestras se llevaron a análisis para hacer un recuento de hongos y así establecer los géneros que pueden estar presentes. Se encontraron de 1.0×10^1 a 1.5×10^4 ufc/g en 70 de las 100 muestras y se encontró una correlación significativa entre el contenido de humedad y la cantidad de hongos encontrados. *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* fueron los géneros dominantes en la zona de la que se recogieron las muestras y se sabe que son productores potenciales de micotoxinas. Se encontró que el contenido de micotoxinas en el arroz se correlaciona positivamente con el contenido de humedad. Los niveles de AFS totales, AFB1 y OTA fueron superiores a los límites máximos tolerables de 4.2 y 3 mg/kg, de acuerdo con el Reglamento CE y el Codex de Alimentos turco para 32, 14 y 30 de 100 muestras de arroz, respectivamente. Este fue el primer informe exhaustivo de los niveles de OTA en el arroz cultivado en Tracia, Turquía (Aydin et al, 2011).

En este trabajo se describe una aplicación de IAC que utiliza un sol-gel para el aislamiento de OTA de los cultivos de cereales contaminados. Se usaron anticuerpos monoclonales selectivos para OTA, que están atrapados en los poros de una matriz sol-gel para IAC. Los diferentes parámetros utilizados así como la cantidad de anticuerpos atrapados y condiciones de carga fueron optimizados para obtener los mayores recobros posibles de OTA. El método resultó ser una herramienta adecuada en la preparación de la muestra antes de la determinación selectiva con HPLC-FLD, en comparación con las IAC convencionales que están disponibles comercialmente. En el aislamiento de OTA de los diferentes cereales, se obtuvieron recobros de entre $82 \pm 5\%$, $90 \pm 6\%$ y $91 \pm 3\%$, obteniéndose para el trigo, la cebada y el centeno, respectivamente, con columnas de sol-gel que contienen 1 mg de anticuerpos anti-OTA. El LOD fue $0.5 \mu\text{g/kg}$ y el LOQ se estableció en $1 \mu\text{g/kg}$. Teniendo en cuenta que las columnas de sol-gel pueden ser

reutilizados 7 veces sin pérdida significativa del recobro; sin embargo, después de 10 aplicaciones, el recobro disminuyó en aproximadamente el 50 % (Reiter et al, 2011).

Se realizó un estudio para evaluar OTA en granos de café de un cultivo ecológico y convencional en el sur de Minas Gerais (minas generales) en Brasil y también para evaluar si su presencia presenta un riesgo de contaminación en el sistema agrícola. Para ello se analizaron 30 muestras de granos de café (*Coffea arabica* L.), donde 20 muestras son granos de café convencionales y 10 muestras de granos orgánicos. Se realizó el aislamiento microbiológico en agar dicloran Rosa de Bengala cloranfenicol (DRBC), su identificación fue a base de las características morfológicas macro y microscópicas. De las 30 muestras analizadas, se aislaron 480 hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*. Las especies ocratoxigénicas identificadas fueron: *A. auricoumus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. niger*. Estas son las especies más frecuentes que producen OTA, donde *A. ochraceus* corresponde al 89,55% en su producción. Por tanto no hubo diferencia en las otras especies ocratoxigénicas, concluyendo que *A. ochraceus* resultó un riesgo de contaminación similar para ambos sistemas convencional y orgánico del cultivo de granos de café (Fátima et al, 2013).

En resumen...

Los artículos incluidos en este apartado incluyen una amplia variedad de productos. Cuando se habla de contaminación de alimentos por OTA se piensa en cereales principalmente y café, por ejemplo. En este caso se está incluyendo al cacao y al arroz. En el caso del arroz, se estudia la contaminación en países como China y Turquía, que son productores así como Suecia, que es consumidor. En todos los casos se encuentra OTA y según el estudio realizado en Suecia, habrá una mayor contaminación de acuerdo al contenido de gluten del arroz. En cuanto al cacao, se reportan aquí dos estudios, uno en Costa de Marfil y otro en España. En ambos casos se reporta la presencia de hongos ocratoxigénicos; sin embargo, se reporta que el proceso de industrialización del cacao disminuye considerablemente la contaminación por OTA, hasta cierto nivel. Los estudios relacionados al café mencionan las diferencias en contaminación en café verde y tostado. En este caso, sucede lo mismo que con el cacao, se logran disminuir los niveles de OTA hasta cierto punto; sin embargo, es interesante saber que la forma de preparar el café tostado influye en la disminución de la contaminación por OTA, siendo el tipo italiano (expresso) más eficiente que la infusión. Por otro lado, no se encontró ninguna diferencia en cuanto a la presencia de hongos ocratoxigénicos, en café ecológico y convencional. Los métodos de determinación utilizados también son en general por HPLC con FLD y MS/MS; cabe destacar que se siguen haciendo intentos por mejorar los métodos de preparación de las muestras como es el uso de una IAC en sol-gel y la utilización de tetrahidrofurano como

solvente supercrítico para extraer OTA. Se mejoran métodos para hacer la determinación de hasta 10 micotoxinas. Un artículo hace una mención importante, lo crucial que resulta el método de muestreo en los cereales a granel para obtener buenos resultados en el análisis. Aún cuando en la mayoría de los estudios se menciona que se encuentra contaminación, gran parte de las muestras no presentan niveles superiores a los establecidos por los organismos reguladores internacionales; sin embargo, se tiene exposición a OTA por diversas fuentes.

7.5. DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA EN ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO.

El aceite de oliva, considerado como la fuente de grasa dietética más importante de la dieta mediterránea, puede ser contaminado por micotoxinas. Se realizaron estudios con un método analítico para la determinación simultánea de AFB1 y OTA en aceite de oliva. En 30 muestras comerciales de aceite de oliva virgen, obtenidas de plantas y supermercados en el sur de Italia y África del norte, se usó un método simple, rápido, económico y probado para ambos pasos de los procesos extractivos y de limpieza para la determinación simultánea de AFB1 y OTA en aceite de oliva. Los resultados arrojaron que OTA se detectó con alta frecuencia (80%) en las muestras de ambas zonas geográficas (a 17.0 ng/g), mientras que AFB1 fue encontrado en tres de las cuatro muestras de África del Norte (hasta 2.4 ng/g). Por otra parte, las muestras de aceite no etiquetadas resultaron estar más contaminados por OTA en valores de 2.47 y 0.66 ng/g, respectivamente. Estos resultados indican que el aceite de oliva puede estar significativamente contaminado por micotoxinas por lo que el reglamento Europeo estableció la norma 1019/2002 (Comisión europea, 2002), que prohíbe la venta de aceite de oliva no etiquetados (Ferracane et al, 2007).

Se determinó OTA en muestras de leche para lo que se desarrolló un nuevo método analítico de inmunoafinidad directa, que consiste en la utilización de una columna preparativa con anticuerpos anti OTA para extraerla de las muestras de leche, seguido de una determinación de la toxina mediante HPLC (Milićević et al, 2010). Para esta técnica se utilizaron dos cartuchos de inmunoafinidad diferentes (IAC) y las columnas de "ochraprep" fueron elegidas porque mostraron mejores resultados. Obteniendo una recuperación promedio de 89.8% y una RSD promedio de 5.8% en leche de vaca contaminada en el rango de 5-100ng/L. Se calcularon un límite de detección y un límite de cuantificación para la leche en el orden de 0.5 y 5 ng/L, respectivamente. Este nuevo método es fácil y rápido, evita un paso anterior de la extracción líquido-líquido y por lo tanto el uso de solventes tóxicos que contienen cloro. Los cromatogramas de los extractos finales se mostraron limpios y la OTA podía ser fácilmente detectada en un tiempo de retención de 8.4 minutos sin interferencias. Para evaluar la presencia de la toxina se usaron 8 muestras de leche de vaca desnatada y 4 muestras de leche entera, las cuales se analizaron sin encontrar OTA en concentración mayor al límite de detección establecido (Bascarán et al, 2007).

Se desarrolló un método por HPLC-MS/MS sensible, simple y rápido para la determinación simultánea de 19 micotoxinas en galletas. Debido a la complejidad de la matriz y la alta cantidad de contaminantes se creó un método de extracción en fase sólida utilizando carbón grafitado que se optimizó para realizar una limpieza eficaz en un solo paso. La precisión se evaluó en la matriz seleccionada utilizando muestras blanco enriquecidas con tres concentraciones del analito. Se

obtuvieron recobros del 63 y 107% y las desviaciones estándar relativas inferiores a 12%. El método fue validado en términos de linealidad, recuperación, efecto de la matriz, precisión, límite de detección y límite de cuantificación. La calibración con ajuste matricial se utilizó para fines de cuantificación, con el fin de compensar el efecto de matriz. Los coeficientes de determinación estuvieron entre 0.9927 y 1. Los límites de cuantificación, que van desde 0.04 µg/kg para AFB1 a 80.2 µg/kg para el nivalenol, fueron siempre inferiores a los niveles máximos para cada micotoxina tal como lo regula la legislación europea actual (Capriotti et al, 2014).

Las muestras de productos de cereales para el consumo humano directo son muestras que raramente están contaminadas por mohos, a diferencia de las materias primas, que a menudo están infectadas, ya sea en el campo o durante el almacenamiento. La intención de este estudio, era saber cómo era la coocurrencia del DON con otras toxinas para lo cual se recolectaron y analizaron por LC y LC-MS/MS 27 muestras de pasta seca contaminada con DON que se caracteriza por tener un tamaño pequeño del envase y cuya comercialización está destinada al consumo de niños pequeños. Las muestras se cocinaron durante 10 min y se observó que 7 de las 27 muestras excedieron del 120% a 225% teniendo un límite legal de 200 µg/kg para el DON fijada para los elaborados a base de cereales para bebés por un reglamento europeo; el resto de las muestras estaban bajo el límite legal de OTA de 0.05 µg/kg fijado por el reglamento europeo y ninguna muestra estaba contaminada por AFB1 sobre el límite de detección de 0.10 µg/kg. Se obtuvo el valor medio de bioaccesibilidad gástrica verificada para el DON de 23,1%, que significa una bioaccesibilidad duodenal de 12,1% (Raiola et al, 2011).

Se realizó una investigación de OTA en muestras de caramelos de regaliz, donde se analizaron 44 muestras con el método de IAC y CL-FLD. Su detección fue confirmada por derivatización a sus correspondientes derivados metil-éster. Las muestras de caramelos de regaliz se compraron en diversos puntos de venta y de supermercados en España durante el período 2007-2008, donde se seleccionaron 16 caramelos duros y 28 de caramelos blandos para su análisis. La incidencia de OTA y su concentración varió entre 75% y 39%, con 2.96 y 0.34 µg/kg para los caramelos duros y blandos, respectivamente. Se supuso un valor medio total de 1.29 µg/kg del caramelo y un consumo de aproximadamente 1.2 g de caramelos de regaliz por día, obteniendo una ingestión de OTA semanal de 11 ng, basada en un peso corporal total de 30 kg para un niño al consumir estos caramelos con regularidad, con lo cual la ingesta semanal es de 0.37 ng/kg de peso corporal. Esto corresponde al 0.31% de la ingesta semanal tolerable, establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria en base a estudios toxicológicos. La evaluación de riesgo por el consumo en los de niños representó el 8.94% de la ingesta semanal tolerable por caramelos de regaliz (Herrera y Ariño, 2009).

El límite máximo de OTA en la UE es de 10 µg/kg para las uvas secas, establecido desde el 2002 (Comisión Europea, 2005). En este trabajo se explora la capacidad de usar la FTIR-ATR para la detección de la OTA en las uvas secas en un

intervalo de concentraciones de entre 2 y 50 µg/kg de OTA. El método fue desarrollado con un pretratamiento de la muestra, utilizando un cartucho C₁₈, que es eficaz para el aislamiento de la micotoxina. El análisis PLS1 del espectro de pasas con diferentes concentraciones de OTA mostró una buena correlación entre el espectro de la concentración de datos y de referencia para OTA de 0.85 µg/kg (Galvis et al, 2008).

El siguiente trabajo fue realizado para la determinación de OTA, OTB y CIT de alimentos comerciales mediante HPLC acoplada con CLMS/MSMS de manera simultánea. Las muestras examinadas fueron cereales, fruta, café, y productos de cacao. Los LOQ de la OTA, OTB y CIT fueron de 0.1 µg/kg. También se encontraron AFS, DON y las FBS, que se encontraron en 157 muestras analizadas, de las cuales 44 estaban contaminadas con OTA en niveles de 0.11 a 4.0 µg/kg, de donde al menos 2 muestras positivas fueron etiquetadas como domésticas. En las demás muestras positivas se encontró que el nivel de OTA fue bajo, de menos de 1 µg/kg. También se observó que la mayor incidencia de la OTA en el cacao en polvo fue de 10 por cada 12 muestras, seguido por el café instantáneo 5 de 7, cacao 5 de 8 y pasas 6 de 13. La OTB fue encontrada en frutas y productos de cacao que contienen niveles relativamente altos de OTA. Se tuvo una co-ocurrencia de OTA, CIT y DON en los productos de cereales, y la co-ocurrencia de la OTA y AF también se encontraron en los productos de cacao, con lo que aproximadamente el 30% de café tostado fue contaminado de forma natural con OTA (Tabata et al, 2008).

Se realizó un análisis del pimentón rojo mediante espectroscopía al infrarrojo cercano, para la detección de OTA, AFB1 y AF totales; como referencia, se emplearon resultados obtenidos mediante HPLC-FLD, tras una limpieza con la IAC. Para la medición NIRS, se utilizó una sonda de fibra óptica que se aplicó directamente sobre las muestras de pimentón, con lo cual no hubo necesidad de un pretratamiento o manipulación de la muestra. Los mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) y algoritmos se utilizaron como método de regresión y los LRQ y la predicción corrigieron los errores estándar y fueron respectivamente de 0.955 y 0.2 µg/kg para la AFB1; 0.938 y 0.3 µg/kg para AF totales y 0.853 y 2.3 µg/kg para OTA. Como resultado, la capacidad de la predicción del modelo desarrollado es medida como RPD para la AFB 1 (5.2), la OTA (2.8) y las AFS total (4.4), que indica que la técnica NIRS ofrece una alternativa para la determinación de estos tres parámetros en pimentón, con un costo ventajosamente menor y de mayor velocidad en comparación con el método químico. El contenido de AFB1 y el total de éstas son parámetros que actualmente son empleadas por las regulaciones de alimentos para limitar los niveles de las cuatro aflatoxinas en muchos productos alimenticios. Además, la AFB1 en sí es un excelente indicador de contaminación de aflatoxinas ya que siempre es el más abundante y tóxico (Hernández et al, 2008).

Se realizó una investigación sobre la incidencia de OTA en muestras de frutos secos: 98 de higos, 53 de pasas y 20 de albaricoques secos destinados a la exportación de Turquía a la Unión Europea, utilizando una columna de inmunoafinidad y HPLC para la detección de OTA, de lo cual sólo 2 (4%) de las sultanas superó el 10 ng/g como límite máximo fijado por la UE, 28 (53%) de 53 muestras contenían niveles detectables de OTA, en el rango de 0.51 a 58.04 ng/g. De los higos secos 18 de 98 (18%) contenían niveles detectables de OTA, en el intervalo de 0.87 a 24.37 ng/g. Sólo uno de los 20 orejones estaban contaminados, con 0.97 ng/g de OTA. Los higos secos también se analizaron para determinar la presencia de AF y determinar la concurrencia de ambas toxinas. 7 muestras fueron confirmadas como positivas a AF, en el intervalo de 0.23 a 4.28 ng/g y sólo 2 muestras contenían ambas toxinas, con una concentración máxima de 24.37 ng/g para OTA y 1.02 ng/g para AFB1. El recobro promedio y la RSD, obtenidos a partir de frutas secas enriquecidas con OTA variaron de 80.5% a 91.5% y 0.99 a 5%, respectivamente. El recobro promedio y la RSD obtenidos a partir de higos secos enriquecidos con AF variaron de 88.78% a 93.53% y 2.54 a 7.25% (Bircan, 2009).

Se realizó una determinación de AF y OTA en dulces tradicionales con un alto contenido de azúcar ya que forman parte de la alimentación de Turquía. La determinación se realizó por IAC-FLD cuya eficacia ya está probada para la determinación de micotoxinas. Los alimentos tradicionales con alto contenido de azúcar tales como, baklava (pastelería fina capas rellenos de nueces y empapado en almíbar), halvah (que contiene pasta de sésamo y pistachos), sucuk Cevizli (dulces hechos de jugo de uva hervido y secado en las cadenas de frutos secos), delicias turcas (que contiene avellanas, pistachos o nueces), y Pişmaniye (dulces hechos de azúcar, mantequilla, y harina), se sometieron a análisis: el rendimiento del método se estableció con muestras enriquecidas. Para examinar la solidez de la metodología, "baklava" era preparado a partir de ingredientes secos como materia prima y a través de etapas posteriores de una preparación de masa, y riormente después de la cocción. Se realizó el mismo procedimiento para todos los productos, el método analítico incluye la reducción del tamaño del producto bajo nitrógeno líquido para formar un polvo fino, después se mezclaron a fondo para preparar las submuestras. Después de la extracción en vortex con metanol-agua para AFS y bicarbonato de sodio acuoso para OTA, la muestra se filtró, se diluyó con solución salina tamponada con fosfato, y después se pasó a través de una columna de afinidad para AFS u OTA antes del análisis por HPLC-FLD mediante bromación post-columna para las AFS. Como resultado después de analizar los productos turcos tradicionales se obtuvo una recuperación de la AFB1 que varió de 77% a 98%, y LD era <0.1 µg/kg. Para la OTA, los recobros eran 88 a 93% y LD fueron igualmente <0.1 µg/kg. A pesar de la compleja naturaleza de estos alimentos tradicionales turcos, que con frecuencia contienen productos de caramelización del azúcar, no hubo evidencia de que interfieren sustancias

coextractivas, y el método ha demostrado ser lo suficientemente robusto como para ser utilizado para el control de los alimentos (Senyuva et al, 2009).

Utilizando el método por LCMS/MSMS multi-analito se determinaron micotoxinas en complementos alimenticios, los analitos incluidos fueron tricotecenos A y B (NIV, DON, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, neosolaniol, fusarenon-X, diacetoxiscirpenol, HT-2 y toxina T-2), las AFS y sus tipos, FBS y sus tipos, OTA, ZEN, beauvericina y esterigmatocistina. Se realizó una extracción simultánea de estas toxinas y un procedimiento de pretratamiento de la muestra, así como la validación de los métodos. Los resultados, indicaron que el disolvente acetato de etilo/ácido fórmico (95: 5 v/v) fue el mejor componente para la extracción de los analitos de los complementos alimenticios. La extracción líquido-líquido con n-hexano se aplicó como paso de limpieza parcial para eliminar el exceso de componentes no polares extraídos simultáneamente. Además, la limpieza se realizó también en cartuchos Oasis HLB. Las muestras se analizaron usando un sistema de UPLC acoplado a un micro-espectrómetro de masas de triple cuadrúpolo equipado con una interfaz de electropulverización, operado en el modo de ion positivo. Los límites de detección y cuantificación estuvieron en el rango de 0.3-30 ng/g y 1-100 ng/g, respectivamente. Los rendimientos de recuperación estaban por encima de 60% para la mayoría de los analitos, excepto para el nivalenol, sterigmatocystine y las FBS. El método mostró buena precisión y veracidad de los análisis de diferentes suplementos alimenticios tales como la soja (*Glycine max*) isoflavonas, hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), ajo (*Allium sativum*), Ginkgo biloba, y el rábano negro (*Raphanus niger*) demostrando la aplicación general del método. Como resultados y conclusiones se tiene que debido a los diferentes efectos de la matriz observados de las diferentes muestras de suplementos alimenticios, el enfoque de adición estándar se debe aplicar para realizar el análisis cuantitativo correcto. En 56 de 62 muestras analizadas, no se detectó ninguna de las 23 micotoxinas investigadas y en las muestras que si se detectaron, se encontró FB1, FB2, FB3 Y OTA (Diana et al, 2009).

Se realizó la validación de un método cuantitativo para AFS, OTA y la ZEA en cereales utilizando HPLC-FLD. Dichas micotoxinas se extrajeron con metanol: agua (80:20) y se purificó mediante una IAC multifuncional antes del análisis con HPLC. La validación del método se basó en los siguientes parámetros: especificidad, selectividad, linealidad, límites de detección LOD y LOQ, exactitud, precisión, la estabilidad, robustez, la medición de rendimiento, y la medición de la incertidumbre. Las curvas de calibración fueron lineales sobre el intervalo de concentraciones, desde el LOQ a 26, 40 y 400 ng/g para las AF, OTA y ZEA, respectivamente. LOD y LOQ fueron 0.0125 y 0.05 ng/g para la AFB1 y AFG1, 0.0037 y 0.015 ng/g para la AFB2 y AFG2, así como 0.05 y 0.2 ng/g de OTA y 0.5 y 2 ng/g para ZEA, respectivamente. Los valores medios de recuperación fueron 77-104% para diferentes concentraciones de AFS, OTA y ZEA en muestras de cereales. La precisión se encontraba dentro de los límites aceptables por lo cual

el método fue aplicado con éxito para la determinación simultánea de las micotoxinas en 60 muestras de cereales recolectados de los mercados de Malasia. El 50% de las muestras de cereales estaban contaminados con al menos una de las micotoxinas mencionadas, a un nivel mayor que LOD. Sólo una muestra de trigo y dos muestras de arroz estaban contaminados con niveles superiores a los límites reglamentarios de la Unión Europea para las AFS y OTA (4 y 5 ng/g, respectivamente). Las medias y los intervalos de micotoxinas obtenidos para las muestras de cereales fueron de 0.4 ng/g y 0.01 a 5.9 ng/g para las AFS totales; 0.18 ng/g y 0.03 a 5.3 ng/g para la OTA; y 2.8 ng/g y 2.4 a 73.1 ng/g para ZEA, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron que el método es adecuado para la determinación simultánea de dichas micotoxinas en los cereales y es adecuado para un análisis de rutina (Rahmani y Jinap, 2010).

Se realizó una extracción asistida enzimáticamente para la determinación de OTA en carne y jamón curado de cerdo, para luego hacer determinación por HPLC. La extracción se llevó a cabo utilizando disolventes orgánicos clorados, tales como cloroformo o cloruro de metilo, que se acidificaron con ácido clorhídrico u o-fosfórico. El análisis realizado es un método innovador para extraer OTA a partir de muestras de derivados de carne de cerdo. El método se basa en una extracción enzimática asistida con pancreatina en tampón de fosfatos a un pH 7.5. La función de la pancreatina es hidrolizar las proteínas de modo que la toxina se mantenga en su forma ionizada, extrayéndose fácilmente por la solución acuosa. Después de la purificación, a través de una IAC, la OTA se determina por HPLC-FLD. Los valores promedio de recuperación fueron superiores a 90.0% y la RDS estaba por debajo de 5.5%, los límites de detección y de cuantificación fueron 0.06 y 0.12 mg/kg, respectivamente; la comparación entre la nueva extracción enzimática asistida y un método establecido que usa cloroformo se llevó a cabo en seis muestras de cerdo contaminadas de forma natural y en 40 muestras de jamón curado. Se obtuvieron valores mayores en las muestras de jamón por el método enzima-asistida (Pietri et al, 2011).

Se describe un método analítico simple para la determinación de OTA en uvas, que utiliza una extracción metanólica acuosa en una IAC y con HPLC-FDL (Pozzo et al, 2010). Se encontró que la recuperación fue del 94% con un límite de detección de 0.4 ng/g y límite de cuantificación de 1.20 ng/g. La repetibilidad y reproducibilidad fueron de 1.17 y 1.34, respectivamente. Por otra parte las determinaciones de OTA se aplicaron en 50 muestras de uva de 23 diferentes variedades en regiones de Grecia. Los resultados mostraron la presencia de OTA en el 86% de las muestras analizadas. Los rastros de la OTA fueron encontrados en el 56% de las muestras pero la OTA no era perceptible en el 14% de las muestras analizadas. También se encontraron rastros en el 4% de muestras rojas, cultivadas orgánicamente. La mayor parte se dio en tres muestras de las uvas rojas, de Grecia Central (2.69 y 1.41 ng/g) y la tercera muestra se originó en la isla de Samos (1.46 ng/g). Las uvas rojas se utilizan principalmente en la elaboración

de vinos y su contenido medio de OTA (1.06 ng/g) y mediana (0.76 ng/g) es ligeramente superior en comparación con la media (0.82 ng/g) y una mediana (0.65 ng/g) de las concentraciones encontradas en las muestras de uva blancas (Meletis et al, 2011).

Durante el año 2011 se realizó un estudio para la determinación de los niveles de AFB y OTA en frijol, para lo cual utilizaron una extracción por IAC. Se realizó el análisis en 30 muestras de frijol obteniendo que el 16.67% y el 10% de las muestras contenían AFB1 y OTA, respectivamente en más de 0.2 ng/g. Se tuvieron recobros del 91.1% y 98.5% para la AFB1 y OTA, respectivamente, mientras que el límite de detección fue de 0.2 ng/g para ambas micotoxinas (Fakoor et al, 2012).

En este artículo se aborda la validación de un método de datos para la determinación de la OTA haciendo énfasis en la comprensión de criterios tales como: selectividad, estabilidad, linealidad, precisión, entre otros (Corcuera et al, 2011). Para ilustrar esto, se usaron dos matrices de especies de pimentón rojo y pimentón negro, de las cuales se tomaron muestras preparadas en una sola etapa y se sometieron a una limpieza en columna. Los extractos de las muestras que habían sido finamente molidas se prepararon y se colocaron en una IAC llamada "Mycosep 229". Posteriormente se sometieron a análisis mediante HPLC-FLD. El resultado de la RSD del método fue 11,8% para el pimiento rojo y el 9.9% para la pimiento negro y el valor del LOD estimado corresponde en respuesta de un extracto de un blanco previamente lavado y enriquecido con 1,0 µg/kg. El LOQ (tres veces LOD) fue de 3.0 µg/kg. Para el rendimiento usando IAC, se concluye que es una alternativa adecuada como técnica preparativa y que permite la determinación precisa de OTA en dos matrices complejas (Bononi et al, 2012).

Siguiendo con la aparición de micotoxinas en la alimentación, se utilizó un método de determinación multi-micotoxinas mediante LCMS/MS para analizar productos utilizados en la alimentación animal. Mediante cultivos, se observó que dichos alimentos se pueden contaminar por hongos durante el crecimiento, cosecha, o el almacenamiento. Para esto, la Comisión Europea estableció los niveles de concentración máximas de micotoxinas en los alimentos. En este trabajo se empleó un método de determinación multi-micotoxigénico por LCMS-MS desarrollado y validado de acuerdo con la norma 2002/657/ de la CE y la NOM ISO 17025 para la detección simultánea de 23 micotoxinas (AFS, OTA, deoxinivalenol, zearalenona, FBS, toxina-T2, HT2-toxina, nivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, 15 acetildeoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, fusarenona-X, neosolaniol, alternueno, alternariol, éter alternariol metilo, roquefortine-C, y esterigmatocistina) alimentos. Por lo tanto, se estableció que los límites de decisión para el método variaron de 0.7 hasta 60.6 µg/kg. Los resultados cumplieron con los criterios establecidos en la norma 2002/657/CE de la Comisión Europea. En total, se encontraron contaminadas 67 muestras de 82 (82%); las micotoxinas tipo β-tricotecenos y fumonisinas se produjeron con más frecuencia.

La mayoría de las muestras de alimentos fueron infectadas en un 75% con más de un tipo de micotoxina (Monbaliu et al, 2012).

Otra determinación simultánea de AF, OTA y toxinas de *Fusarium* en maíz se realizó por CL MS/MS-MS después de preparar la muestra por IAC (Ritieni et al, 2011). Se desarrolló el método por CLMS/MS para la determinación simultánea de distintas toxinas como: AFB, OTA, FBS, DON, ZEA, toxinas T-2 y HT-2 en maíz. La extracción se realizó usando una solución de fosfatos seguido por metanol, para lograr una buena extracción en conjunto de las 11 micotoxinas, que tienen diferentes polaridades y estructuras químicas. En la preparación de la muestra mediante IAC, la columna contenía anticuerpos contra las micotoxinas utilizadas con la finalidad de limpiar los extractos. La detección y cuantificación de las 11 micotoxinas se realizó por LC/ESI-MS/MS. Por otra parte, los límites de detección oscilaron entre 0.3 y 4.2 µg/kg de maíz. Obteniendo recobros superiores al 79% para todas, con RSD de menos del 13% para las micotoxinas; como resultado, los métodos utilizados fueron bastante satisfactorios para todas las micotoxinas probadas, obteniéndose niveles de contaminación cerca o por debajo de los niveles permitidos por la Unión Europea (Lattanzio et al, 2012).

En Japón se realizaron estudios para la determinación de OTA, AFS, FBS, debido a la contaminación de varios alimentos durante el periodo 2004-2005. Las micotoxinas se analizaron por HPLC y LC/MSMS o cromatografía en capa fina de alto rendimiento. Detectándose AFS en 10 muestras de mantequilla de maní y en 22 de 44 muestras de chocolate amargo. Se encontró un mayor nivel de AFB1 con una concentración de 2,59 µg/kg, y sin que se presentara en productos de maíz. Por otra parte la OTA se detectó en 120 de las 192 muestras de harina de avena analizadas, harina de trigo, centeno, harina de trigo sarraceno, café crudo, café tostado, pasas, cerveza, vino y chocolate amargo, pero no en arroz o productos de maíz. Los niveles mostrados de OTA resultaron positivas siendo inferiores a 13 µg/kg (Kumagai et al, 2012).

Se ha mencionado que la exposición prolongada a las micotoxinas en la dieta está relacionada con el cáncer, entre otras enfermedades. El carcinoma hepatocelular (CHC) representa el 70 % -90 % de los cánceres hepáticos primarios y es la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Metabolitos secundarios, como las AFB y OTA, producidos por algunas especies de hongos almacenados de manera inadecuada se consideran un medio importante para aumentar la incidencia de CHC. Por lo que se hacen estudios epidemiológicos centrándose en las buenas prácticas durante la preparación de alimentos, almacenamiento de alimentos y el consumo de alimentos que contienen OTA (Felizardo et al, 2013).

En otro estudio, se realizó el análisis con 26 muestras de frutas secas procedentes de Atenas y Tebas en Grecia; se realizó la extracción simultánea de micotoxinas por el método de IAC en la determinación de AFB1 y OTA. Y por otra parte una combinación con el método de ELISA y HPLC para la determinación de AFB1. La

recuperación obtenida fue de 97.6%, RSD 6.46%, mientras que el LOD y LOQ era 0.05 g/kg y 0.09 g/kg respectivamente. Las concentraciones de OTA sólo fueron estimados por el método ELISA cuyos resultados revelaron la presencia de AFB1 en el 23% de las muestras teniendo 1.4 mg/kg, pero ninguno superó el límite de la UE que es de 2 mg/kg. Sin embargo, OTA se detectó el 100% de las muestras con 47.2 g/kg, encontrándose seis muestras contaminadas a altos niveles de 120.6 g/kg y 18 que superaron el límite de la UE de 10 mg/kg (Kollia et al, 2014).

En resumen...

Los alimentos analizados que fueron incluidos en este apartado son galletas, pastas, uvas secas, cereales, café verde y tostado, cacao, frutas secas, uvas de diferentes regiones, cereales en general, jamón y carne de cerdo, aceite de oliva, frijol, pimentón rojo y negro, leche, harinas varias (avena, trigo, centeno), cerveza, vino, chocolate amargo, suplementos alimenticios. Es decir, alimentos muy variados. Anteriormente se ha mencionado que aún cuando la mayoría de las muestras no tienen una contaminación apreciable, muestran presencia de OTA. Considerando la variedad de alimentos que la contienen, es preocupante la exposición que tiene la población a esta micotoxina. Como en los apartados anteriores, HPLC con FLD y MS/MS son los métodos de determinación más usados. Se mencionan variantes, mejoras y validaciones. Como métodos de preparación de muestra, la IAC es la preferida aunque se propone también el uso de NIR. Se menciona el uso de una extracción enzimática asistida con pancreatina para jamón y carne de cerdo de tal manera que las fibras cárnicas liberen a la OTA y en su forma ionizada para su mejor extracción. Sólo se usa en una ocasión la técnica de ELISA para la determinación de OTA.

7.6. DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA ESTUDIAR A LA OTA.

Se realizó un análisis con peroxidasas del rábano picante inmovilizadas en una matriz de polipirrol con electrodos de carbono serigrafiados desechables con la finalidad de detectar selectivamente a la OTA. Esta determinación se optimizó mediante un diseño experimental, que implicó la evaluación simultánea del pH de la solución tampón, el potencial y la concentración de H₂O₂. Las pendientes de las curvas de calibración construidas bajo condiciones óptimas de las variables experimentales se utilizaron para estimar la reproducibilidad y la repetibilidad del biosensor desarrollado para la OTA. Los valores de RSD fueron de 1.9% y 7.1% para la reproducibilidad y repetibilidad. La capacidad de detección para este método era 0.1ng/mL. Teniendo como resultado que la viabilidad del biosensor desarrollado en la determinación de la OTA en la cerveza y en el café tostado produce recuperaciones medias de 103% y 99% en ese orden, con valores de desviación estándar relativa inferiores al 5% en ambos casos (Alonso et al, 2010).

Otra manera para determinar la OTA es usando nanomateriales como los nanotubos de carbono de pared simple. La micotoxina producida por *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*, es una de las más abundantes contaminantes de los alimentos en el mundo. Ha sido clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, como un posible carcinógeno humano (Abraham y Ernesto, 2009). En este estudio se construyó un aptasensor fluorescente sensible y selectivo para determinar OTA, que contiene carboxifluoresceína. Se obtuvo un límite de detección 24.1 nM con un rango de detección lineal de 25 nM a 200 nM. Dicho metodo respondió sin interferencia alguna solo específicamente para OTA, independiente de otros análogos como N-acetil-L-fenilalanina, warfarina y OTB (Guo et al, 2011).

Por otra parte, en el 2011 se utilizó una columna de inmunoafinidad y electroforesis capilar para tener una mejor detección de OTA, una forma totalmente automatizada con la micotoxina de prueba. Dichas columnas de micro inmunoafinidad en línea a base de polímeros de metacrilato monolítico (EDMA-GMA) se prepararon *in situ* en el extremo de entrada de un capilar de sílice fundida con revestimiento de PTFE. La polimerización se inicia por UV y posteriormente son injertados con anticuerpos. La síntesis del polímero demostró que las propiedades son eficaces para inmovilizar los anticuerpos; esto se estudió por AECA la cual permite la determinación cuantitativa *in situ* a escala miniaturizada. Se demostró por primera vez que puede haber unión entre el micro-columna y el capilar; se determinó la actividad de anticuerpos inmovilizados, con un total de 260 ± 15 ng de los mismos IgG/cm. Es posible que haya unión en la columna de 75µm de anti OTA/OTA como modelo de antígeno y anticuerpo, manteniéndose la unión con los anticuerpos inmovilizados en 1.2 ± 0.2 pmol antígeno/cm (Chamieh et al, 2011).

Tras haber demostrado el buen funcionamiento de los microarreglos utilizados para el control de micotoxinas en los alimentos se desarrolló otra técnica de microarreglos encargada de cubrir la mayor parte de la biosíntesis de las micotoxinas (Kristensen et al, 2012) las cuales se han desarrollado siendo conocidas como genes pertinentes, estos microarreglos llevan oligonucleótidos de micotoxinas (FBS, AFS, OTA, tricotecenos A y B). Por otra parte utilizando cluster de biosíntesis de tricotecenos ayudaron en la producción de *Fusarium sporotrichioides* (tipo A) y *Gibberella zeae* (tipo B, teleomorfo de *F.graminearum*). En la utilización de los clusters de AF, llevan oligonucleótidos específicos para *Aspergillus flavus* y para OTA, siendo específicos para la producción de *Penicillium*, el cluster de FB es específico para *G.moniliformis* (teleomorfo de *F. verticillioides*) y los genes de patulina las cuales se han obtenido por *Penicillium expansum*. Los microarreglos están diseñados para identificar al instante los genes que pueden añadirse fácilmente en cualquier momento de la identificación, este método fue utilizado para detectar la activación de todos los genes bajo condiciones propicias para la biosíntesis de las micotoxinas. Los resultados obtenidos fueron señales que eran específicas bajo condiciones usadas y produciendo insignificantes hibridaciones. Por tanto el microarreglo fue utilizado para demostrar diferencias en las vías de micotoxinas y expresiones de genes después del crecimiento en diversos medios de comunicación por tricótecos y biosíntesis de OTA. Además fue utilizado para estudiar y comparar la cinética de expresión de la biosíntesis de los genes de diferentes tricótecos de *Fusarium* en apoyo a los medios de comunicación teniendo un patrón de expresión indicativo para la biosíntesis de tricótecos siendo identificado (Schmindt y Geisen, 2007).

Se probó un método con la finalidad de evaluar la eficacia de un producto para la determinación multi-micotoxinas, que es un producto basado en carbono/alumino-silicato que se usa para simular las condiciones del tracto gastrointestinal *in vivo* de la especie porcina, la cual fue utilizada para estudiar la absorción y la actividad intestinal de varias micotoxinas utilizando Q/FIS (productos basados en carbón y aluminosilicatos) para reducir la absorción de micotoxinas cuando se agregan a dietas contaminadas por varias micotoxinas. Teniendo como resultados que las micotoxinas fueron absorbidas rápidamente en la parte proximal del intestino delgado en niveles de 105 y 89% para FB1y B2, respectivamente, el 87% de OTA, 74% de DON, 44% para AFB1 y 25% para ZEA. La adición de estándar de Q/FIS a la dieta (para arriba al 2%, w/w) redujo significativamente la absorción de micotoxinas, dependiente de la dosis de hasta 88% por AFB1, 44% para la ZEA y 29% para el las FBS y OTA. El estándar Q/FIS fue incapaz de reducir la absorción de DON. Los resultados obtenidos sugirieron que en la norma se puede especificar que el Q/FIS puede utilizarse como un material adsorbente de multitoxinas para evitar los efectos adversos individuales y combinados de las micotoxinas en animales (Avantaggiato et al, 2012).

Tras el desarrollo de polímeros como materiales específicos para la AFB1 y OTA se utilizó una herramienta como sensor a la cual llamaron “ToxiQuant T1”. Para lo cual fue necesaria la utilización de dos polímeros los cuales fueron diseñados computacionalmente con afinidad para las mencionadas toxinas en lo cual su aplicación fue en dicho sistema. Para la cuantificación el instrumento “ToxiQuant T1” está compuesto de un análisis fluorimétrico de micotoxinas adsorbidas en el polímero después de la exposición a la luz UV, mostrando alta afinidad de las resinas que permitió la adsorción de ambas toxinas como bandas discretas en la parte superior del cartucho con límite de detección tan bajo como 1 ng/kg de cantidad de micotoxinas (Piletska et al, 2012).

En resumen...

Este apartado muestra diferentes mecanismos que se han estado desarrollando para determinar OTA. Se pueden mencionar, el desarrollo de un chip con detector electroquímico, nanotubos de carbono, microarreglos, un cartucho que adsorbe OTA y luego puede cuantificarse fluorométricamente. Se incluye el desarrollo de un microchip con anticuerpos *in situ* para la determinación de OTA por electroforesis capilar. Se estudió la absorción y actividad de la OTA en cerdos, para investigar productos que alteren la absorción de la micotoxina cuando dicho animal consume alimentos contaminados.

7.7. MODIFICACIONES A LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MEDIR LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A.

Se realizó el análisis del efecto de los factores nutricionales sobre la biosíntesis de la policétido sintasa y la expresión de genes de OTA y OTB en *Aspergillus ochraceus*. Para ello se evaluó el efecto de una amplia variedad de factores bióticos nutricionales en la producción de OTA y la biosíntesis de OTB en *A. ochraceus*. Las diferentes fuentes de carbono incluyendo glucosa, sacarosa, maltosa, galactosa, xilosa y glicerol ayudan a reprimir la producción de OTA cuando el hongo se cultivó en medio PDY. La lactosa indujo la producción de OTA, con la adición de galactosa al medio de PDC resultó en un notable incremento de los niveles de OTA. Por otra parte, la adición de lactosa a los medios de MCB y PDY aumentó considerablemente la producción OTB. Por tanto la adición de sacarosa y galactosa a MCB tiene efectos similares, pero también diferentes fuentes de nitrógeno afectan a la producción de OTA como el cloruro de amonio que hace que se reduzca significativamente la producción de OTA, mientras que fuentes de nitrógeno orgánico tales como urea y aminoácidos (fenilalanina, lisina, glutamina y prolina) inducen la producción de OTA. Los resultados sobre la inducción de la expresión génica “otapksAo” bajo estas condiciones se correlacionó con los niveles de OTA producidos en las mismas condiciones experimentales, lo que sugiere que los efectos observados pueden estar modulados, a nivel de la transcripción génica. Sin embargo, los niveles de OTB producidos en *A. ochraceus* también parecen estar influenciados por estos factores bióticos nutricionales, lo cual parece ser regulada de una manera que es independiente de la expresión génica “otapksAo” (Abbas et al, 2009).

Este trabajo se enfocó al estudio de la influencia de la fuente de nitrógeno y de carbono sobre la producción de OTA *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. tubingensis*, aislados de uvas. Se elaboró un medio basal el cual fue preparado con (0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L KCl). Este medio se suplementó con diferentes fuentes de nitrógeno, tanto inorgánico de 0.3 g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, más 0.2 g/L NH_4NO_3 , y orgánica (histidina, prolina, arginina, fenilalanina, triptófano o tirosina) a dos concentraciones de 0.05 g/L y 0.3 g/L, y diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, maltosa, arabinosa o fructosa) y a tres concentraciones (10 g/L, 50 g/L y 150 g/L). El medio con sacarosa de 18 g/L y glucosa (1 g/L) también fue probado. Después de 10 días de período de incubación a 25°C los niveles más altos de OTA fueron de 44.0 ng/ml, 13.5 ng/ml y 0.49 ng/ml para *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. tubingensis*, respectivamente, obteniéndose en los cultivos que contenían 150 g/L de arabinosa y 0.05 g/L de fenilalanina. El análisis de varianza en los datos mostró que hay diferencias significativas de 0.05 entre los niveles de OTA con respecto a la fuente de carbono en lo cual no se mostró diferencia significativa detectada durante la producción de OTA con respecto a fuente de nitrógeno, aunque el 0.05 g/L de

fenilalanina en general favoreció a la producción de OTA en los tres aislamientos. También se estudió la dinámica de la producción de toxinas en los cultivos de cada aislamiento usando este medio basal suplementado y optimizado con 0.05 g/L de fenilalanina y 150 g/L de arabinosa por un período de 42 días a 25°C. Por otra parte, el nivel máximo de OTA se detectó en el 3er día de incubación en *A. tubingensis* y en el día 35 y 43 de incubación en *A. ochraceus* y *A. carbonarius*, respectivamente. Este fue el primer estudio en el que se definen los medios que se han utilizado para evaluar la influencia de fuentes de carbono y nitrógeno sobre OTA y la producción de aislamientos de especies productoras de OTA, aislados de uva y para analizar la dinámica de la producción de toxinas de estas especies en un medio definido. Este medio fue optimizado para la producción de OTA y se está utilizando en estudios actuales dirigido a estudiar su ruta biosintética (Medina et al, 2008).

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de 18 productos químicos diferentes, que incluían compuestos ácidos (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido acético), compuestos alcalinos (amoníaco, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio), sales (acetato de amonio, bisulfito de sodio, hidrosulfito de sodio, cloruro de sodio, sulfato de sodio) y agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio), en la reducción de OTA y AFS B1, B2, G1 y G2 en pimienta blanca y negra. La OTA y las AFBS se determinaron utilizando HPLC después de la preparación de la muestra con IAC. Casi todos los productos químicos aplicados mostraron un grado significativo de reducción de micotoxinas. La reducción más baja y más alta de la AFB1, que es la más peligrosa, fue de $20.5\% \pm 2.7\%$ utilizando ácido benzoico y $54.5\% \pm 2.7\%$ utilizando hidróxido de sodio. No hubo diferencia significativa entre la pimienta blanca y negra (Jalili et al, 2011).

En resumen...

En los artículos mostrados, aunque son pocos, se muestran cambios en las fuentes de carbono y nitrógeno para medir la producción de OTA por los hongos ocratoxigénicos y así entender cómo y en qué tiempo se produce más rápidamente la micotoxina. Esta información es relevante pues permite implementar medidas de contención. Por otro lado, se presenta el uso de diferentes sustancias para eliminar OTA de la pimienta blanca y negra, mostrando que todos los productos ensayados lograron la reducción de OTA. En este caso sólo faltaría ver que las características organolépticas de la pimienta no se vean alteradas.

7.8. DETERMINACIÓN DE OTA EN BEBIDAS.

Un método simple y preciso ha sido desarrollado para la determinación de la OTA, utilizando una IAC como preparación de muestras, seguido de CL MS/MSMS para la identificación y la cuantificación de muestras de vino. Dichas muestras se diluyeron con una solución que contiene PEG 8000 y carbonato ácido de sodio, que se filtró a través de un filtro de microfibra de vidrio. La OTA se eluyó con metanol-ácido acético (98: 2) y se analizaron por CLMS/MSMS. El promedio de recuperación que se obtuvo de OTA en vinos tintos y blancos eran 95 y 96.7% (enriquecida con OTA con un nivel de 0,05 ng/ml) y la RSD fueron 3.8 y 2.4% respectivamente. El LOD fue de 0.0003 ng/ml sobre la base de la relación señal-ruido en el vino de 3:1. El análisis se realizó en 74 muestras de vinos locales y vinos importados los cuales mostraron niveles de OTA que van desde 0.003-0.82 ng/ml, con una incidencia de contaminación de 92.1% para los vinos tintos, y para los vinos blancos 0.0003 a 0.51 ng/ml, con una incidencia de contaminación de un 77.8%. Concluyendo que las tasas fueron más altas que las reportadas anteriormente para la contaminación de OTA en el vino, debido a la alta sensibilidad de este método. Sin embargo, todas las muestras analizadas en este estudio cumplieron con la normativa europea teniendo así que este método es un instrumento útil para el aseguramiento de calidad de los vinos (Noba et al, 2008).

Se realizó un estudio acerca de la formación de micelas inversas con ácido decanoico como una estrategia más simple para captura de OTA, y su posterior determinación, en muestras de vino. También se estudiaron los parámetros que afectaron la eficiencia de la extracción y concentración. Se encontró que los parámetros más influyentes fueron la concentración de ácido decanoico y el contenido de THF siendo 0.5% y 5%, respectivamente. El procedimiento fue muy robusto de modo que las extracciones no fueron influenciadas por el pH, la naturaleza o la concentración de los componentes en la matriz. Obteniendo recuperaciones de OTA en diferentes tipos de vinos (blancos, rosados y tintos) que se encontraron entre el 85 y el 100%. Los LOD para la OTA, después de utilizar LC -FLD, fueron de 4.5 ng/L en los vinos blancos y rosados y 15 ng/L en los vinos tintos, y los valores que estaban muy por debajo del límite establecido por directivas de la UE para OTA de 2.0 µg /L. Concluyendo que no se requiere un tratamiento previo de limpieza en los extractos de las muestras analizadas. La preparación de la muestra tomó entre 15-20 minutos y se pueden analizar varias muestras, al mismo tiempo utilizando los equipos de laboratorio. La RSD fue alrededor del 5%, y el enfoque desarrollado se aplicó con éxito en la determinación de OTA en diferentes muestras de vino del sur de España, las concentraciones encontradas variaron entre 0.015 y 0.091 µg/L (García et al, 2008).

La OTA, como se ha mencionado, es una micotoxina producida principalmente por especies de *Aspergillus*, que se encuentran comúnmente en los climas cálidos y tropicales. Dicha micotoxina tiene riesgos para la salud humana debido a que es una agente nefrotóxico, teratogénico, inmunotóxica con actividad neurotóxica. La micotoxina, se ha clasificado como posible carcinógeno humano del grupo 2B por la IARC, se produce de forma natural en una amplia variedad de alimentos, incluyendo vino, donde el principal productor es *A. carbonarius* (Abraham y Ernesto, 2009). El objetivo de este trabajo fue realizar la validación de un procedimiento en el análisis de la OTA en vino rojo piamontés y en vino blanco que se produjeron para la venta en el 2003 y 2004, esto en relación con el límite establecido de 2.0 µg/L, establecido por la Unión Europea para el vino, mosto o zumo de la uva que está en el reglamento CE 123/2005 (Alonzo et al, 2008). Para estas determinaciones de OTA en vinos se utilizaron los métodos de IAC y LC-FLD. Teniendo un LOD y LOQ de 7.18 pg/ml y 9.31 pg/ml respectivamente. El promedio de recuperación de la OTA a partir de las muestras de vino se dispararon a niveles de 0.1 a 10 ng/ml y variaron de un 90.8% a 92.4%, con RSD entre 2.64 y 2.71%. Por otra parte, el límite de repetibilidad fue de 8.73 pg/ml para muestras enriquecidas con 0.1 ng/ml de OTA. Para ello se analizaron los vinos rojos, incluyendo 41 Barbera, 38 Dolcetto, y 16 de vino blanco, como *Erbaluce*, *Cortese* y *Roero Arneis*. Este estudio se centró en los vinos comercializados en los supermercados y tiendas de vinos italianos. En el resultado de los vinos blancos se esperaba que estuvieran menos contaminados que los rojos ya que no estaban en una temporada particularmente propicia para el crecimiento de *A. carbonarius* en el 2003, los cuales contenían mayores niveles de OTA que los vinos producidos en 2004. Las muestras resultantes positivas, contenían una concentración de OTA inferior al umbral de los límites establecidos por la Unión Europea teniendo así que la muestra que se encontró con un alto nivel de OTA fue de Dolcetto producido en 2004, con 1.10 ng/ml de micotoxinas (Spadaro et al, 2008).

El té “Pu erh” es un té fermentado chino único, a diferencia de otros tipos de tés que se almacenan por un largo periodo de tiempo. *Aspergillus niger* se afirma que es el hongo contaminante durante en el proceso de fabricación del té “Pu erh” y también de ser común en el té en general, conocido también por producir la OTA, y las FB B2 y B4. Considerando esta problemática, se realizó un estudio preliminar para determinar si la producción de estas micotoxinas eran verdaderamente por *Aspergillus niger* que se aislo del té “Pu erh” y té negro. Por tanto, se realizó un análisis obteniendo 47 aislados de dichos tés demostrando que ninguno de ellos era de esta especie de hongo. Una parte del gen de calmodulina en 17 aislados fue secuenciado y de estos aislados se identificó a *A. acidus* así como en el resto de los 47 aislados. Se concluyó que no hubo producción de OTA, sólo se obtuvieron FB B2 y B 4 en cualquiera de los 47 aislados pudiéndose observar que fueron producidos por *A. acidus* (Mogensen et al, 2009).

El estudio sobre el contenido de OTA en diversos productos para el consumo humano es de gran relevancia a nivel mundial por lo que se realizaron estudios entre diferentes laboratorios para ayudar a la validación de una metodología analítica específica para evaluar la reproducibilidad de la utilización de diferentes métodos de análisis del compuesto en ciertas matrices de muestra. La realización de este trabajo se enfocó a muestras homogéneas de dos vinos blancos ("vino blanco" y "vino de licor blanco") y un vino tinto ("Vino Rojo Generoso") de Portugal con diferentes técnicas y características de producción, es decir, con concentración de alcohol de 10.5%, 16% y 19% respectivamente, fueron analizados por su contenido de OTA, siendo una micotoxina generada a partir de la contaminación fúngica. El vino blanco fue naturalmente contaminado, mientras que el otro tipo de vino se enriqueció con soluciones etanólicas. En total fueron 24 laboratorios de 17 países de que participaron para la realización de este estudio. El 75% de los laboratorios recurrió a IAC como paso inicial de limpieza seguido por HPLC-FLD, teniendo que la norma europea EN 14133, para las muestras de vino blanco, la concentración de OTA media general es de 1.96 µg/L (dos valores extremos) con una desviación estándar inter laboratorio de 0.53 µg/L; para vino blanco la media fue de 1.59 µg/L (un valor atípico) con una desviación de 0.59 µg/L; y para vino tinto una media de 2.73 µg/L (no hay valores atípicos), con una desviación de 0.96 µg/L. Los valores atípicos se determinaron mediante pruebas de Cochran y Grubbs. El índice Horrat, recomendado por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos para el aseguramiento de la calidad del estudio de colaboración fue en promedio, 1.7 µg/L. Este estudio llegó a resultados viables demostrando que la determinación de OTA en los vinos es reproducible, independientemente de la metodología empleada (Ratola et al, 2008).

Otro método por HPLC-FLD fue desarrollado para analizar la OTA en el vino siendo, rápido, sensible, reproducible y de bajo costo. Se caracterizó por inyección directa del vino en el equipo de HPLC, sin necesidad de extracción o de limpieza. Para el método se utilizó acetonitrilo, agua y ácido acético (49:49:2, v/v/v) como fase móvil isocrática y una columna C18 monolítica 5-micras (100 x 3 mm de diámetro interior). La RSDr obtenida en la determinación OTA varió entre 0.22 y 1.76%, con un valor medio de 0.89%, en muestras con concentraciones entre 0,10 y 100 ng/ml. La recuperación de OTA varió de 102% en las muestras adicionadas con OTA 1 ng/ml al 120% en las muestras con OTA 0,10 ng/ml. El método se comparó favorablemente con un método publicado sobre la base de una IAC y un ensayo de cromatografía con una columna de HPLC convencional C18 (Tafari, 2008).

En el siguiente estudio se evalúan diferentes materiales adsorbtivos para eliminar la OTA del vino, tales como nonilamonio bentonita, dodecilamonio bentonita, FCE-montmorillonita, y el quitosano. En donde las condiciones óptimas de adsorción de OTA en soluciones creadas exprofeso con OTA fueron evaluadas a temperatura ambiente y pH 3.5. Los equilibrios de la adsorción de bentonita y nonil amonio se

alcanzaron dentro de 120 y 240 minutos respectivamente. Dodecilamonio B, FCE, y quitosano requirieron aproximadamente 90 minutos de tiempo para alcanzar el equilibrio. Obteniendo eficiencia en la adsorción con la solución sintética de OTA que no cambió notablemente cuando las cantidades de los adsorbentes fueron de 25 mg de bentonita, Dodecilamonio B, y FCE y 100 mg de Nonil y quitosano. En los ensayos anteriores se habían usado 25 mg de adsorbentes. La isoterma de adsorción se ajustó a la ecuación de Freundlich con respecto a los coeficientes de correlación. Los datos de adsorción se evaluaron utilizando ecuaciones de Langmuir y Freundlich que tienen valores de K_f que van desde 0.011 hasta 9,5 con respecto a los coeficientes de correlación de 0.900 a 0.977. Por tanto, Dodecilamonio B y FCE tienen la mayor capacidad de adsorción de OTA de las soluciones sintéticas. Por otra parte, en el vino la eliminación de OTA sucedió en un porcentaje de 60 a 100 cuando se usó FCE y quitosano (fungicida). Además, la capacidad de adsorción más alta de OTA para el vino tinto se obtuvo mediante el uso de 250 mg de FCE, lo que causó menos daño a la naturaleza del vino y también baja adsorción de los polifenoles y antocianinas (Kurtbay et al, 2008).

Este trabajo propone una nueva estrategia para mejorar la selectividad y la sensibilidad de la CE, utilizando una membrana líquida soportada (SLM) y SPE off-line de manera simultánea, para determinar OTA en vino. En la etapa de SLM, se utilizó un volumen de 20 mL de una solución estándar a pH 1 y una muestra de vino a pH 8 que se colocaron en un vial, donde la unidad de extracción que es una micro membrana que acomoda una fase sólida y que contiene 1 mL de agua, a un pH 11 sumergido en su volumen. La SLM fue construida por impregnación de una membrana porosa de PTFE con un disolvente orgánico inmiscible en agua (octanol). Por otra parte, para la SPE se usa un cartucho de 4 mg de C-18 que retiene selectivamente a la ocratoxina y permite introducir pequeños volúmenes de 1 mL. En el proceso, los analitos capturados se eluyeron en un pequeño volumen de metanol de 0.1 mL. Dicho procedimiento dio como resultado la limpieza de la muestra y una mayor concentración: se evaluaron la exactitud y la precisión para OTA, teniendo un RSD del 5% y los LOD tanto en las soluciones patrón y las muestras de vino de 0.5 y 30 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Los resultados obtenidos y concluidos demuestran que SLM combinado con SPE sería una buena alternativa a la utilización de IAC antes del análisis por CE (Almeda et al, 2008).

Se desarrolló un inmunoensayo con fluoresceína en un anticuerpo monoclonal y para OTA para detectar de manera rápida la micotoxina en vino tinto. Las muestras de vino se diluyeron con metanol y se pasaron por unas columnas de extracción en fase sólida con aminopropil antes del ensayo FP. El promedio que se obtuvo de recuperación de las muestras inoculadas con OTA fue de 2.0 y 5.0 ng/ml, lo cual significa un 79% de recuperación con RDS de 11% para un número de 6 muestras. El LOD del inmunoensayo FP fue de 0.7 ng/ml de la misma, y todo el análisis se realizó en menos de 10 min. El ensayo se probó en 154 muestras de vino tinto las cuales se contaminaron naturalmente con niveles que van de 0,1 a

5.0 ng/ml y se comparó con HPLC-IAC, mostrando una buena correlación. Por tanto se cumplió con la normativa europea que dice que el vino debe contener un nivel máximo 2.0 ng/ml de OTA. Se evaluó correctamente el 70% de las muestras analizadas de vino tinto, mientras se requirieron análisis confirmatorios para las muestras restantes porque los niveles de OTA estaban cerca del límite del reglamentario. Sin falsos negativos o positivos se pudieron observar resultados usando el inmunoensayo FP. Como conclusión, el inmunoensayo FP es un útil como método de detección de la OTA en los vinos tintos, y también podría ser utilizado para analizar los vinos blancos y rosados, de los que se sabe que contienen menos compuestos que interfieren como los polifenoles (Zezza et al, 2009).

Se analizaron algunos efectos de la OTA presente en el vino tinto sobre la toxicidad intestinal de células Caco-2/TC7. Como se sabe, OTA se encuentra en una variedad de alimentos y bebidas, incluyendo vinos; se sabe que es nefrotóxica, inmunotóxica, hepatotóxica y un carcinógeno potencial, con mecanismos aún no caracterizados (Abraham y Ernesto, 2009). El consumo de vinos contaminados podría aportar hasta el 13% de la ingesta diaria humana. La exposición crónica ha aumentado la preocupación como problema de salud pública debido a la presencia y toxicidad de OTA en vino por lo que se investigó en células intestinales humanas Caco-2/TC7, que se, diferenciaron sobre soportes de filtro, y se midió la unión y permeabilidad, las alteraciones morfológicas y la ocurrencia de apoptosis. Las células fueron tratadas con OTA, en presencia de vino tinto, durante 48 hrs y se evaluó la capacidad de recuperarse de los efectos de OTA a las 24hrs en medio completo. El tratamiento con OTA aumentó las proteínas TJ y la permeabilidad, causando la redistribución intracelular de claudin-4. Sin embargo, las células fueron capaces de restaurar la permeabilidad y la correcta localización de claudin-4 obteniendo la recuperación a las 24hrs. Por el contrario, en presencia de vino tinto, OTA produce más rápido un aumento irreversible en la permeabilidad, deslocalización intracelular de claudin-4 y extensa apoptosis. Se concluyó que los resultados apuntan a una posible sinergia entre los componentes de la OTA y algo de vino tinto, como los polifenoles, en la inducción de la muerte celular apoptótica (Ranaldi et al, 2009).

Científicos realizaron una evaluación de la incidencia de hongos productores de OTA en jugo de naranja, mediante una prueba con la micotoxina. Se realizó la evaluación con cepas de *Aspergillus westerdijkiae* como sistema modelo. El hongo se dejó crecer en las superficies de naranjas y se midió la producción de OTA en el jugo a dos temperaturas: 26°C y 20°C. Se observó una mayor influencia a 26°C que a 20°C en la que se inhibía la producción de la toxina. A una temperatura más baja, 4°C, no se observó crecimiento, llegando a la conclusión que el crecimiento de OTA en las naranjas es a temperaturas de más de 26°C (Marino et al, 2009).

Se desarrolló un método simple y exacto para la determinación de OTA en bebidas de café preparado, mediante limpieza con IAC y LC/MS/MS, esto para la

identificación y la cuantificación de la micotoxina. Analizando un total de 30 muestras comerciales disponibles en Japón; la OTA fue detectada en todas las con concentraciones que van desde niveles de trazas (0.0020-0.010 ng/mL) a 0.037 ng/mL. Se usó OTA estándar para medir la recuperación del método siendo del 97.3%. Se demostró que el método se puede utilizar para evaluar con precisión la ingesta de OTA del café bebible y la cantidad de OTA para una persona que consume el producto (Noba et al, 2009).

Se sabe que micotoxinas tales como OTA y las AFS, contaminan naturalmente el jengibre en polvo que se usa en la elaboración del té. Dichas toxinas se encuentran comúnmente en los granos de cereales y son tóxicas, cancerígenas y termoestables (Abraham y Ernesto, 2009). La raíz del jengibre es ampliamente usada para los problemas digestivos, encontrándose en el polvo AFS y OTA. El té de jengibre se colocó en una bolsa y se termosello; posteriormente, se usó para preparar el té en diferentes condiciones y temperaturas de 50 y 100°C, en un tiempo de 5 y 10 min con volúmenes de 100 y 200 mL. Posteriormente la bolsa de té se colocó en agua caliente y se agitó cada minuto durante 5s esto durante los primeros 5 minutos de remojo. Después de ello, la bolsa de té se eliminó y el residuo de té de jengibre se analizó por separado para AFS y OTA por IAC, después fueron aisladas y separadas a 100°C por LC y cuantificadas mediante FLD, de las cuales aproximadamente el 30 y 40% de AFT y el 20 y 30% de la OTA fueron encontrados como contaminación en el té de jengibre las cantidades totales de AFT y OTA en el té variaron menos del 5% bajo las tres condiciones de preparación a 50 °C, y aproximadamente el 10% de la OTA y AFT se encontraron en el té. Este es el primer estudio sobre la migración de AFT en té, también es el primero en estudiar la distribución de AFT y OTA de jengibre en polvo para té y residuos de jengibre (Iha y Trucksess, 2010).

El siguiente trabajo tuvo como objetivo evaluar el contenido OTA en los restos de la uva durante el proceso de elaboración del vino tinto en una vinificación a escala piloto. El estudio se realizó utilizando los mostos obtenidos de dos variedades de uva denominados “Bonarda” y “Tempranillo” contaminados artificialmente con dos niveles de OTA. Se establecieron dos tanques, por duplicado, de 100 L para cada una de las variedades. Las fermentaciones fueron iniciadas por inoculación de dos cepas de *Saccharomyces spp.* que tienen un rendimiento diferente a la fermentación. Al mosto de la variedad “Tempranillo”, se añadieron 6 µg/L de la OTA, mientras que a la variedad “Bonarda” se le añadió 0.3 µg/L de la toxina. Dichas muestras se recogieron en diferentes etapas del proceso, controlando el rendimiento de las fermentaciones alcohólicas y maloláctica. Se obtuvieron concentraciones valorables así como la acidez, pH, etanol, azúcar y SO₂ que se determinaron siguiendo los métodos estándar propuestos por la Oficina Internacional de Viñedos y el Vino. El Análisis de OTA se realizó por HPLC, obteniendo límites de detección y cuantificación de 0.01 y 0.1 ng/ml, respectivamente. Se concluyó que los niveles de OTA en el proceso de vinificación

se redujeron en un promedio de alrededor del 86.5%. Por otra parte el tipo de cepas de *Saccharomyces* utilizados no mostró ningún efecto sobre la reducción de la toxina (Ponsone et al, 2010).

Este trabajo describe el desarrollo y caracterización de un método electroquímico mediante voltamperometría de onda cuadrada en combinación con el uso de nanopartículas magnéticas modificadas, que habían mostrado ser útiles en la determinación rápida y sensible de OTA en la uva de vino. Las uvas de vino fueron inoculados con *Aspergillus ochraceus* para infectar artificialmente con la OTA, dicha micotoxina se determinó directamente mediante SWV, donde la corriente obtenida es directamente proporcional a la concentración de OTA la cual se encuentra presente en las muestras. Este método se ha utilizado para la determinación de OTA en las uvas de vino y se validó contra de un kit de prueba de ELISA comercial. Obteniendo LOD calculados para la detección electroquímica y la ELISA, de 0.02 y 1.9 µg/kg, respectivamente; por otra parte, los coeficientes de variación para exactitud y precisión estaba por debajo de 5.5%. Se concluye que este método promete ser adecuado para la detección y cuantificación de OTA en las frutas aparentemente sanas después de la cosecha para cerciorar la seguridad y calidad de los alimentos, así como la salud del consumidor (Fernández, 2010).

Se utilizó el método desarrollado mediante HPLC-FLD para la cuantificación simultánea de OTA y sus análogos OTB, OTC y MeOTA, en el vino tinto a nivel de trazas (Tafari, 2008). Antes del análisis por dicho método, las ocratoxinas se extrajeron y se purificaron por IAC a partir de 50 mL de vino tinto a un pH de 7.2. La validación del método analítico se basó en parámetros tales como: la selectividad, linealidad, precisión, robustez, LOD y LOQ, así mismo el recobro y la estabilidad. Obteniendo como LOD en el vino tinto concentraciones de 0,16ng/L (OTA), 0.32ng/L (OTB), 0.27ng/L (MeOTA) y 0.17ng/ (OTC); el LOQ establecido fue de 0.50ng/L para todas las ocratoxinas. Estos límites obtenidos son los más bajos encontrados para la OTA en la literatura de referencia hasta el momento. Los valores de recobro fueron 93.5, 81.7, 76.0 y 73.4% para la OTA, OTB, MeOTA y OTC, respectivamente. Por primera vez, este método fue validado y permitió la investigación de una coocurrencia de ocratoxinas A, B, C y MeOT A en 20 muestras de vinos tintos de España (Ramiro et al, 2010).

La presencia natural de OTA y resveratroles cis y trans en los vinos tintos se ha documentado ampliamente. El objetivo de este trabajo fue evaluar a OTA y el contenido cis y trans-resveratrol del vino tinto a partir de mosto de vino de un proceso de vinificación a escala piloto en Calabria (Italia). Se tomaron 11 muestras en diferentes etapas de la vinificación y el análisis se llevó a cabo por HPLC. El vino de fábrica contenía trans-resveratrol con 3.41 mg/L. Por lo cual este vino se caracterizó por una variedad de uva Aglianico-Magliocco. Los datos relativos de OTA mostraron que el valor de este contaminante fue bajo en todas las muestras analizadas y, en cada caso, por debajo del límite legal considerado de 2.0 mg/L.

En general, los resultados demostraron la gran calidad de los vinos producidos en Calabria (Loizzo et al, 2011).

La toxigenicidad de especies de *Aspergillus* que producen OTA en suelos y viñedos por infección en los racimos de uvas se investigó en Australia mediante la obtención de aislados de *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*. Las evaluaciones mostraron que *A. niger* se encuentra más frecuentemente que *A. carbonarius*. Tres de los 113 aislados correspondieron a *A. niger* y 33 a *A. carbonarius*. Por otra parte se inoculó *A. carbonarius* en un racimo, lo cual no produce daño alguno durante el mes antes de la cosecha; los granos dañados obtenidos durante la cosecha fueron particularmente susceptibles a putrefacción y producción de OTA por *Aspergillus*, la toxina se concentró en las bayas. La OTA en Australia se encontró principalmente en las bayas o racimos de uvas infectadas por *A. carbonarius*. Por otra parte el potencial de *Aspergillus* para ocasionar pudrición y producción de OTA se observa a partir del aumento del daño a las bayas y de su madurez. Se encontró que para evitar la contaminación era necesario minimizar el daño al racimo de uvas durante la cosecha lo cual reduce significativamente la pudrición por *Aspergillus* así como la vigilancia en el grado de concentración en los racimos infectados con cepas toxigénicas de *Aspergillus* (Leong et al, 2012).

En resumen...

La mayor parte de las bebidas aquí mencionadas se refieren a los vinos, de todas las regiones de España, Italia, Portugal, y Australia. Los estudios realizados incluyen la identificación del hongo ocratoxigénico, el lugar de la contaminación en la vid que produce OTA en las uvas, así como la propuesta de introducir modificaciones en los métodos de aislamiento de la toxina para un mejor análisis para el control de calidad. Hay que recordar la importancia de la industria vitivinícola para los países arriba mencionados. Los vinos analizados incluyen tintos y blancos así como el mosto de las uvas. Los análisis se realizan generalmente por IAC seguidos por HPLC con FLD principalmente. Se proponen nuevos métodos de preparación de la muestra como es la inyección directa del vino y la formación de micelas inversas con ácido decanoico y THF. Se propone el uso de materiales adsorbtivos que faciliten la eliminación de OTA de vinos contaminados, sin que se alteren las características organolépticas del vino. Llama la atención un estudio sobre la toxicidad de OTA en células Caco-2/TC7 intestinales, ya que se encuentra que existe una acción sinérgica entre la OTA y el vino. Por otro lado, también se analiza la presencia de OTA en té y café bebible, utilizando HPLC-FLD. Se proponen otros métodos de ensayo como es un inmunoensayo, un método electroquímico y un método por electroforesis capilar. Se sigue encontrando que la población está expuesta a OTA a través del consumo de las bebidas mencionadas en este apartado.

7.9. DETERMINACIÓN DE OTA MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Los microarreglos son un método de análisis de ADN usado para detectar e identificar especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos y moniliformina así como de OTA; el método también podría diferenciar entre especies de cuatro grupos. En lo cual las sondas de captura fueron diseñadas basándose en recientes análisis de alfa filogenéticos de alargamiento de secuencias (TEF-1alfa). Se puso énfasis especial en el diseño de sondas de captura correspondiente a los grupos o especies ocratoxigénicas particulares. Un consenso de amplificación por PCR de una parte de TEF 1 alfa es seguido por la hibridación con el chip de *Fusarium* y los resultados son visualizados por un método colorimétrico de detección de cuantificación y validación en el chip de *Fusarium* contra cinco muestras de cereales infectadas para la obtención de datos morfológicos y datos químicos. Por tanto el límite de detección se estimaba en menos de 16 copias de ADN genómico en harina de trigo comercial. Así los investigadores llegaron a la conclusión que el actual chip de *Fusarium* demostró ser un microarreglo altamente sensible, el cual es rápido para la detección e identificación de las especies de *Fusarium*. El impacto en estudio de microarreglos puede llegar a ser una herramienta muy valiosa para la detección de *Fusarium* en muestras de cereales de la cadena de producción en alimentos y por lo cual pudo facilitar su detección de *Fusarium spp* (Kristensen et al, 2007).

Con el objeto de mejorar la detección temprana de *Aspergillus carbonarius* y *A. niger* en la uva de mesa, ya que son los hongos que principalmente las contaminan, se propuso la creación de un método molecular simple y rápido para la detección temprana de ambos hongos en las uvas de mesa. Estos hongos, además de su capacidad para causar la putrefacción de la fruta también pueden producir la OTA, micotoxina que ha atraído cada vez más la atención en todo el mundo. Ensayos basados en PCR fueron desarrollados usando iniciadores específicos basados en secuencias de las polietileno sintetasas de *A. carbonarius* y *A. niger* que recientemente han demostrado que participan en la biosíntesis de OTA. Se obtuvieron tres variedades de uva de mesa (globo rojo, Crimsone sin semillas e Italia) que fueron inoculadas con las cepas de los hongos mencionados. El ADN extraído del control (no inoculado) y de las uvas inoculadas, se amplificó por PCR usando ACPKS2F-ACPKS2R para *A. carbonarius* y ANPKS5-ANPKS6 para *A. niger*. Ambos iniciadores permitieron una detección clara, incluso en muestras asintomáticas. Los métodos basados en la PCR se consideran como una buena alternativa a los métodos tradicionales de diagnóstico para la detección temprana de los hongos en matrices complejas por su alta especificidad y sensibilidad. Los resultados pueden ser útiles para la definición de un "sello de calidad" para las uvas y así mejorar las medidas de seguridad adoptadas para garantizar la producción de uvas de mesa (Ayoub et al, 2010).

Basándose en la secuencia del gen de poli péptido sintasa de la OTA se desarrolló un sistema por PCR para la detección específica de *Penicillium verrucosum* en el trigo. Se analizó en un sistema de PCR en tiempo real que se ha aplicado para determinar la cinética del crecimiento del hongo en el trigo con un número de células por encima de 10³ ufc/ml. Los datos que se obtuvieron por PCR en tiempo real se correlacionaron con los datos obtenidos por la técnica de recuento en la placa. Para ello el ADN se aisló directamente del trigo contaminado sin ninguna etapa de enriquecimiento adicional. Por otra parte en la transcriptasa inversa de PCR en tiempo real, se detectó la expresión del gen “otapksPV” en el trigo, esto se dio a los 22 días después de la inoculación y almacenamiento a temperatura ambiente. Concluyendo que las cantidades razonables de OTA, no podrían ser detectadas antes del día 30, la activación temprana de los genes relacionados con la OTA fue confirmada por el análisis de microarreglos (Schmidt et al, 2008).

En diciembre del 2011 se analizaron granos cebada mediante un método basado en PCR, demostrando que había contaminación de la cebada por micotoxinas. Se mostró que esta presencia influía en la calidad y ocasionaba pérdidas nutricionales lo que representa un peligro considerable para la cadena alimenticia con la presencia de AF y OTA. En España se realizaron estudios de PCR específicos para la detección de especies fúngicas en cebada, detectándose especies de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* y *A. niger* a distintos tiempos de incubación (0, 1 y 2 días). También se utilizaron varias técnicas en diferentes medios de cultivo para la evaluación de *Aspergillus* (*flavus*, *circumdati* y *niger*). Anteriormente se habían recogido 105 muestras de granos, entre el 2008 y el 2010, que se analizaron usando un método previamente optimizado con una extracción acelerada con disolventes en la IAC, y una separación por CL, derivatización post-columna con yodo y con detección por FLD (Pozzo et al, 2010), obteniendo como resultado 29 muestras con contaminación con al menos una de las micotoxinas estudiadas. AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, y OTA se detectaron en 12.4%, 2.9%, 4.8%, 2.9%, y 20% de las muestras, respectivamente. Las AFS y OTA se produjeron en un 4,8% de las muestras. Los niveles máximos de micotoxinas (ng/ g) fueron 0.61 (AFB1), 0.06 (AFB2), 0.26 (AFG1), 0.05 (AFG2), y 2.0 OTA. Los resultados de los ensayos de PCR indicaron la presencia de todas las especies estudiadas, excepto *A. westerdijkiae*. Dichos resultados mostraron altos niveles de contaminación natural de la cebada con las especies estudiadas de *Aspergillus* que no corresponden con el número esperado de UFC/g en los cultivos. Estos resultados sugieren que puede existir un alto número de esporas no viables o hifas en las muestras. En conclusión este es el primer estudio llevado a cabo en los niveles de AF y OTA en granos de cebada en España. Del mismo modo, este es el primer reporte de la presencia aflatoxigénica y ocratoxigénica por *Aspergillus spp* en granos de cebada naturalmente contaminados utilizando un enfoque de PCR específico para su especie (Mateo et al, 2011).

Como se ha mencionado la especie de *Aspergillus carbonarius* es responsable de la producción de OTA que se acumula en las uvas para vino, y por lo tanto se investigan cada vez más métodos para su detección más rápida y sensible. En esta investigación se utilizó un nuevo procedimiento por PCR en tiempo real (RTI-PCR) para la detección y cuantificación de la especie del hongo. El procedimiento incluye el uso de “Pulsifier” un equipo para eliminar conidios a partir de uvas que impide la liberación de inhibidores en la PCR; la extracción de ADN se realizó con el kit de ADN fúngico EZNA. Con este equipo se redujo el tiempo para la extracción de ADN de *A. carbonarius* de la uva a 30 min. Para ello se utilizaron dos iniciadores específicos AcKS10L/AcKS10R que delimitó un fragmento de 161 pb, y una sonda especial que se diseñó dirigida al dominio de β -cetosa sintasa de un polipéptido sintasa de *A. carbonarius*. Por tanto la especificidad fue confirmada con pruebas de iniciadores hacia el ADN purificado de 52 cepas de hongos, incluyendo el de referencia y aislados de alimentos. La cuantificación lineal se obtuvo en ambas diluciones seriadas de ADN purificado y suspensiones de conidios calibrados de *A. carbonarius*. Para ello, utilizando el “SYBR-Green I” y “TaqMan” se mostró que los enfoques RTI-PCR establecidos fueron capaces de detectar al menos 2.4 y 24 genomas equivalentes, respectivamente, usando el ADN purificado. Los resultados obtenidos de la suspensión conidial después de la extracción de ADN, mostraron que al menos 5 conidios por reacción deberían estar presentes para un resultado positivo con “SYBR-Green I” y 50 en el caso de “TaqMan”. Concluyen que la cuantificación del ADN genómico de hongos en el vino inoculado artificialmente en uvas se realizó con éxito, con un umbral mínimo de 10 conidios/ML para una cuantificación precisa. El ensayo con RTI-PCR desarrollado fue una herramienta que prometió conocer el riesgo ocratoxigénico, e incluso el bajo nivel de infecciones, mostrando ser adecuado para un análisis rápido y automatizado de alto rendimiento (Selma et al, 2008).

Los hongos *Aspergillus ochraceus* y *A. westerdijkiae* se consideran como los más importantes productores de OTA que contaminan los alimentos y bebidas para el consumo humano. En este estudio se utilizó PCR en tiempo real para detectar ambas especies mediante el uso de SYBR Green e iniciadores diseñados para región ITS1 del ADNr (Dachoupan et al, 2009). El ensayo tuvo una eficiencia de 94% y no mostró inhibición. El límite inferior de detección del ADN fue de 2.5 pg/reacción. La precisión de la detección y cuantificación de PCR fueron probados con el ADN genómico obtenido de los granos de café verdes y uvas artificialmente contaminadas con suspensiones de esporas de concentraciones conocidas. Dichas concentraciones fueron superior de 6-10 esporas/ml lo que se pudo detectar por el ensayo directamente sin incubación previa de las muestras y una relación positiva observándose entre el tiempo de incubación y los valores de qPCR. Por lo tanto el ensayo desarrollado permitió una rápida, detección y cuantificación de *A. ochraceus* específica, precisa y sensible para *A. westerdijkiae* para usarse directamente en un punto crítico de la cadena alimentaria, antes de la

cosecha de café y uvas verdes, para predecir y controlar el crecimiento de hongos y la producción de OTA (Gil et al, 2009).

Otra investigación para la detección simultánea de micotoxinas reporta el utilizar una reacción de PCR dúplex en tiempo real para la detección de *Aspergillus niger* y *A. carbonarius*, que son las principales especies responsables de la producción de OTA en las uvas (Ayoub et al, 2010). Esta reacción solo se dirige a la beta-cetosa sintasa y a los dominios de la transferasa de acilo de la polipeptido sintasa de *A. carbonarius* y el *A. niger*, respectivamente. El análisis de la curva de fusión utilizando un "SYBR Green" en el enfoque de PCR en tiempo real, muestra valores de amplificación específica, eficiente y equilibrada de los dos fragmentos de PCR. Posteriormente la sonda fue colocada para un PCR en tiempo real "TaqMan", utilizando la enzima de Grupo 6-carboxi-fluoresceína (FAM) y CIV marcado con sondas específicas para su detección automatizada. Los resultados indicaron diferencias en la sensibilidad cuando se utilizan dos conjuntos de iniciadores y sondas por separado en la misma reacción. Sin embargo, cuando ambos objetivos están en cantidades diferentes, hay una amplificación preferencial del objetivo que se encuentra en mayor concentración. Los valores obtenidos de la presencia de ADN de la uva fueron muy similares a los observados cuando sólo fue purificado estando presente el ADN fúngico, lo que indica que el ADN de uva no interfiere en el tiempo real con la PCR. Este procedimiento proporcionó una herramienta rápida y precisa para controlar una reacción única en la presencia de especies que producen la OTA en uvas, que en cierta medida, facilitó estudios de la contaminación para garantizar la seguridad alimentaria en la industria para la elaboración del vino (Selma et al, 2009).

Cuando se habla de una contaminación agroalimentaria por OTA se habla de un riesgo para la salud humana y animal, por lo tanto, los límites máximos se establecieron por las autoridades de seguridad alimentaria. La reducción de la contaminación por OTA puede lograrse mediante la detección temprana de las especies de hongos que la producen. Se realizó la detección rápida, sensible y específica así como la cuantificación por PCR en lo cual la especie de *Aspergillus carbonarius* fue una de las más importantes especies en la producción de OTA, particularmente en las uvas y derivados de las regiones mediterráneas. El análisis por PCR cuantitativo usando "SYBR" y "TaqMan" se desarrollaron para la detección específica de la especie (Selma et al, 2008). La sonda "TaqMan" se basó en la región MultiCopia transcrita interna 2 (2° secuencia interna del gen del rRNA). La especificidad y la sensibilidad de ambos ensayos fueron probados en las mezclas de ADN genómicas de varias cepas de *A. carbonarius* y otras especies fúngicas presentan con frecuencia en las uvas. Ambos métodos también fueron comparados usando uvas inoculadas con diferentes concentraciones de esporas de *A. carbonarius*, por tanto la detección de ADN fue de hasta 0.4 pg/g en los racimos de uvas. Teniendo que la eficiencia y la sensibilidad de ambos

métodos fueron comparables, solamente, en el menor costo de “SYBR Green” que puede favorecer su uso en ensayos de rutina (Salgado et al, 2009).

En el siguiente trabajo se realizó una investigación sobre una nueva especie de *Aspergillus* productora de OTA, que se obtuvo recientemente de hojas en descomposición sumergidas en la ribera en Italia. Las especies se describieron morfológicamente como *Aspergillus affinis* y *Aspergillus cretensis*. Sin embargo, se encontraron diferencias marcadas entre estos dos aislados con características distintas en las colonias que mostraron tener vesículas más grandes, fiálides y conidios, así como una forma de esclerocios distinta por lo que se requería determinar el grupo taxonómico y así inferir las relaciones evolutivas de estas dos cepas morfológicamente idénticas, para ello se realizó un análisis filogenético molecular en todos los linajes reconocidos oficialmente en la sección circumdati. Se analizaron las secuencias de ADN y los residuos de aminoácidos deducidos a partir de la evaluación de ambos genes de ARN y proteínas ribosomales, que son ampliamente utilizadas para diferenciar los taxones que pertenecen al género *Aspergillus* en varios niveles evolutivos. Se obtuvo la amplificación por PCR del gen 5.8S RNA y de los espaciadores transcritos internos (ITS), así como los dominios D1/D2 del gen 28S RNA, una región del gen de la cadena beta tubulina (benA) y parte del gen calmodulina (CMD) y luego fueron secuenciados. El análisis de las regiones de ARN ribosomal y de la benA y datos de la secuencia CMD indican que estos dos aislados isogénicos pertenecen genéticamente a especies distintas de *Aspergillus* productoras de OTA, descritos como *Aspergillus affinis* e identificadas como (ATCC MYA-4773 (T) = CBS 129190 (T)); filogenéticamente. *A. affinis* parece estar estrechamente relacionada con *A. cretensis*, de la que se pueden distinguir por medio de un análisis de rasgo morfológico (Davalos et al, 2011).

En resumen...

Este último apartado incluye artículos que utilizan un abordaje de la problemática completamente distinto. En este caso se busca identificar y determinar la presencia de los hongos ocratoxigénicos antes de que se propaguen y produzcan daños en los cultivos que se traduzcan en la producción de OTA en los frutos. Las técnicas de biología molecular son sensibles y requieren de muy pocas células para poder indentificar microorganismos hasta nivel de subespecie, lo que permitiría implemetar pronto mecanismos de contención de la contaminación. En los artículos aquí incluidos se enfocan principalmente a uvas y café, por su importancia económica.

7.10. CONCENTRACIONES MAXIMAS PERMITIDAS PARA LA OCRATOXINA A EN PRODUCTOS ELABORADOS.

A lo largo de esta revisión se ha visto que es prácticamente imposible eliminar OTA de los alimentos que se consumen; sin embargo, es posible regular la presencia de la micotoxina en los alimentos así como recomendar una ingesta diaria que impida se presenten daños en la salud de los consumidores. La ingesta diaria de OTA en alimentos contaminados para el humano se encuentra entre 0.7 y 4.5 ng/kg de peso corporal. La ocurrencia de esta micotoxina se asocia con las condiciones climáticas y sobre todo con la cosecha y la poscosecha del grano por lo que las concentraciones se encuentran en 50 µg/kg o más dependiendo del tipo de almacenamiento que tengan los productos y las condiciones del mismo. En la siguiente tabla se muestran los límites máximos permitidos y establecidos por la U.E y E.U para algunos alimentos.

TABLA 1.2.- LIMITES DE CONCENTRACION MAXIMA DE OCRATOXINA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS ESTABLECIDO POR LA U.E Y E.U.	
PRODUCTOS	LIMITE DE CONCENTRACIÓN
CEREALES (CONSUMO NO HUMANO)	5 µg/kg
CEREALES (CONSUMO HUMANO)	3 µg/kg
CAFÉ TOSTADO	3 µg/kg
VINO DE FRUTOS DESHIDRATADOS	10 µg/kg
GRANOS DE CACAO	2 µg/kg
VINO Y JUGOS DE UVA	0.5 µg/kg
CERVEZA	0.2 µg/kg

Estos datos fueron establecidos por estas dos organizaciones, mediante procesos analíticos considerando factores tales como la evaluación del riesgo y la exactitud analítica, factores económicos y políticos tales como los intereses comerciales de cada país, así como proporcionar un suministro suficiente de alimentos. Teniendo esto en consideración se elaboraron las normas reglamentarias. (Abraham y Ernesto, 2009).

VIII. CONCLUSIÓN.

En la investigación realizada se puso de manifiesto que la Ocratoxina A está presente en una gran cantidad de alimentos y productos alimenticios, tanto para el consumo humano como animal. Cabe recordar que los humanos también consumen carne de animales que muchas veces están siendo alimentados con comestibles contaminados. Entonces, la población en general, está expuesta al consumo de OTA a través de diversas fuentes.

Esta información es relevante porque en México no existen leyes que regulen la presencia de este tipo de toxinas en los alimentos de cualquier origen.

Los métodos analíticos utilizados para la determinación de OTA en diversos alimentos y en fluidos biológicos, utilizan principalmente a la IAC como método de preparación de la muestra, y HPLC con FDL y/o MS/MS para la cuantificación. Existen propuestas en la utilización de otros métodos; sin embargo la AOAC que es un organismo internacional que certifica la metodología usada, sólo avala los métodos ya mencionados.

Surge ahora el uso de las técnicas de biología molecular para realizar una detección temprana de los hongos ocratoxigénicos y así poder implementar medidas de contención de la contaminación.

IX. REFERENCIAS.

- Abbas A, Valez H, Dobson AD. **2009**. Analysis of the effect of nutritional factors on OTA and OTB biosynthesis and polyketide synthase gene expression in *Aspergillus ochraceus*. J Food Microbiol, 30; 135 (1):22-7.
- Abdu S, Ali A, S. Ansari. **2011**. Cytotoxic effect of ochratoxin A on the renal corpuscles of rat kidney: could ochratoxin A cause kidney failure? Histol Histopathol. 26(5):543-9.
- Abraham Méndez Albores, Ernesto Moreno Martínez. **2009**. Las micotoxinas contaminantes naturales de los alimentos. Revista ciencia: (1) 1-7.
- Akdemir C, Ulker OC, Basaran A, Ozkaya S, Karakaya A. **2010**. Estimation of ochratoxin A in some Turkish populations: An analysis in urine as a simple, sensitive and reliable biomarker. Food Chem Toxicol. 48 (3):877-82.
- Almeda S, L Arce, Valcárcel M. **2008**. Combined use of supported liquid membrane and solid-phase extraction to enhance selectivity and sensitivity in capillary electrophoresis for the determination of ochratoxin A in wine. Electrophoresis. 29(7):1573-81.
- Alonso Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Ferreira Gonçalves L, Arcos-Martínez MJ. **2010**. Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A. Biosens Bioelectron. 25(6):1333-7.
- Alonzo E, Cafarella N, Duplicato G, Maugeri A, Platania F, Raciti C, Fardella M. **2008**. The Prevention of Ochratossina á (OTA á) in the wine.Ig Sanita Pubbl. 64(2):163-75.
- Amézqueta S, González Peñas E, Dachoupakan C, Murillo-Arbizu M, de Cerain AL, Guiraud JP. **2009**. OTA producing fungi isolated from stored cocoa beans. Lett Appl Microbiol. 47(3):197-201.
- Aoudia N, Callu P, F Grosjean, La Rondelle Y. **2009**. Effectiveness of mycotoxin sequestration activity of micronized wheat fibres on distribution of ochratoxin A in plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. Food Chem Toxicol. 47(7):1485-9.
- Aoudia N, Tangni EK, LaRondelle Y. **2008**. Distribution of ochratoxin A in plasma and tissues of rats fed a naturally contaminated diet amended with micronized wheat fibres: effectiveness of mycotoxin sequestering. Food Chem Toxicol. 46(3):871-8.
- Arbillaga L, Vettorazzi A, Gil AG, van Delft JH, García-Jalón JA, López de Cerain A. **2008**. Gene expression changes induced by ochratoxin A in renal and hepatic tissues of male F344 rat after oral repeated administration".Toxicol Appl Pharmacol. 15; 230(2):197-207.

- Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. **2012**. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an *in vitro* gastrointestinal model. J Agric Food Chem. 55 (12):4810-9.
- Aydin A, Aksu H, gunsen U. **2011**. Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice. Environ Monit Assess. (1-4):271-80.
- Ayoub F, Reverberi M, Ricelli A, D'Onghia AM, Yaseen T. **2010**. Early detection of *Aspergillus carbonarius* and *A.niger* on table grapes: a tool for quality improvement. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(9):1285-93.
- Bascarán V, de Rojas AH, Chouciño P, Delgado T. **2007**. Analysis of ochratoxin A in milk after direct immunoaffinity column clean-up by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr A. 1167(1):95-101.
- Biasucci G, G Calabrese, Di Giuseppe R, G Carrara, Colombo F, Mandelli B, el Mayor M, Bertuzzi T, Pietri A, Rossi F. **2011**. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. 50(3):211-8.
- Bircan C. **2009**. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. Food Chem Toxicol. 47(8):1996-2001.
- Bononi M, Gallone F, Tateo F. **2012**. Validation data for HPLC/FLD determinations of ochratoxin A in red paprika and black pepper adopting a one-step clean-up procedure. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(2):249-54.
- Capriotti AL, Cavaliere C, Foglia P, Samperi R, Stampachiacchiere S, S Ventura, Laganà A. **2014**. Multiclass analysis of mycotoxins in biscuits by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison of different extraction procedures J Chromatogr A. S0021-9673(14)00561-5.
- Chamieh J, Faye C, Dugas V, Moreau T, Vandenabeele-Trambouze O, Demesmay C. **2011**. Preparation and full characterization of a micro-immunoaffinity monolithic column and its in-line coupling with capillary zone electrophoresis with Ochratoxin A as model solute. J Chromatogr A. 56(12)125-65.
- Chen AJ, Huang LF, Wang LZ, Tang D, F Cai, Gao WW. **2011**. Occurrence of toxigenic fungi in ochratoxin A contaminated liquorice root. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 28 (8):1091-7.
- Comité Mixto FAO / OMS Expertos en Aditivos Alimentarios, curva J, M Bolger, Knaap AG, Kuznesof PM, Larsen JC, Mattia A, Meylan I, Pitt JI et al. **2008**. Evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organ Tech Rep Ser. 2007; (947):1-225.

- Corcuera LA, Ibáñez-Vea M, Vettorazzi A, González-Peñas E, Cerain AL. **2011**. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 879 (26):2733-40.
- Coronel MB, Marin S, M Tarragó, Cano-Sancho G, Ramos AJ, Sanchis V. **2011**.Ochratoxin A and its metabolite ochratoxin alpha in urine and assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain.*Food Chem Toxicol.* 49(6):1436-42.
- Cozzi G, Haidukowski M, G Perrone, Visconti A, Logrieco A. **2009**. Influence of *Lobesia botrana* field control on black aspergilli rot and ochratoxin A contamination in grapes. *J Food Prot.* 72(4):894-7.
- Dachoupakan C, Ratomahenina R, Martínez V, Guiraud JP, Baccou JC, Schorr-Galindo S. **2009**. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *J Food Microbiol.* 132(1):14-23.
- Davolos D, Persiani AM, Pietrangeli B, Ricelli A, Maggi O. **2011**. *Aspergillus affinis* sp. nov., a new ochratoxin A-producing *Aspergillus* species (section *Circumdati*) isolated from decomposing leaves in a Mediterranean stream. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4):1007-15.
- Diana Di Mavungu J, Monbaliu S, Scippo ML, Maghuin-Rogister G, Schneider YJ, LaRondelle Y, Callebaut A, Robbens J, Van Peteghem C, De Saeger S. **2009**. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 26(6):885-95.
- Dostal A, Jakusova L, Cajdova J, Hudeckova H. **2008**. Results of the first studies of occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. *Bratisl Lek Listy:* 109(6): 276-8.
- El Khoury A, T Rizk, Lteif R, Azouri H, Delia ML, Lebrihi A. **2008**. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food Chem Toxicol.* 46(6):2244-50.
- ELIKA. **2013**. Ochratoxina A. Fundacion vazca para la seguridad alimentaria, nakazaritzaco elikagalen segurtasenerako euskal fundazioa: pag 1-4.
- Erkekoğlu P, Sabuncuoglu S, Aydın S, Sahin G, Giray B. **2009**. Determination of seasonal variations in serum ochratoxin A levels in healthy population living in some regions of Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon.* 55(2-3):507-13.
- Fakoor Jannati SS, Beheshti HR, Khoshbakht Fahim N, Feizy J. **2012**. Aflatoxins and ochratoxinin A in bean from Iran. *Bull Environ Contam Toxicol.* 87 (2):194-7.

- Fátima Rezende E, Borges JG, Cirillo MÂ, Prado G, Paiva LC, Batista LR. **2013.** Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Braz J Microbiol.* 44(2):377-84.
- Felizardo RJ, Câmara NO. **2013.** Hepatocellular carcinoma and food contamination: aflatoxins and ochratoxin A as a great prompter. *World J Gastroenterol.* 19 (24):3723-5.
- Fernández-Baldo MA, Bertolino FA, Messina GA, Sanz MI, Raba J. **2010.** Modified magnetic nanoparticles in an electrochemical method for the ochratoxin A determination in *Vitis vinifera* red grapes tissues. *Talanta.* 83(2):651-7.
- Figueroa S, S Centeno, Calvo MA, Rengel A, Adelantado C. **2009.** Mycobiota and concentration of ochratoxin A in concentrated poultry feed from Venezuela. *Pak J Biol Sci.* 12 (7):589-94.
- Fredlund E, Thim AM, Gidlund A, Brostedt S, M Nyberg, Olsen M. **2009.** Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish retail market. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 26(4):527-33.
- Galvis-Sánchez AC, Barros AS, Delgadillo I. **2008.** Method for analysis dried vine fruits contaminated with ochratoxin A. *Anal Chim Acta.* 617(1-2):59-63.
- García Fonseca S, Ballesteros Gómez A, Rubio S, Pérez Bendito D. **2009.** Supramolecular solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat prior to liquid chromatography-fluorescence determination. *J Chromatogr A.* 1217(16):2376-82.
- García Fonseca S, Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D, **2008.** Coacervative extraction of Ochratoxin A in wines prior to liquid chromatography/fluorescence determination. *Anal Chim Acta.* 617 (1-2):3-10.
- Gil-Serna J, González-Salgado A, González-Jaén MA, Vázquez C, Patiño B. **2009.** ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *J Food Microbiol.* 131(2-3):162-7.
- Guo Z, Ren J, Wang J, Wang E. **2011.** Single-walled carbon nanotubes based quenching of free FAM-aptamer for selective determination of ochratoxin A. *Talanta.* 85 (5):2517-21.
- Gürbay A, Girgin G, Sabuncuoglu SA, Sahin G, Yurdakök M, Yigit S, Tekinalp G. **2009.** Ochratoxin A: is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara, Turkey. *J Appl Toxicol.* 30(4):329-33.
- Hernández-Hierro JM, García-Villanova RJ, González Martín I. **2008.** Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to

- naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Anal Chim Acta*. 622(1-2):189-94.
- Herrera M, Herrera A, Ariño A. **2009**. Estimation of dietary intake of ochratoxin A from liquorice confectionery. *Food Chem Toxicol*. 47(8):2002-6.
- Hoffmann D, Fuchs TC, Henzler T, Matheis KA, Herget T, Dekant W, Hewitt P, Mally A. **2010**. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicol*. 277(1-3):49-58.
- Iha MH, Trucksess MW. **2010**. Aflatoxins and ochratoxin A in tea prepared from naturally contaminated powdered ginger. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 27(8):1142-7.
- Jalili M, Jinap S, Hijo R. **2011**. The effect of chemical treatment on reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black and white pepper during washing. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 28(4):485-93.
- Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA). **2002**. Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.8 March 2002. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Berlin: Directorate General Health and Consumer Protection.
- Jin PG, Han Z, Cai ZX, Wu YJ, Ren YP. **2010**. Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using (13) C (15)-deoxynivalenol as internal standard. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 1-13.
- Kollia E, Kanapitsas A, Markaki P. **2014**. Occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A in dried vine fruits from Greek market". *Food Addit Contam Part B Surveill*. 7(1):11-6.
- Kristensen R, Gauthier, Berdal KG, Hamels S, J Remacle, Holst-Jensen A. **2007**. DNA microarray to detect and identify trichothecene- and moniliformin-producing. *J Appl Microbiol*. 102 (4):1060-70.
- Krüger CD, Cavaglieri LR, Direito GM, Keller KM, Dalcero AM, da Rocha Rosa CA. **2010**. Ochratoxin A in serum of swine from different Brazilian states. *J Vet Diagn Invest*. 22(5):753-6.
- Kumagai S, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Aoyama K, Fujita K, Kai S, Sato T, Saito S, Yoshiike N, Sugita-Konishi Y. **2012**. Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 25(9):1101-6.

- Kurtbay HM, Bekçi Z, Merdivan M, Yurdakoç K. **2008**. Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *J Agric Food Chem*. 56(7):2541-5.
- Ilic Z, Bui T, Tran-Dinh N, Dang MH, Kennedy I, Carter D. **2007**. Survey of Vietnamese coffee beans for the presence of ochratoxigenic *Aspergilli* *Mycopathologia*. 163(3):177-82
- La Pera L, Avellone G, Lo Turco V, Di Bella G, Agozzino P, Dugo G. **2008**. Influence of roasting and different brewing processes on the ochratoxin A content in coffee determined by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD). *Food Addit Contam*. 11:1-7.
- Lattanzio VM, Solfrizzo M, S poderes, Visconti A. **2012**. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 21(20):3253-61.
- Leong SL, Hocking AD, Scott ES. **2012**. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *J Appl Microbiol*. 102 (1):124-33.
- Lino CM, Baeta ML, Henri M, Dinis AM, Pena AS, Silveira MI. **2008**. Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. *Food Chem Toxicol*. 46(3):879-85.
- Loizzo MR, Nigro S, De Luca D, Menichini F. **2011**. Detection of ochratoxin A and cis- and trans-resveratrol in red wines and their musts from Calabria (Italy). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 28(11):1561-8.
- Manda P, Dano DS, Kouadio JH, Diakit  A, Sangar -Tigori B, Ezoulin MJ, Soumahoro A, Dembele A, Fourny G. **2009**. Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 26(7):1081-8.
- Mantle PG, Grifo Marquis V, Manderville RA, Squillaci B, Pfohl-Leszkowicz A. **2009**. Structures of Covalent Adducts between DNA and Ochratoxin A: A New Factor in Debate about Genotoxicity and Human Risk Assessment. *Chem Res Toxicol*. 23(1):89-98.
- Mantle PG. **2008**. Interpretation of the pharmacokinetics of ochratoxin A in blood plasma of rats, during and after acute or chronic ingestion. *Food Chem Toxicol*. 46(5):1808-16.
- Marasas, Shephard, Visconti. **1996**. Intercomparison Study for the Determination of Fumonisin. *Med Biol*. 74-89.

- Marino A, Nostro A, Fiorentino C. **2009**. Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. J Food Microbiol. 132 (2-3): 185-9.
- Mateo EM, Gil-Serna J, Patiño B, Jiménez M. **2011**. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus spp.* J Food Microbiol. 149(2):118-26.
- Medina A, Mateo EM, Valle-Algarra FM, Mateo F, Mateo R, Jiménez M. **2008**. Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of *Aspergillus spp.* isolated from grapes. Int J Food Microbiol. 122 (1-2):93-9.
- Medina A, Mateo EM, Roig RJ, Blanquer A, Jiménez M. **2010**. Ochratoxin A levels in the plasma of healthy blood donors from Valencia and estimation of exposure degree: comparison with previous national Spanish data. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(9):1273-84.
- Meletis K, Meniades-Meimaroglou S, Markaki P. **2011**. Determination of ochratoxin A in grapes of Greek origin by immunoaffinity and high-performance liquid chromatography. Food Addit Contam. 1-8.
- Meucci V, Razzuoli E, Soldani G, Massart F. **2010**. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(1):64-71.
- Milićević D, Jurić V, Stefanović S, T Báltico, Janković S. **2010**. Evaluation and Validation of Two Chromatographic Methods (HPLC-Fluorescence and LC-MS/MS) for the Determination and Confirmation of Ochratoxin A in Pig Tissues. Arch Environ contam Toxicol. 58(4):1074-81
- Milićević D, Jovanović M, Matekalo-Sverak V, Radičević T, Petrović MM, Lilić S. **2011**. A survey of spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in chicken tissues and concurrence with histopathological changes in liver and kidneys. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 29(2):159-75.
- Mogensen JM, Varga J, Thrane U, Frisvad JC. **2009**. *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B2. J Food Microbiol. 132 (2-3):141-4.
- Monbaliu S, Van Poucke C, Detavernier C, Dumoulin F, Van De Velde M, Schoeters E, Van Dyck S, Averkieva O, Van Peteghem C, De Saeger S. **2012**. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. J Agric Food Chem. 58(1):66-71.
- Muñoz K, M. Blaszkewicz, Degen GH. **2010**. Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 878(27):2623-9.

- Muñoz K, Wollin KM, Kalhoff H, Degen GH. **2008**. Occurrence of the mycotoxin ochratoxin a in breast milk samples from Germany. *Gesundheitswesen*. 75(4):194-7.
- Noba S, M Omote, Kitagawa Y, Mochizuki N. **2008**. Determination of ochratoxin A in wine by immunoaffinity cleanup and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Food Prot*. 71(5):1038-42.
- Noba S, Uyama A, Mochizuki N. **2009**. Determination of Ochratoxin A in Ready-To-Drink Coffee by Immunoaffinity Cleanup and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*. 57(14):6036-40.
- Pacin AM, Ciancio Bovier EV, Motta E, Resnik SL, Villa D, M. Olsen. **2008**. Survey of Argentinean human plasma for ochratoxin A. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 25(5):635-41.
- Palumbo JD, o' Keeffe TL, Abbas HK. **2011**. Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *J Food Prot*. 70 (7):1615-2.
- Pappier U, Fernández Pinto V, Larumbe G, Vaamonde G. **2011**. Effect of processing for saponin removal on fungal contamination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *J Food Microbiol*. 125 (2):153-7.
- Pérez Moreno, I. y Marco Mancebón, V, **1988**. La lucha limpia contra LOBESIA BOTRANA. Los parásitos de la vid. Ed. Mundi-Prensa pag 1-7.
- Pietri A, Gualla A, Rastelli S, T. Bertuzzi. **2011**. Enzyme-assisted extraction for the HPLC determination of ochratoxin A in pork and dry-cured ham. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 28(12):1717-23.
- Piletska E, Karim K, R Coker, Piletsky S. **2012**. Development of the custom polymeric materials specific for aflatoxin B1 and ochratoxin A for application with the ToxiQuant T1 sensor tool. *J Chromatogr A*. 1217(16):2543-7.
- Ponsone ML, Chiotta ML, Combina M, Dalcero AM, Chulze SN. **2010**. Fate of ochratoxin A content in Argentinean red wine during a pilot scale vinification. *Rev Argent Microbiol*. 41(4):245-50.
- Pozzo L, Cavallarin L, Nucera D, Antoniazzi S, Schiavone A. **2010**. A survey of ochratoxin A contamination in feeds and sera from organic and standard swine farms in northwest Italy. *J Sci Food Agric*. 90(9):1467-72.
- Prieto-Simón B, Campàs M, Marty JL, Noguer T. **2008**. Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples *Biosens Bioelectron*. 23(7):995-1002.
- Rahmani A, Jinap S. **2010**. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using

- HPLC-FLD. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(12):1683-93.
- Raiola A, G Meca, Mañes J, A. Ritien. **2011**. Bioaccessibility of Deoxynivalenol and its natural co-occurrence with Ochratoxin A and Aflatoxin B (1) in Italian commercial pasta. Food Chem Toxicol. 50(2):280-7.
- Ranaldi G, E Mancini, Ferruzza S, Sambuy Y, Perozzi G. **2009**. Effects of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. Toxicol In Vitro. 21(2):204-10.
- Ratola N, P Barros, Simões T, Cerdeira A, Venâncio A, Alves A. **2008**. Worldwide interlaboratory study on the determination of ochratoxin A in different wine type samples. Talanta. 70 (4):720-31.
- Reiter EV, Cichna-Markl M, Tansakul N, Cuña WB, Chung DH, Zentek J, Razzazi-Fazeli E. **2011**. Sol-gel immunoaffinity chromatography for the clean up of ochratoxin A contaminated grains. J Chromatogr A. 1218(42):7627-33.
- Ramiro R, Ibáñez-See M, González-Peñas E, Lizarraga E. **2010**. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. J Chromatogr A. 1217(52):8249-56.
- Riba A, Mokrane S, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. **2008**. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. J Food Microbiol. 122(1-2):85-92.
- Ritieni A, Santini A, Mussap M, Ferracane R, P Bosco, Gazzolo D, Galvano F. **2011**. Simultaneous determination of mycotoxins in biological fluids by LC-MS/MS. Front Biosci (Elite Ed). 2: 151-8.
- Rivas Casado M, Parsons DJ, Weightman RM, Magan N, Oraggi S. **2009**. Geostatistical analysis of the spatial distribution of mycotoxin concentration in bulk cereals. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 26(6):867-73.
- Salgado González A, Patiño B, Gil-Serna J, Vázquez C, González-Jaén MT. **2009**. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR Green and TaqMan quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. FEMS Microbiol Lett. 295 (1):57-66.
- Sarathchandra G, Muralimanohar B. **2014**. Occurrence of mycotoxins in livestock feeds and feed stuffs of Tamil Nadu. J Environ Biol. 34(4):825-30.
- Schaut A, Saeger SD, Sergeant T, Schneider YJ, LaRondelle Y, Pussemier L, Ren blanco, Peteghem CV. **2008**. Liquid chromatographic methods for biotransformation studies of ochratoxin A. Biomed Chromatogr. 22(9):1013-20.

- Schmidt-Heydt M, Geisen R. **2007**. A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food Int J Food Microbiol. 117(2):131-40.
- Schmidt-Heydt M, Richter W, Michulec M, Buttinger G, R. Geisen. **2008**. Comprehensive molecular system to study the presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *Penicillium verrucosum* in wheat. Food Addit Contam. 25(8):989-96.
- Schmidt-Heydt M, Schunck T, R. Geisen, Max Rubner. **2009**. A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. J Food Microbiol. 117(2):131-4030.
- Selma MV, Martínez-Culebras PV, Aznar R. **2008**. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. J Food Microbiol. 122(1-2):126-34.
- Selma MV, Martínez-Culebras PV, Elizaquível P, R. Aznar. **2009**. Simultaneous detection of the main black aspergilli responsible for ochratoxin A (OTA) contamination in grapes by multiplex real-time polymerase chain reaction. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 26(2):180-8.
- Senyuva HZ, Cimen D, Gilbert J. **2009**. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in high-sugar-content traditional Turkish foods by affinity column cleanup and LC fluorescence detection. J AOAC Int. 92(4):1128-35.
- Sharma R.P. **1993**. Immunotoxicity of mycotoxins. J. Dairy Sci., 76: 892-897.
- Spadaro D, Ciavarella A, Lore A, Garibaldi A, Gullino ML. **2008**. Low levels of ochratoxin A in wines from Piedmont. Commun Agric Appl Biol Sci. 72(2):327-32.
- Stoev SD, Dutton MF, Njobeh PB, Mosonik JS, Steenkamp PA. **2010**. Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan endemic nephropathy. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(1):72-88.
- Sugita Konishi Y, Tanaka T, Nakajima M, Fujita K, Norizuki H, N Mochizuki, K. Takatori. **2008**. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. Talanta. 69(3):650-5.
- Tabata S, Iida K, K Kimura, Iwasaki Y, Nakazato H, K Kamata, Hirokado M. **2008**. Simultaneous determination of ochratoxin A, B and citrinin in foods by HPLC-FL and LC/MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 49 (2):100-5.
- Tabata S, Iida K, K Kimura, Iwasaki Y, Nakazato M, Kamata K, Hiroko M. **2008**. Investigation of ochratoxin a, B and citrinin contamination in various commercial foods. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 49(2):111-5.

- Ferracane R, Tafuri A, Logieco A, Galvano F, Balzano D, Ritieni A. **2007**. Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil. *Food Addit Contam.* 24(2):173-80.
- Tafuri A, G Meca, A. Ritieni. **2008**. A rapid high-performance liquid chromatography with fluorescence detection method developed to analyze ochratoxin A in wine. *J Food Prot.* 71(10):2133-7.
- Valle-Algarra FM, Mateo EM, Medina A, Mateo F, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M. **2009**. Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 26(6):896-906.
- Wang Y, Chai T, Lu G, Quan C, Duan H, Yao M, Zucker BA, Schlenker G. **2008**. Simultaneous detection of airborne aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environ Res.* 107(2):139-44.
- Yang L, Wang L, Pan J, Xiang L, Yang M, Logrieco AF. **2010**. Determination of ochratoxin A in traditional Chinese medicinal plants by HPLC-FLD. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 27(7):989-97.
- Yoon S, Cong WT, de Bang Y, Lee SN, Yoon CS, Kwack SJ, Kang TS, Lee KY, Choi JK, Choi HJ. **2009**. Proteome response to ochratoxin A-induced apoptotic cell death in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurotoxicology.* 30(4):666-76.
- Zezza F, F Longobardi, Pascale M, Eremin SA, Visconti A. **2009**. Fluorescence polarization immunoassay for rapid screening of ochratoxin A in red Wine. *Anal Bioanal Chem.* 395(5):1317-23.
- Zlăvog AV, Cuciureanu M, Schiriac E, Popa I, Diaconu C, Cuciureanu R. **2014**. Estimation of ochratoxin A in the human blood of Romanian population. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 117(4):1009-13.

X. GLOSARIO.

Anfífilico: es un término que describe un compuesto químico que posee propiedades tanto hidrófilas y lipófilas. Dicho compuesto se denomina anfífilico o anfipáticos.

Apoptosis: es una destrucción o muerte celular programada, provocada por ella misma, con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento, está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

Aptámeros: son ácidos nucleicos de cadena sencilla, ADN o ARN, que reconocen una gran variedad de moléculas.

Avidina: es una glicoproteína tetramérica que une biotina, producida en el oviducto de aves, reptiles y anfibios y depositada en la clara de sus huevos.

Biomonitoreo: conjunto de técnicas basadas en la reacción y sensibilidad de distintos organismos vivos a diversas sustancias contaminantes presentes en un ecosistema.

Bioreceptor: Cualquier compuesto, tal como una proteína, que se une a un compuesto específico particular, cuando parte de un biosensor.

Biotina: es una vitamina que se encuentra en pequeñas cantidades en numerosos alimentos.

Calmodulina: es una proteína ácida intracelular, de bajo peso molecular y termoestable que se localiza principalmente en el cerebro y el corazón y es expresada en todas las células eucariotas, siendo uno de los reguladores en la transducción de la señal de calcio en la célula.

Caspasa: grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas.

Celulas HT-22: actúan como si transmitieran a la muestra un efecto neuro protector en contra de los estresores oxidativos como el glutamato, peróxido de Hidrógeno y proteína Beta –Amiloidea.

Clúster: se aplica a los conjuntos o conglomerados de computadoras contruidos mediante la utilización de hardware común y que se comportan como si fuesen una única computadora.

Columnas de inmunofinidad: se basan en el principio de una unión específica anticuerpo-analito.

Confitería: Establecimiento donde se elaboran y venden dulces, como pasteles, galletas y bombones.

Inmunosensor o biosensor: dispositivo bioquímico-electrónico que permite identificar, transformar y cuantificar un evento biológico. Está compuesto por la combinación de un bioreceptor, componente biológico y un transductor, método de detección.

Inmunotoxina: Agente tóxico unido a un anticuerpo que tiene capacidad de destruir células cancerosas sin afectar a las sanas.

Lobesia botrana: es una polilla de la familia *Tortricidae*. Se encuentra en el sur de Europa.

Micotoxina: sustancias tóxicas producidas por hongos, los cuales son los contaminantes para humanos y animales causando enfermedades carcinogénicas.

Microbiota: También conocida como microflora es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano.

Micronizar: proceso por la cual se lleva a la partícula más pequeña

Monilimorfina: es una inusual micotoxina y un contaminante de alimentación que es letal para las aves.

Mutagénico: Agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.

Nefrocancerígeno: efecto que causan las toxinas en los riñones (cancer).

Neuroblastoma: Tumor maligno ubicado en las células de las neuronas.

Neurodegeneración: tipo de enfermedades que agrupa a un género de desórdenes cognitivos, tales como, enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Creutzfeldt-Jakob y esclerosis múltiple.

Neurotóxico(o): efecto que causa el elemento directamente en el sistema nervioso central causando una falla en la transmisión de impulsos nerviosos y la acción necrosante surge efecto sobre el núcleo de las células matándolas, es decir destruyendo el tejido.

Nixtamalización: proceso mediante el cual se realiza la cocción del maíz con agua y cal, el cual es utilizado principalmente para la obtención de masa para la elaboración de tortillas.

Nucleofosmina: es una proteína codificada en humanos por el gen NPM1

Proteoma celular: es la totalidad de proteínas expresadas en una célula particular bajo condiciones de medioambiente y etapa de desarrollo (o ciclo celular) específicas, como lo puede ser la exposición a estimulación hormonal.

Regucalcina: un gen implicado en la homeostasis del calcio

Toxina: sustancia venenosa producida por células vivas u organismos, como animales, plantas, bacterias y otros organismos biológicos.

Valosin: es una proteína su función es actuar como un segregase ubiquitina que remodela complejos de proteínas multiméricas mediante la extracción de proteínas polyubiquitinated para el reciclaje o la degradación por el proteasoma.