

Control de micotoxinas del campo a la mesa

INOFOOD
5 de octubre 2015

Nancy Zabe
Jefa de Servicios Tecnicos y Aplicaciones
VICAM, A Water's Business
nancyz@vicam.com

Saludos a los Participantes de INOFOOD 2015 , desde Massachusetts y el noreste de los EE.UU.!!!



**Pemaquid Point Lighthouse, Pemaquid, Maine
(Costa noreste de EE.UU.)**

“The presence of mycotoxins in commodities is presently unavoidable and, therefore, to avoid their occurrence in the food chain requires management strategies that would prevent contaminated commodities from entering food and feed processing facilities. Testing of the commodities is required to accomplish this process.”

– The Council for Agricultural Science and Technology report #139, 2003

Traducción:

“La presencia de micotoxinas en commodities actualmente es inevitable, y evitar su ocurrencia en la cadena de alimentos requiere de estrategias de gestión, que impida que productos contaminados entren en las instalaciones de procesos de alimentos y forrajes. El análisis de estos commodities es indispensables para lograr este proceso.”

– Informe del Consejo para la Ciencia Agrícola y Tecnología #139, 2003

- Qué son las micotoxinas?
- Dónde se encuentran las micotoxinas?
- Regulaciones de micotoxinas
- Métodos de análisis de micotoxinas
- Controlar las micotoxinas

Qué son las micotoxinas?

- **Micotoxinas** son metabolitos producidos por hongos que se encuentran presentes en alimentos deteriorados, y que inducen respuestas tóxicas cuando son consumidos por animales o personas.
- **Cientos** de micotoxinas han sido identificados; se dividen en muchas clases químicas diferentes, e inducen una amplia variedad de respuestas tóxicas.

- Ergotismo (Fuego San Antonio) en la Edad Media
- Aleukia toxica alimentaria en Rusia durante la Segunda Guerra Mundial (T-2)
- Síndrome del Pavo X en Inglaterra en 1960 (aflatoxina)
- Intoxicación por aflatoxina en Kenia en 2004
- Brote de aflatoxina en comida para perros en EE.UU. en 2006

Toxic pet food may have killed dozens of dogs

Diamond Pet Foods recalled 19 varieties due to contamination









Shanika Stewart force-feeds strawberry-flavored Ensure through a syringe to her 3-year-old Chow "Cosco" at her home in Port Jackson in Columbia, S.C. The dog suffered permanent liver damage after being exposed to aflatoxin in a batch of Diamond pet food.



Pet food recall
Jan. 9. The Food and Drug Administration reports that at least 76 dogs nationwide are believed to have died as a result of eating contaminated Diamond Pet Foods. NBC's Dawn Pratangelo reports.

Nightly News

| | | | | | | |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| |  |  |  |  |  |  |
| Micotoxinas | AFLATOXINAS B1, B2, G1, G2, M1 | DEOXINI VALENOL | FUMONISINAS B1, B2, B3 | OCRATOXINA A | T-2/HT-2 | ZEARALENONA |
| Mohos que producen toxinas | <i>Aspergillus flavus,</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> | <i>Fusarium graminearum</i> | <i>Fusarium verticillioides</i> | <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> | <i>Fusarium y otros especies de hongo</i> | <i>Fusarium graminearum</i> |
| Alimentos susceptibles a la contaminación | Maíz, maní, nueces, semilla de algodón, especias, leche, trigo, avena, cebada y arroz | Maíz, trigo, cebada, cebada malteada y avena | Maíz y otros granos de cereal | Maíz, trigo, cebada, cerveza, avena, sorgo, frutos secos, pasas, el vino, café y cacao | Maíz, trigo, cebada, avena, arroz, sorgo, y otros granos de cereal | Maíz, trigo, cebada, grano y sorgo |
| Efectos en la salud | <ul style="list-style-type: none"> ▪Cáncer y daño del hígado ▪Inmunosupresión ▪Disminuye Producción de leche y huevos | <ul style="list-style-type: none"> ▪Daño del tracto digestivo, medula ósea, bazo, órganos reproductivos ▪Pérdida de peso, vómitos y rechazo de forraje | <ul style="list-style-type: none"> ▪Cáncer en ratones ▪Degradación del cerebro en caballos ▪Congestión de pulmones en cerdos ▪Cáncer del esófago en humanos | <ul style="list-style-type: none"> ▪Daño de riñón y cáncer ▪Inmunosupresión | <ul style="list-style-type: none"> ▪Lesiones cutáneas y orales en ganadería y humanos ▪Aleukia toxica alimentaria en humanos ▪Considerada 10x más toxica que DON | <ul style="list-style-type: none"> ▪Impacto negativo de la reproducción, el desarrollo fetal y la salud de recién nacidos ▪Causa feminización en animales a 1 ppm |

Micotoxinas: Riesgos económicos y sanitarios

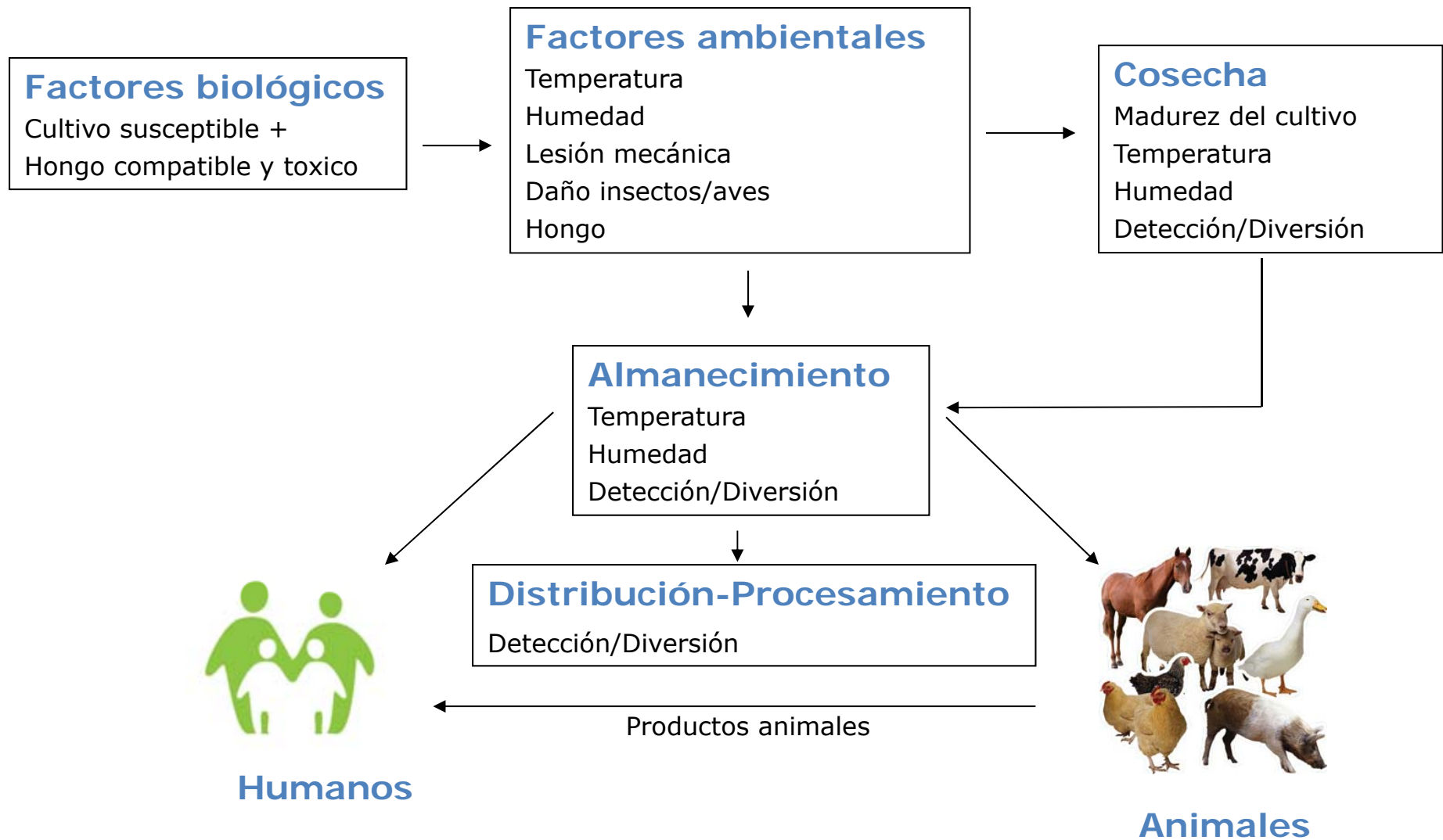


Figura 6.1. Factores afectando la ocurrencia de micotoxinas en la caneda de alimentos (Pestka y Casale, 1989).

Regulación mundial de micotoxinas

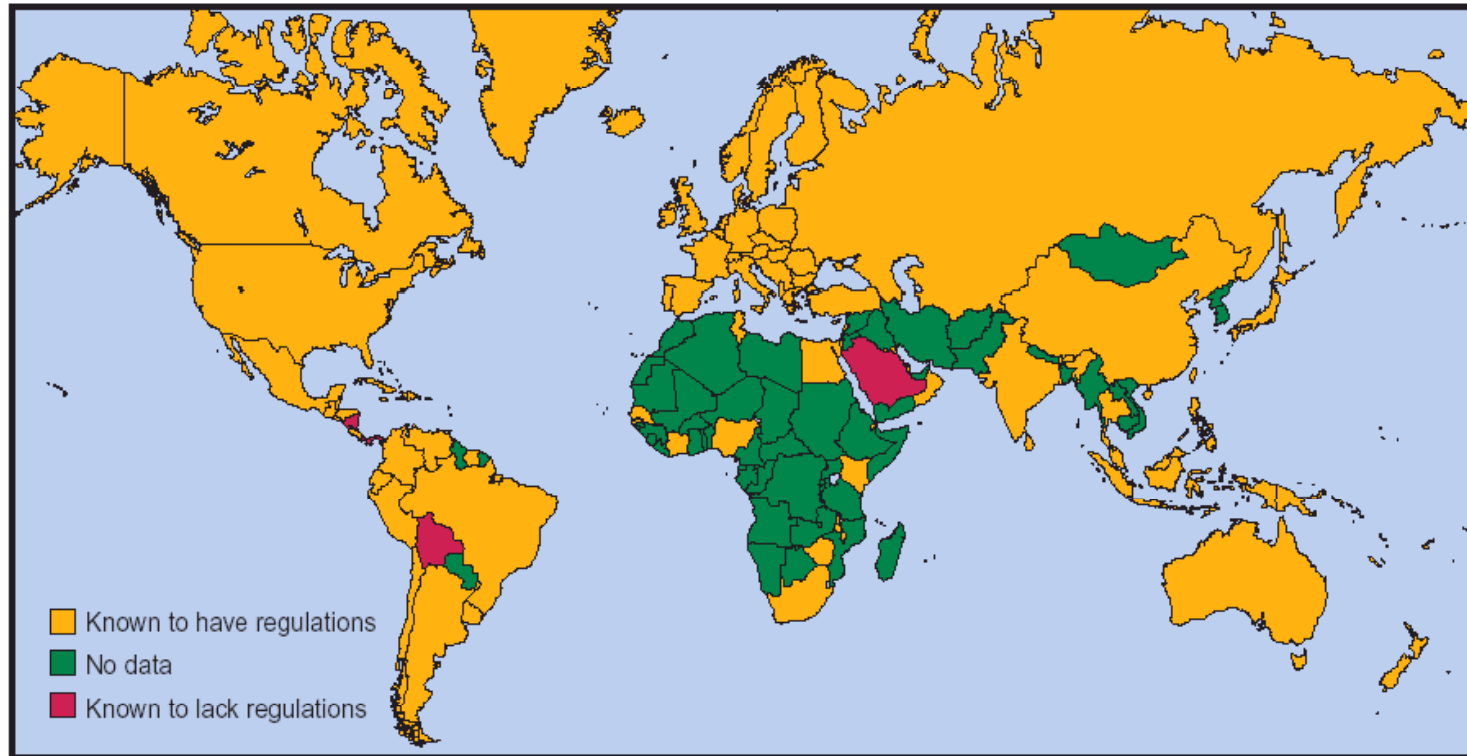


Figura 8.1 Países con regulación vigente para micotoxinas en alimentos y forraje (amarillo), países donde no se sabe si hay regulación (verde) y naciones donde no hay regulación específica vigente (rojo).

(CAST report, 2003)

Regulación Chilena para micotoxinas en alimentos para humanos*

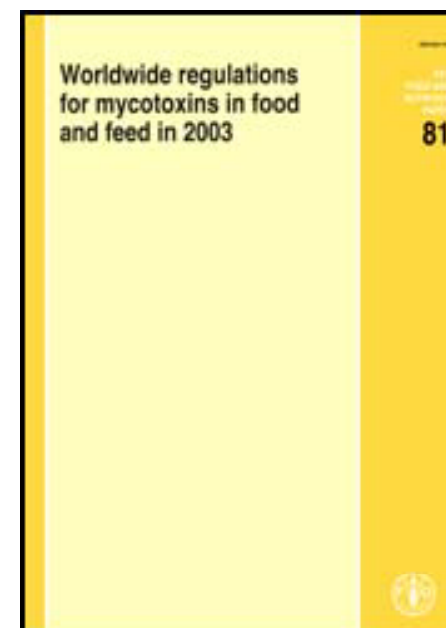


| Micotoxinas | Alimento | Limite |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2) | Cereales, especias, maní, almendras, nueces, avellanas, pistachos, higos secos y nueces de Brasil | 10ppb |
| Aflatoxina M1 | Leche | 0,5ppb |
| Zearalenona | Cereales | 200ppb |
| Patulina | Jugos, concentrados, puré de manzanas, peras, nísperos y membrillos | 50ppb |
| Ocratoxina | Cereales, cacao, pasas, jugos, néctares y concentrado de uva, café en grano | 5ppb |
| Ocratoxina | Café soluble (instantáneo) | 10ppb |
| Deoxinivalenol | Cereales | 750ppb |
| Fumonisinias | Maíz no elaborado Maíz y sus derivados para consumo directo | 4000ppb 1000ppb |

* Exportadores deben cumplir las regulaciones de países importadores

Micotoxinas mas comúnmente reguladas en alimentos globalmente

| Micotoxina | Número de países |
|------------------|------------------|
| Aflatoxina total | 76 |
| Aflatoxina B1 | 61 |
| Aflatoxina M1 | 60 |
| Patulina | 48 |
| Ocratoxina A | 37 |
| Deoxinivalenol | 37 |
| Zearalenona | 17 |
| Fumonisina | 6 |



(FOA Food and Nutrition Paper #81)

Tecnologías para el análisis de micotoxinas

**Costo y menor
complejidad
Menos
información**

**Costo y mayor
complejidad
Más
información**



**Tiras
reactivas
cualitativas**

**Tiras reactivas
cuantitativas o
Columnas de
inmunoafinidad
con fluorómetro**

**HPLC
o UPLC**

**LC-MS
UPLC-MS-MS**

Consideraciones para elegir un buen método



- Tiempo de análisis
- Mano de obra – Capacitación – Nivel de formación
- Costo – Capital de inversión y consumibles
- Entorno de prueba – en laboratorio o en terreno
- Requiere un método oficial?
- Precisión, exactitud y límite de detección requerida para el método
- Tipo de información – cualitativo o cuantitativo, toxinas totales o individuales

Método tiras reactivas cualitativas AflaCheck



Muestra de maíz



5g



10mL 70% MeOH
(10ppb LOD)



Agitar, 1 min.



Extracción



Dilución
con agua



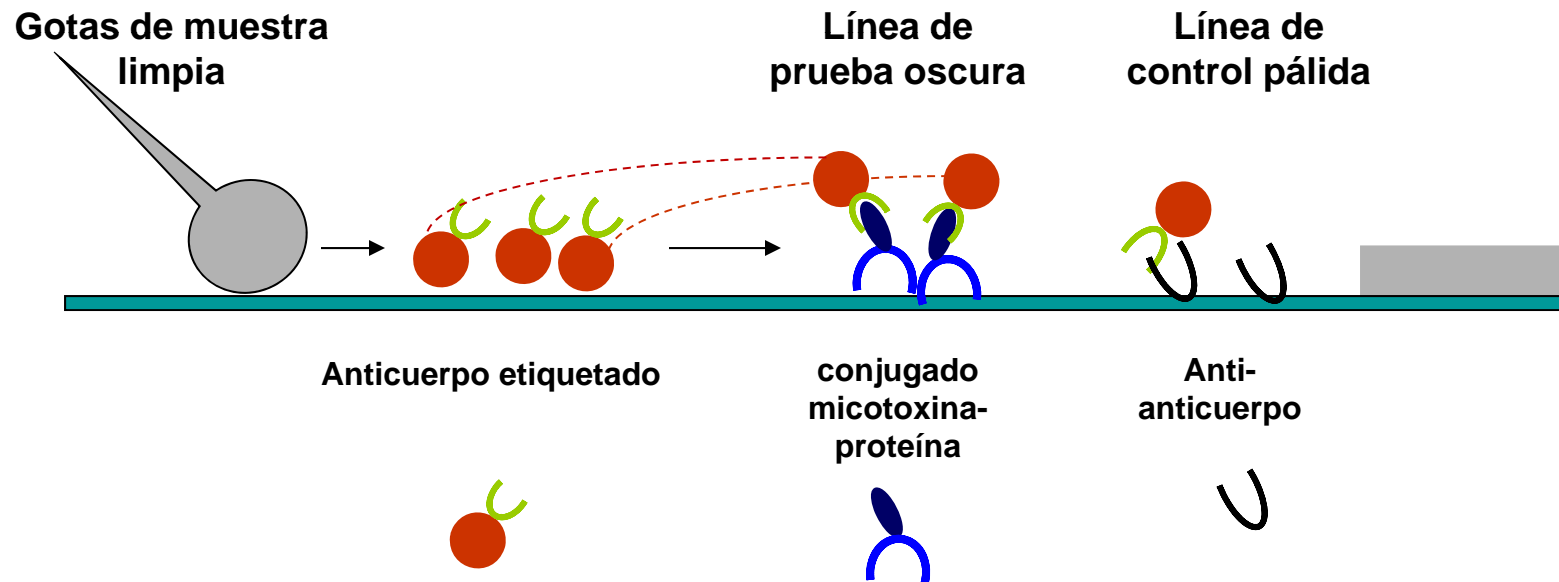
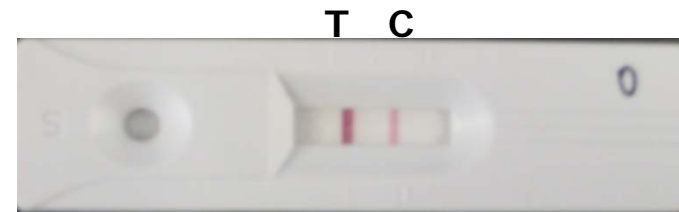
Prueba tira: 3-10 min.



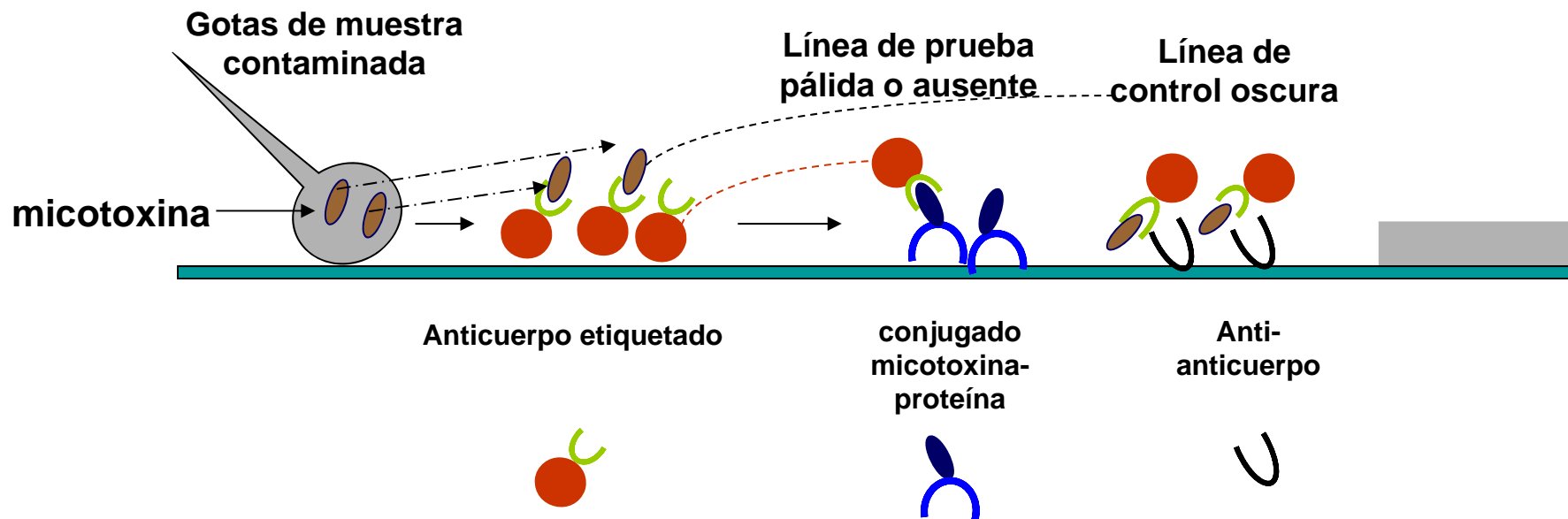
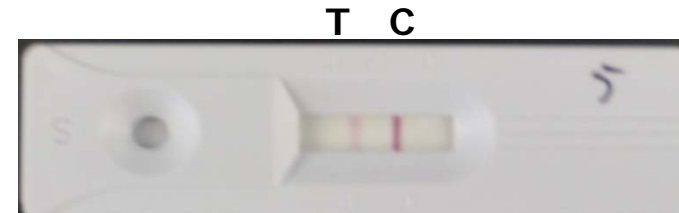
Negativo

Positivo

En la ausencia de micotoxinas



En la presencia de micotoxinas



Tiras de flujo lateral se pueden leer con un lector para resultados cuantitativos

VICAM
A Waters Business



Método tiras reactivas cuantitativas Afla-V



**5g de
muestra***



**5g + 25mL
70% MeOH**



**Vortex
2 minutos**



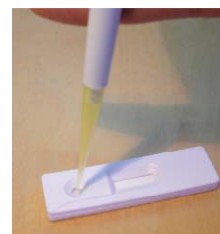
**Recoger
Filtrar**



**100uL de
diluyente
Afla-V**



100uL filtrado



**Transferir
100uL
al dispositivo**



**Leer
resultado
después de
5 min**

*maní, almendras, maíz, trigo y arroz

Características de tiras reactivas cuantitativas



- Se pueden utilizar en terreno
- Rápido- menos de 10 minutos
- Da un resultado numérico
- Fácil- Cualquier persona puede ser entrenado rápidamente para hacer la prueba
- Barato
- Permite tomar decisiones en terreno
- No requiere lavar los insumos – “todo es desechable”
- Tiras deben ser refrigeradas
- Precisión más baja que métodos instrumentales
- Disponible para cuantificar aflatoxinas totales, fumonisina, DON y Ocratoxina (Afla-V, Fumo-V, DON-V y Ochra-V)
- Métodos de extracción con agua también disponibles
- Afla-V es certificado USDA-GIPSA

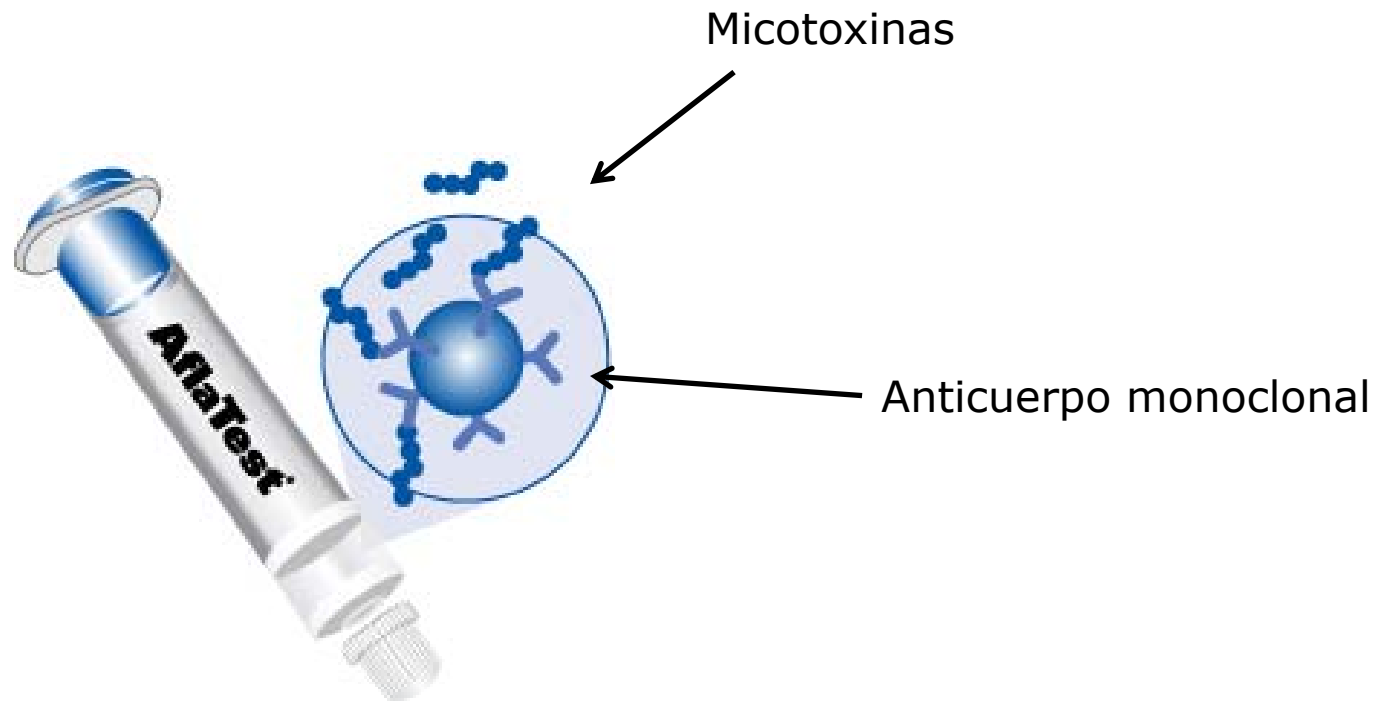
Columnas de inmunoafinidad únicas para cuantificación de micotoxinas con fluorómetro o HPLC

VICAM
A Waters Business

- Aflatoxina (agujero angosto o ancho)
- Aflatoxina M1 (solo agujero ancho)
- Ocratoxina (agujero angosto y ancho)
- Fumonisina (agujero angosto y ancho)
- Deoxinivalenol (agujero angosto y ancho)
- Zearalenona (agujero angosto y ancho)
- T-2/HT-2 (agujero angosto y ancho)
- Citrinina (solo agujero ancho)



Columnas inmunoafinidad anticuerpo



Agregar solución de
revelado
Medir en fluorómetro



Eluir la aflatoxina
con 1.0 mL de metanol

Diluir con H₂O
Inyectar en columna
HPLC o UPLC

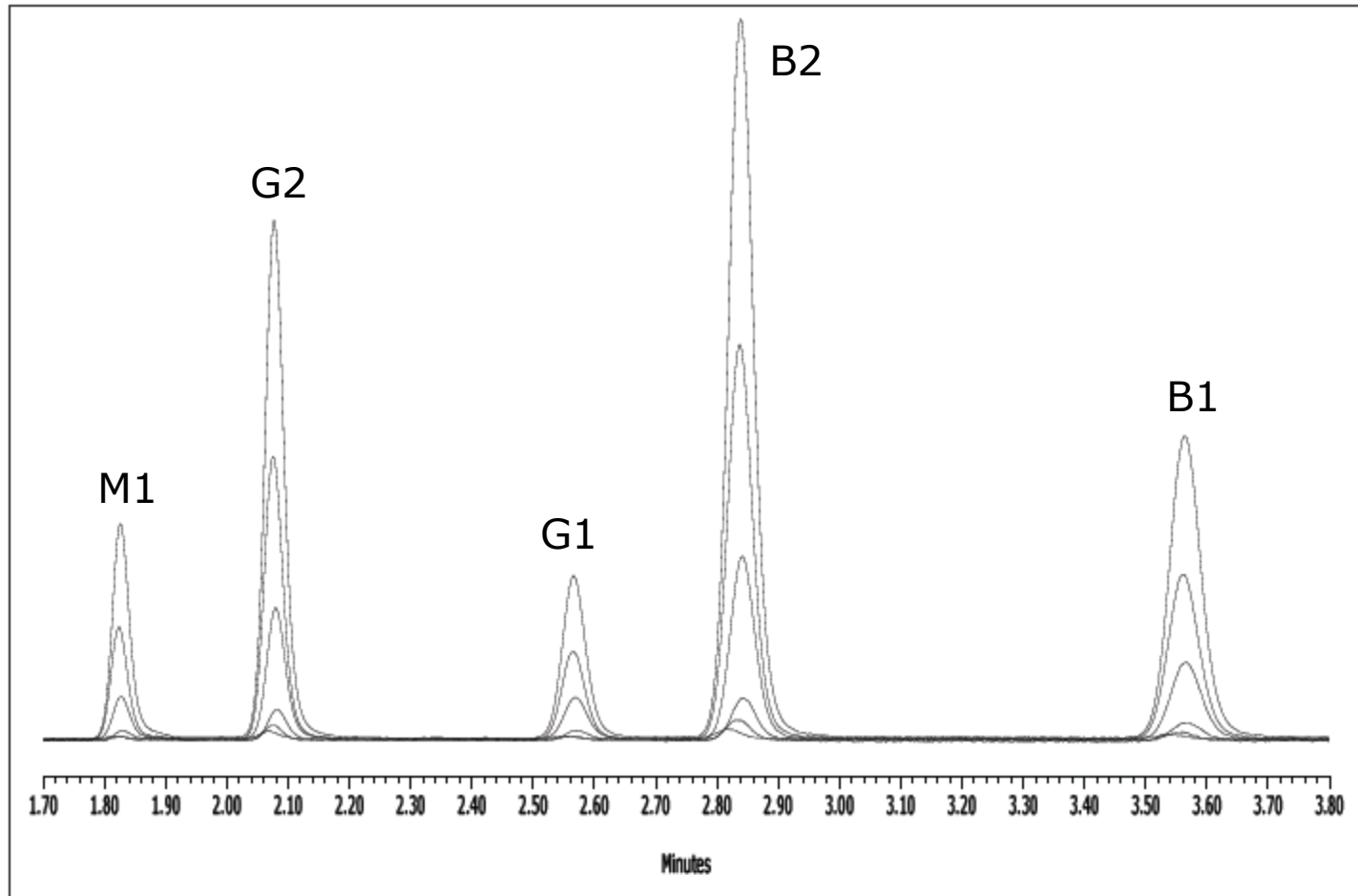


Características de rendimiento de pruebas cuantitativas con fluorómetro



- Se puede utilizar en terreno - escabroso
- Métodos establecidos utilizados por muchos años
- AflaTest está certificado Método Oficial AOAC y USDA-GIPSA
- Da un resultado numérico impreso
- Fácil- Cualquier persona puede ser entrenado rápidamente para hacer la prueba
- Bueno para ordenar los productos en terreno
- Aflatoxina, Ocratoxina y Zearalenona no requieren refrigeración
- Tiempos varían entre 7 minutos y 20 minutos dependiente de la toxina
- Ensayo ancho disponible para aflatoxinas hasta 1000ppb sin una segunda prueba

Cromatograma Aflatoxina UPLC



Métodos oficiales AOAC



| Método Oficial | Micotoxina | Alimentos |
|----------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 991.31 | Aflatoxinas | Maíz, Maní crudo y Mantequilla de maní |
| 999.07 | Aflatoxina B1 y Aflatoxinas Totales | Mantequilla de maní, Masa de pistacho, Masa de higo y Polvo de paprika |
| 2000.03 | Ocratoxina A | Cebada |
| 2000.08 | Aflatoxina M1 | Leche líquida |
| 2000.09 | Ocratoxina A | Café tostado |
| 2000.16 | Aflatoxina B1 | Comida para lactantes |
| 2001.04 | Fumonisina | Maíz y Copos de maíz |
| 2001.01 | Ocratoxina | Vino y cerveza |
| 2003.02 | Aflatoxina B1 | Forrajes |
| 2004.10 | Ocratoxina | Café verde |
| 2008.02 | Aflatoxinas and Ocratoxina | Ginseng y Genjibre |
| 2013.05 | Aflatoxinas | Aceite de aceitunas, Aceite de maní y Aceite de sésamo |

Métodos oficiales CEN

| Método Oficial | Micotoxina | Alimentos |
|----------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EN12955 | Aflatoxina | Cereales, nueces y productos derivados |
| EN14123 | Aflatoxina | Avellanas, maní, pistachos, higos y polvo de pimentón |
| EN14132 | Ocratoxina A | Cebada y café tostado |
| EN14133 | Ocratoxina A | Vino y cerveza |
| EN14352 | Fumonisina | Alimentos a base de maíz |
| EN14501 | Aflatoxina | Leche y leche en polvo |
| EN15791 | Deoxinivalenol | Forrajes |
| EN15792 | Zearalenona | Forrajes |
| EN15835 | Ocratoxina A | Alimentos a base de cereal para lactantes y niños |
| EN15839 | Ocratoxina A | Grosellas, pasas, sultanas, frutos secos mixtos y higos secos |
| EN15850 | Zearalenona | Comida para bebés a base de maíz, harina de cebada, harina de maíz, polenta, harina de trigo y alimentos para lactantes y niños a base de cereal |
| EN15851 | Aflatoxina B1 | Alimentos para lactantes y niños a base de cereal |
| EN15891 | Deoxinivalenol | Cereales, productos de cereales y alimentos para lactantes y niños a base de cereal |
| EN15892 | Ocratoxina A | Grosellas, pasas, sultanas, frutos secos mixtos y higos secos |
| EN16187 | Fumonisina | Alimentos para lactantes y niños que contiene maíz |

Características de métodos HPLC



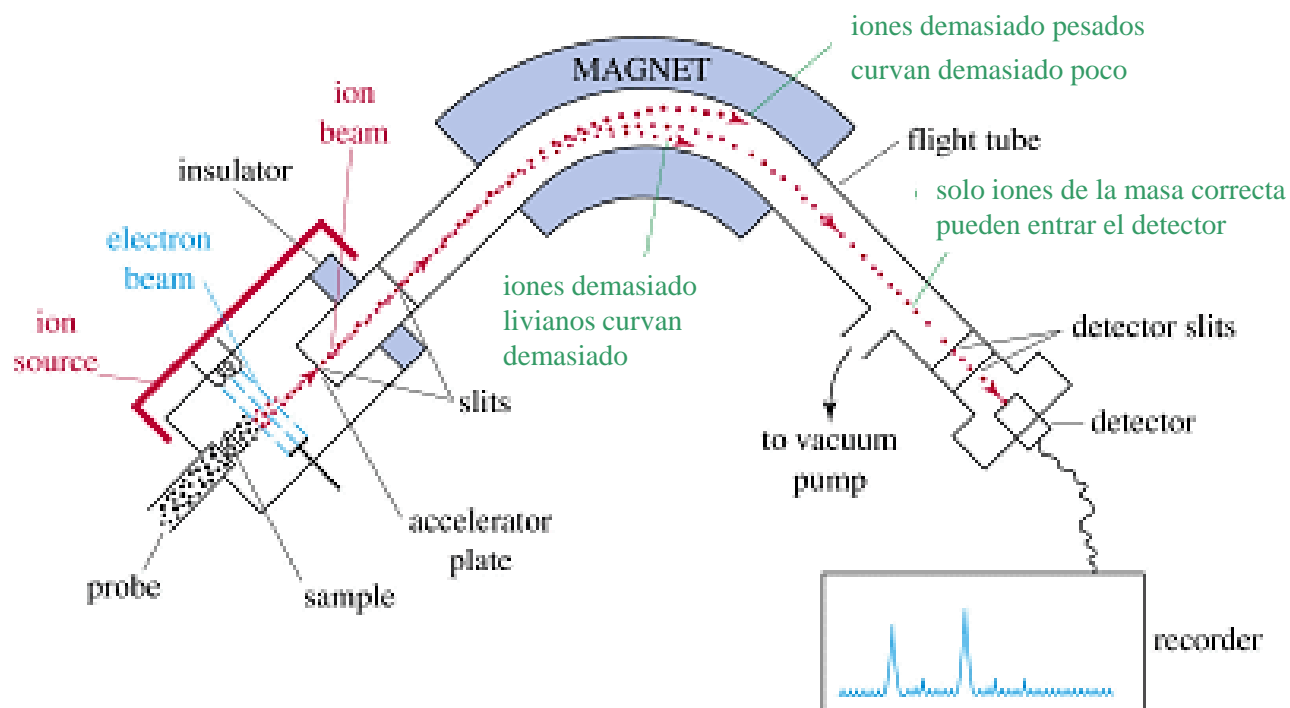
- La limpieza con columna de inmunoafinidad para HPLC es un método oficial AOAC y CEN (Europeo) para las micotoxinas controladas comúnmente
- Métodos aceptados para exportaciones
- Métodos establecidos para muchos tipos de muestras
- Puede cuantificar aflatoxinas individuales: B1, B2, G1, G2 o fumonisinas B1, B2, B3, no solamente toxinas totales
- Límites de detección más bajos que kits de pruebas
- Para uso en laboratorios
- Tiempo de prueba más largo
- Instrumentación más cara
- Debe medir precisamente y almacenar micotoxinas para obtener resultados precisos
- Resultados correctos dependen de una curva de calibración bien preparada
- Requiere más formación
- Columnas de inmunoafinidad disponibles para aflatoxinas, ocratoxina, fumonisinas, DON/NIV, T-2/HT-2, zearanlenona, citrinina y varias combinaciones de micotoxinas

Análisis de micotoxinas multiple – columnas de inmunoafinidad



- **AflaOchra HPLC** – Para detectar aflatoxinas y ocratoxina
- **AOZ HPLC** – Para detectar aflatoxinas, ocratoxina y zearalenona
- **Myco6in1⁺** – Para detectar aflatoxinas, ocratoxina, fumonisinas, DON, nivalenol, zearalenona, T2 y HT2
- Estas columnas se usan solamente con UPLC/HPLC o LC/MS/MS

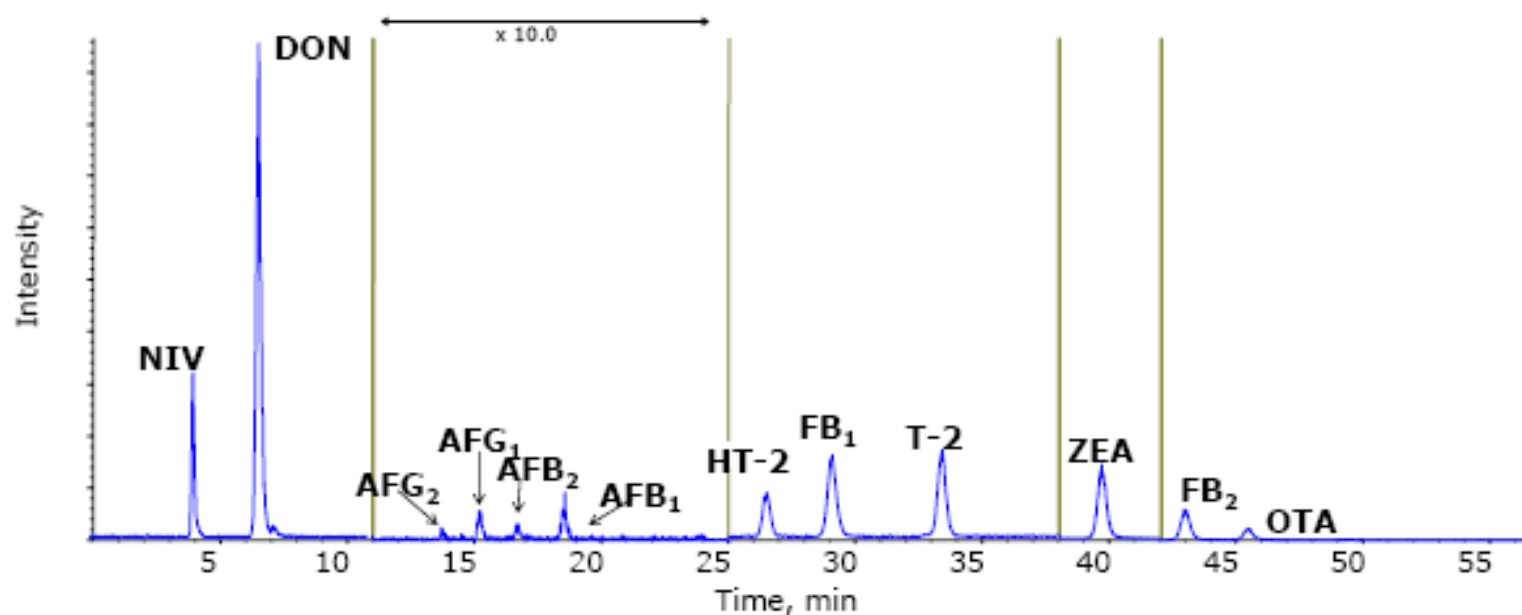
LC-MS (Liquid chromatography- Mass spectrometry)



Ventaja de MS- Puede detectar moléculas que no fluorescen o absorben



Cromatograma de iones totales para Myco6in1+



Total ion chromatogram (sum of MRM transitions) of a maize sample extract spiked with: 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DON; AFG₂, AFB₂ 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFG₁ 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB₁ 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; FB₁ 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, FB₂ 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, HT-2, T-2, ZEA 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, OTA 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Myco6in1 y Myco6in1+ referencias



- 1. Lattanzio, V., Solfrizzo, M., Powers, S., Visconti, A., Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 2007; 21: 3253-3261.
- 2. Lattanzio, V., Ciasca, B., Powers, S., Visconti, A., Improved method for the simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in cereals and derived products by liquid chromatography –tandem mass spectrometry after multi-toxin immunoaffinity clean up, *Journal of Chromatography A*, 2014; 1354: 139-143.
- 3. Soleimany, F., Jinap, S., Rahmani, A., Khatib A., Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system, *Food Additives and Contaminants Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2011 Apr 28(4):494-501.
- 4. Tang, Y.Y., Lin H.Y., Chen Y.C., Su, W.T. Wang. S.C., Chiueh L.C., Shin Y.C., Development of a Quantitative Multi-Mycotoxin Method in Rice, Maize, Wheat and Peanut Using UPLC-MS/MS, *Food Anal. Methods*, 2013; 6:727-736.
- 5. Kim, D.H., Jang, H.S., Choi, G.H., Kim, H.J., Kim, H.J., Kim, H.L., Cho, H.J., Lee C., Occurrence of Mycotoxins in Korean Grains and Their Simultaneous Analysis, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 2013; Vol. 45, No 1, pp. 111-119.
- 6. Solfrizzo, M., Gambacorta, L., Lattanzio V.M.T., Powers, S., Visconti, A., Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B1 in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011; 401:2831-2841.
- 7. Vaclavikova, M., MacMahon, S., Zhang, K., Begley, T. Application of single immunoaffinity clean-up for simultaneous determination of regulated mycotoxins in cereals and nuts, *Talanta*, 2013; 117: 345-351.

Características de Mass Spectrometry (MS)



- Ensayo se puede utilizar para otras análisis a parte de micotoxinas (tales como pesticidas)
- Bueno para análisis de micotoxinas múltiples
- Bueno para confirmación de micotoxinas
- Requiere equipo de laboratorio
- Triple Quad (MS/MS) da mejores resultados (limites de detección y confirmación más bajas)
- Mejor para científicos con buena formación
- Requiere medición exacta y almacenamiento de micotoxinas para resultados precisos
- Requiere el uso de una matriz coincidente a los estándares de calibración o calibradores internos para ajustar a los efectos de la matriz



Cosecha

- Monitoreo
- Confirmación



Almacenamiento

- Segregación
- Control de calidad antes de procesar



Productos Terminados

- Control de calidad en laboratorio
- Antes de importación o exportación

- Qué son las micotoxinas?
 - Productos metabólicos de hongos en alimentos deteriorados que inducen respuestas tóxicas
- Dónde se encuentran las micotoxinas?
 - Granos, nueces, frutos, especias, café, cacao, bebidas alcohólicas
- Regulaciones de micotoxinas
 - Regulaciones en todo el mundo
- Como probar para las micotoxinas
 - Tiras de flujo lateral, columnas de inmunoafinidad, kits rápidos y métodos con ensayos
- Controlar las micotoxinas
 - Almacenamiento y manipulación adecuados y segregación de materiales contaminados

**Gracias por su
atención**

nancyz@vicam.com



Cultivating
SUCCESS through
science