

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Determinación de aflatoxinas en alimentos veganos :
bioaccesibilidad y neurotoxicidad in vitro**

**Determination of aflatoxins in vegan foods : bioaccessibility
and neurotoxicity in vitro assays**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Iván Romero Sánchez

DIRIGIDA POR

María Yolanda Madrid Albarrán
Emma Gracia Lor

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS VEGANOS:
BIOACCESIBILIDAD Y NEUROTOXICIDAD IN VITRO.

DETERMINATION OF AFLATOXINS IN VEGAN FOODS:
BIOACCESSIBILITY AND NEUROTOXICITY IN VITRO ASSAYS.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Iván Romero Sánchez

DIRECTORAS

María Yolanda Madrid Albarrán
Emma Gracia Lor

Madrid, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA AVANZADA



TESIS DOCTORAL

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS VEGANOS:
BIOACCESIBILIDAD Y NEUROTOXICIDAD IN VITRO.

DETERMINATION OF AFLATOXINS IN VEGAN FOODS:
BIOACCESSIBILITY AND NEUROTOXICITY IN VITRO ASSAYS.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Iván Romero Sánchez

DIRECTORAS

María Yolanda Madrid Albarrán
Emma Gracia Lor

Madrid, 2024

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco de los Proyectos de Investigación financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-114714RB-I00), la Comunidad Autónoma de Madrid y los fondos europeos de los programas FEDER (S2018/BAA-4393 (AVANSECAL-II-CM)), y la Comunidad de Madrid bajo el Acuerdo Plurianual con la Universidad Complutense en el marco del Programa para Estimular la Investigación de Jóvenes Doctores, en el contexto del V PRICIT (Programa Regional de Investigación e Innovación Tecnológica PR65/19-22432).

Se agradece la financiación recibida a través de los contratos de Personal Investigador Predoctoral en Formación de la Universidad Complutense de Madrid y el Banco Santander (CT63/19-CT64/19) y de La Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo a través de la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) (PEJ-2019-AI/BIO-13561) para desarrollar el trabajo de investigación presentado.

Con la presentación de esta tesis concluye la que posiblemente haya sido la etapa más difícil, a la par que gratificante, de mi vida académica, profesional y personal.

Un compromiso que, si bien ha sido particularmente difícil de cumplir, me ha permitido dar mi mejor versión profesional y humana para recorrer un camino hacia lo desconocido en el que me he caído y me he levantado más veces de las que recuerdo, siempre con la inestimable ayuda de algunas personas maravillosas. En definitiva, un camino que ha contribuido a forjar al hombre que soy ahora.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la Universidad Complutense de Madrid y al Banco Santander por haberme dado la oportunidad de emprender esta odisea mediante la financiación de mi beca predoctoral, en un claro ejemplo de cómo la colaboración entre los sectores público y privado es de vital importancia para el avance científico, enriqueciendo así a la sociedad. En cuanto a la Universidad Complutense, para mí ha sido un honor formar parte de una institución universitaria y pública de tal prestigio, y me emociona profundamente haber dejado mi pequeña huella en este templo del saber con esta Tesis Doctoral.

También me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a los sindicatos universitarios por su valiosa labor sindical, que posibilitó la apertura de los contratos de Personal Ayudante de Investigación a los solicitantes foráneos a la Comunidad de Madrid, ofreciendo así la oportunidad de optar a estos contratos a una nueva generación de jóvenes aspirantes a científicos procedentes de toda España, entre los que yo me encuentro. Madrid no sería hoy tan grande sin todos aquellos que vinieron, vienen y vendrán a esta ciudad desde todos los rincones de España para dar lo mejor de sí mismos.

En la esfera de lo cotidianamente humano, he de decir que esta tesis hoy no sería posible sin el apoyo y la confianza de muchas personas que han contribuido a hacerla realidad. Personas que me han brindado oportunidades, personas que me han apoyado y personas que me han inspirado a seguir adelante.

En primer lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a mis dos directoras de tesis, Yolanda y Emma, por haberme guiado a lo largo de este viaje. En especial a Yolanda, que depositó su confianza en mí y me brindó la oportunidad para realizar esta tesis en su grupo de investigación. También me gustaría agradecerle su paciencia, su flexibilidad y su comprensión conmigo y con mis circunstancias.

Sin embargo, hay personas para las que no existen suficientes palabras de agradecimiento, personas que me han acompañado como copilotos de viaje durante el largo periplo de la Tesis. Por supuesto, me refiero a David, Alejandro, Esther y Rodrigo. Cuando comencé la andadura profesional, ellos ya estaban ahí y, desde el primer momento, me acogieron como uno de los suyos y me apoyaron a un nivel profesional, humano y emocional. Lo que comenzó siendo una excelente relación profesional con los mejores compañeros de trabajo que uno podría desear, pronto se convirtió en un vínculo indisoluble de amistad personal y de apoyo que ha perdurado en el tiempo, fuerte y duradero, a pesar de que nuestros caminos profesionales se han ido separando con el paso del tiempo.

Juntos hemos recorrido este inhóspito desierto, que fue hostil, duro y agreste durante gran parte de la andadura, pero también hermoso durante las paradas que hicimos a lo largo del camino, en las que nos sentábamos a observar la belleza de las vistas en la mejor compañía posible. Siempre recordaré la compañía que nos hacíamos en el laboratorio incluso hasta horas intempestivas, el apoyo mutuo que nos dimos para protegernos los unos a los otros, e incluso las bromas con las que nos divertíamos en los días más oscuros, y las cervezas que nos tomábamos juntos en el despacho después de las largas jornadas de trabajo, mientras el Sol se ponía por las ventanas del despacho. También recordaré aquel viaje tan especial que hice con David y con Esther a Italia, en el que juntos descubrimos todo el esplendor de la ciudad eterna, empoderados por la juventud y la ilusión, así como la visita que me hicieron durante mi estancia en Braga, que llegó como agua de mayo en un momento de particular desasosiego. Nunca olvidaré todo lo que me habéis enseñado, ni todo lo que habéis hecho por mí, y siempre estaré en deuda con vosotros, porque sin vuestro apoyo, no habría conseguido llegar al final del camino.

También me gustaría expresar mi particular agradecimiento a los miembros del grupo de Micología Aplicada de la Universidade Do Minho (Braga), que me acogieron con los brazos abiertos durante mi estancia internacional y me trataron como a uno más. Especial agradecimiento a Armando Venâncio por darme la oportunidad de colaborar con un grupo de tan elevado prestigio y potencial humano, así como a Teresa, por enseñarme todo lo que aprendí allí y, en especial, a Celia Soares, por su dulzura, por su alegría, por su apoyo desinteresado, y por cuidar de mi durante aquella etapa. Celia, por favor, no cambies nunca, porque este mundo necesita desesperadamente más gente como tú,

gracias a ti recuperé la fe en la bondad de las personas. Finalmente, no puedo olvidar a Víctor, quien, al igual que yo, se hallaba de estancia allí y gracias al cual nunca me sentí solo, no solamente por nuestro vínculo como hispanohablantes, sino por su valiosa compañía hasta que tuvo que volverse a Chile.

Especial mención merecen también aquellas personas de mi grupo de investigación en particular, y de la facultad en general, que siempre me ayudaron de manera desinteresada y bondadosa, y que, sin saberlo, siempre aportan un poco de luz sobre la niebla del día a día de los demás, como Eugenia, siempre dispuesta a compartir su conocimiento y su experiencia, así como Noelia, Teresa, Jon, Juanjo, Milagros o Riansares, entre otros.

También me gustaría agradecer a todas aquellas personas que siempre estuvieron ahí para facilitarme la labor diaria en esos días interminables en los que el trabajo nunca acababa, como los técnicos del Departamento de Química Analítica y las señoras de la limpieza, así como a otras personas que me han facilitado los asuntos burocráticos, como María Pedrero. Especial mención para Jorge, ese muchacho tan especial del Departamento de Bioquímica que me asesoró y me aconsejó en innumerables ocasiones con su experiencia en los temas bio-, siempre dispuesto a ayudarme sin pedir nada a cambio. Y tampoco puedo olvidar a alumnos de TFG como Irene, cuya colaboración fue vital para publicar mi tercer trabajo.

Por último, y no por ello menos importante, me gustaría agradecer el inmenso apoyo de todas aquellas personas ajenas al mundo académico que, no obstante, han sido pilares fundamentales para mí durante el desarrollo de la Tesis. En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis padres, Manuela y Jorge, por su inquebrantable apoyo y por sus buenos consejos para afrontar las dificultades que me fui encontrando a lo largo del camino, sin los cuáles yo no hubiera tenido la oportunidad de llegar hasta donde he llegado. Esta tesis se la dedico a ellos, por el esfuerzo que hicieron para educarme y darme las oportunidades que ellos no pudieron tener, sin olvidar tampoco a mi hermana Beatriz ni a mi sobrino Jorge, al cual también le dedico este trabajo, con la esperanza de que le inspire para acometer grandes empresas cuando sea mayor.

Especial mención requiere mi pareja, Irene, para la que no encuentro palabras de agradecimiento, por tratarse de la persona que más me ha apoyado durante este trámite, desde el momento en el que me concedieron la beca hasta el final de la odisea. Después

de mí, ella ha sido la persona que más cara ha pagado la factura personal y emocional que ha provocado el desempeño de esta Tesis Doctoral. Ella hizo parte de los sacrificios que exigía este logro académico, renunciando a innumerables horas de nuestro tiempo libre juntos, resignándose a vivir separados mientras yo trabajase en esto, y sufriendo por mí y por nosotros mientras veía cómo el esfuerzo me iba convirtiendo en alguien que no quería ser, muy a mi pesar, y nos hacía infelices a los dos. Afortunadamente, todo eso ya pasó y ahora tengo la oportunidad de recompensarla como ella se merece por todos sus sacrificios. Siempre te estaré agradecido.

Para concluir, sería injusto no incluir en mis agradecimientos a algunos amigos y conocidos que fui encontrando por el camino y que también me han ayudado a lograr este esfuerzo, como mi amigo y compañero de piso Dani, que ha sido un gran apoyo para mí desde que le conocí, en especial durante los tiempos más duros de la Tesis, en los que noche tras noche me recibía con su habitual sonrisa, y escuchaba mis tediosas quejas laborales con paciencia y cariño. Especial mención también para sus padres, Luis y Pilar, que en cierto modo han velado por mí como padres suplentes durante todo el tiempo que he estado con su hijo, brindándome su apoyo y su ayuda para que pudiera escribir la Tesis de la forma más cómoda posible. Tampoco me quiero olvidar de Diana, Julia o Antonio, personas muy especiales que también fueron un apoyo, en especial Diana, que coincidió conmigo en la Facultad y siempre estuvo muy pendiente de mi bienestar incluso cuando ella también estaba inmersa en momentos difíciles. Por favor, Diana, nunca cambies.

Tampoco podría olvidar a César, un apoyo al que tardé demasiado en recurrir, y que me ayudó a recuperar el rumbo cuando me encontraba totalmente perdido en la oscuridad. Muchas gracias por tu ayuda profesional.

Para finalizar, me gustaría ofrecer este trabajo académico como una humilde ofrenda a mis ancestros y a mi tierra de origen, La Mancha, un lugar de cuyo nombre siempre querré acordarme, y que siempre llevo en el corazón. Orgulloso de ser manchego.

A la memoria de mi abuelo Lorenzo.

El conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.

Louis Pasteur

ÍNDICE

ÍNDICE

I. GLOSARIO DE TÉRMINOS	19
II. RESUMEN	29
III. SUMMARY	35
IV. INTRODUCCIÓN.....	39
1. Antecedentes históricos de exposición a las micotoxinas.	39
2. Definición de micotoxina.	40
3. Clasificación de las micotoxinas.....	41
3.1. Clasificación según las especies fúngicas productoras.	41
3.2. Clasificación según la estructura química de la micotoxina.....	46
3.3. Clasificación en función de su potencial carcinogénico.....	56
4. Biosíntesis fúngica y condiciones de producción micotoxigénica.....	57
4.1. Factores abióticos que influyen en la síntesis micotoxigénica (climáticos y químicos).....	59
4.2. Factores eco-fisiológicos que influyen en la síntesis micotoxigénica.....	60
5. Micotoxinas estructuralmente modificadas, enmascaradas o crípticas.	61
6. Rutas de exposición más comunes.	63
7. Biodisponibilidad oral de las micotoxinas.....	64
7.1. Bioaccesibilidad.....	65
8. Propiedades, toxicidad y metabolismo de las micotoxinas objeto de estudio.....	71
8.1. Aflatoxinas y esterigmatocistina.	71
8.2. Ocratoxina A.....	77
9. Presencia de micotoxinas en alimentos.....	80
10. Estrategias de prevención y detoxificación de micotoxinas en cultivos y alimentos.	99
10.1. Prevención.....	99
10.2. Detoxificación.....	100
11. Legislación vigente con relación a la presencia de micotoxinas en alimentos....	107
11.1. Legislación internacional de carácter no obligatorio: el Codex Alimentarius.	107
11.2. Legislación obligatoria aplicable en la Unión Europea.....	109
12. Metodologías para el análisis de aflatoxinas en alimentos.....	113
12.1. Preparación de la muestra.....	114

12.2. Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) para el análisis de aflatoxinas	126
V. REFERENCIAS	137
VI. OBJETIVOS	171
VII. OBJECTIVES	175
VIII. PARTE EXPERIMENTAL	179
1. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A AFLATOXINAS PRESENTES EN ARROZ Y EN BEBIDAS VEGETALES.....	179
Artículo 1: Determinación simultánea de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en arroces comerciales mediante el uso de columnas de inmunoafinidad y de HPLC-MS/MS..	185
Artículo 2: Detoxificación de aflatoxinas mediante tratamiento de cocinado hidrotérmico y evaluación de la bioaccesibilidad <i>in vitro</i> a partir de arroz blanco e integral.	201
Artículo 3. Análisis y evaluación de la bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en bebidas vegetales.....	223
2. POTENCIAL NEUROTÓXICO DE LAS MICOTOXINAS	239
Artículo 4. Efectos neurotóxicos de micotoxinas sobre la línea celular de neuroblastoma humano y sobre la agregación del péptido β amiloide. Efecto protector de la curcumina y la cafeína.	241
IX. DISCUSIÓN INTEGRADORA	313
X. CONCLUSIONES.	345
XI. CONCLUSIONS.	351
XII. Anexo-Producción Científica	357
A.1. Artículos científicos incluidos en la Tesis Doctoral.....	357
A.2. Otros artículos científicos.	357
A.3. Comunicaciones a Congresos.	358
A.4. Estancias de investigación y colaboraciones.	359

I. GLOSARIO DE ***TÉRMINOS***

I. GLOSARIO DE TÉRMINOS

A β ₁₋₄₂	Péptido β Amiloide (Fragmento 1-42) Amyloid β Peptide (1-42 Fragment)
ACN	Acetonitrilo Acetonitrile
AFAR	Aflatoxina Aldehído Reductada Aflatoxin Aldehyde Reductase
AFB1	Aflatoxina B1 Aflatoxin B1
AFB1-FAPy	Aducto AFB1-Formamidopiridina AFB1-Formamidopyridine Adduct
AFB2	Aflatoxina B2 Aflatoxin B2
AFBO	Aflatoxina B1-8,9 (Endo-,Exo-)-Epóxido Aflatoxin B1-8,9 (Endo-,Exo-)-Epoxide
AFG1	Aflatoxina G1 Aflatoxin G1
AFG2	Aflatoxina G2 Aflatoxin G2
AFM1	Aflatoxina M1 Aflatoxin M1
AFM2	Aflatoxina M2 Aflatoxin M2
AFs	Aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) Aflatoxins (B1, B2, G1 and G2)
ALN	Altenusina Altenusin
ALT	Altenueno Altenuene
ALX-I	Altertoxina I Altertoxin I
ALX-II	Altertoxina II Altertoxin II
ALX-III	Altertoxina III Altertoxin III
AME	Alternariol Monometil Éter Alternariol Monomethyl Ether

ANOVA	Análisis de la Varianza Analysis of the Variance
AOH	Alternariol Alternariol
AP-Site	Sitio Apurínico Apurinic Site
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
APPI	Fotoionización a Presión Atmosférica Atmospheric Pressure Photoionization
ATA	Aleucia Tóxica Alimentaria
aw	Actividad de Agua Water Activity
BEA	Beauvericina Beauvericin
BBB	Barrera Hematoencefálica Blood-Brain Barrier
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas Good Agricultural Practices
C-18	N-Octadecilo N-Octadecyl
cHPLC-DAD/MS	Cromatografía Líquida Capilar de Alta Resolución acoplada a Detección de Fotodiodos y a Espectrometría de Masas Simple Capillary High-Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detection and Simple Mass Spectrometry
CID	Disociación Inducida por Colisión Collision Induced Dissociation
CIT	Citrinina Citrinin
CO ₂	Dióxido de Carbono Carbon Dioxide
CPA	Ácido ciclopiazónico Cyclopiazonic Acid
CUL	Culmorina Culmorin
CYP450	Complejo del Citocromo P450 Cytochrome Complex P450
DAD	Detección de Fotodiodos Diode Array Detector

DLLE	Extracción Líquido-Líquido Dispersiva Dispersive Liquid-Liquid Extraction
DLLME	Micro-extracción Líquido-Líquido Dispersiva Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction
DMSO	Dimetilsulfóxido Dimethyl Sulfoxide
DNA	Ácido Desoxirribonucleico Deoxyribonucleic Acid
DOM-1	Deepoxi-Deoxinivalenol Deepoxy-Deoxynivalenol
DON	Deoxinivalenol Deoxynivalenol
DPEP	Dipeptidasa Dipeptidase
EAs	Alcaloides Ergóticos Ergotic Alkaloids
EB2	Polímero de Estireno-Divinilbenceno Esférico Modificado con Pirrolidona y Urea Extrabond Polymeric Modified with Urea
EBH	Polímero de Estireno-divinilbenceno Esférico Modificado con Pirrolidona Extrabond Polymeric
EE.UU	Estados Unidos United States
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria European Food Safety Authority
ENNs	Eniatinas (B, B1, A y A1) Enniatins (B, B1, A and A1)
ESI	Ionización por Electrospray Electrospray Ionization
EtOH	Etanol Ethanol
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Food and Agriculture Organization
FAs	Fumonisinias de tipo A Type A Fumonisins
FBs	Fumonisinias de tipo B Type B Fumonisins
FC	Frecuencia de Contaminación en Muestras Totales (%)

FCs	Fumonisin de tipo C Type C fumonisins
FLD	Detector de Fluorescencia Fluorescence Detector
FPs	Fumonisin de Tipo P Type P Fumonisin
FS	Barrido Completo Full Scan
FUSA	Fusaproliferina Fusaproliferin
FX	Fusarenon X Fusarenon X
GC	Cromatografía de Gases Gas Chromatography
GGT	γ -Glutamyltranspeptidasa γ -Glutamyltransferase
GMF/A	Microfibra de Vidrio Glass Microfiber
GSH	Glutación Reducido Reduced Glutathione
GST	Glutathione S-Transferasa Glutathione S-Transferase
GT	Gliotoxina Gliotoxin
H ₂ O	Agua Water
HAc	Ácido Acético Acetic Acid
HCOOH	Ácido Fórmico Formic Acid
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia High Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a Detección por Espectrometría de Masas High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry
HPLC-MS/MS	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a Detección por Espectrometría de Masas en Tándem High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry

HPLC-MS/QqQ	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a Detección por Espectrometría de Masas en Tándem de Triple Cuadrupolo High Performance Liquid Chromatography coupled to Triple Quadrupole
HSD	Isoenzimas 3- α y 3- β Hidrogenasas Hidroxiesteroideas 3- α , 3- β Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoenzymes
IAC	Columna de Inmunofinidad Immunoaffinity Column
IARC	Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer International Agency Research of Cancer
LC	Cromatografía Líquida Liquid Chromatography
LC-FLD	Cromatografía Líquida acoplada a Detección por Espectrofotometría de Fluorescencia Liquid Chromatography coupled to Fluorescence Detection
LC-MS	Cromatografía Líquida acoplada a Detección por Espectrometría de Masas Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry
LC-UV-Vis	Cromatografía Líquida acoplada a Detección por Espectrofotometría UV-Visible Liquid Chromatography coupled to UV-Visible Detection
LC ₅₀	Concentración Letal para el 50% de la Población Celular Lethal Concentration at 50% of Dead Cell Population
LLE	Extracción Líquido-Líquido Liquid-Liquid Extraction
LO-OTA	Lactona-Ocratoxina A Lactone-Ochratoxin A
LOD	Límite de Detección Limit of Detection
LOQ	Límite de Cuantificación Limit of Quantification
m/z	Relación Masa/Carga Mass/Charge Ratio
MAX	Polímero de Polaridad Mixta con Grupos de Intercambio Aniónico Mixed-Mode Polymeric Anion-Exchange
MCX	Polímero de Polaridad Mixta con Grupos de Intercambio Catiónico Mixed-Mode Polymeric Cation-Exchange
MeOH	Metanol Methanol
MERCOSUR	Mercado Común del Sur

MIPs	Polímeros de Impronta Molecular Molecular Imprinted Polymers
MOE	Margen de Exposición Margin of Exposure
MON	Moniliformina Moniliformin
MRM	Monitorización por Reacción Múltiple Multiple Reaction Monitoring
MS	Espectrometría de Masas Mass Spectrometry
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tándem Tandem Mass Spectrometry
MSPD	Dispersión de Matriz en Fase Sólida Matrix Solid-Phase Dispersion
MSPE	Extracción Magnética en Fase Sólida Magnetic Solid-Phase Extraction
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NAT	N-Acetiltransferasa N-Acetyltransferase
ND	No Detectado Not Detected
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno Reactive Nitrogen Species
OMS	Organización Mundial de la Salud
WHO	World Health Organization
OT α	Ocratoxina α Ochratoxin α
OT β	Ocratoxina β Ochratoxin β
OTA	Ocratoxina A Ochratoxin A
OTB	Ocratoxina B Ochratoxin B
OTC	Ocratoxina C Ochratoxin C
PAT	Patulina Patulin

PBS	Tampón Fosfato Salino Phosphate Buffered Saline
PCA	Análisis de Componentes Principales Principal Component Analysis
PCA	Ácido Penicílico Penicillic Acid
PSA	Aminas Primarias y Secundarias Primary and Secondary Amines
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno Polyvinylidene Fluoride
Q-TOF	Cuadrapolo - Tiempo de Vuelo Time on Flight - Quadrupole
Q-Orbitrap	Cuadrapolo Orbitrap Orbitrap Quadrupole
QqQ	Triple Cuadrapolo Triple Quadrupole
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Resistente y Seguro Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RASFF	Sistema Europeo de Alerta Rápida en Piensos y Alimentos Rapid Alert System Feed and Food
Ratio S/N	Relación Señal/Ruido Signal-to-Noise Ratio
RNA	Ácido Ribonucleico Ribonucleic acid
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno Reactive Oxygen Species
rpm	Revoluciones por Minuto Revolutions Per Minute
SIM	Monitorización de Ión Único Selected Ion Monitoring
SPE	Extracción en Fase Sólida Solid-Phase Extraction
SSTs	Sulfato S-Transferasas Sulphate S-Transferases
STG	Esterigmatocistina Sterigmatocystin
TDI	Ingesta Diaria Tolerable Tolerable Daily Intake ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Body Weight/day)

TeA	Ácido Tenuazónico Tenuazonic Acid
TEM	Microscopía de Transmisión Electrónica Transmission Electronic Microscopy
TEN	Tentoxina Tentoxin
Test LSD Fisher	Test de Comparaciones Múltiples de Fisher Least significant Difference Fisher Test
TFA	Ácido Trifluoroacético Trifluoroacetic Acid
TOF	Tiempo de Vuelo Time on Flight
UE	Unión Europea European Union
UGTs	Uridina 5'-Difosfo-Glucuronosiltransferasas Uridine 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferases Cromatografía Líquida de Ultra Resolución acoplada a Detección por Espectrometría de Masas en Tándem
UHPLC-MS/MS	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry
UV-Vis	Ultravioleta-Visible Ultraviolet-Visible
ZAN	Zearalanona Zearalanone
ZEA	Zearalenona Zearalenone
α -ZAL	α -zearalanol
α -ZOL	α -zearalenol
β -ZAL	β -zearalanol
β -ZOL	β -zearalenol
3-acetil-DON	3-Acetil-Deoxinivalenol 3-Acetyl-Deoxynivalenol
15-acetil-DON	15-Acetil-Deoxinivalenol 15-Acetyl-Deoxynivalenol
4-OH-OTA	4-Hidroxi-Ocratoxina A 4-Hydroxy-Ochratoxin A
10-OH-OTA	10-Hidroxi-Ocratoxina A 10-Hydroxy-Ochratoxin A

II. RESUMEN

II. RESUMEN

La exposición oral a micotoxinas constituye un riesgo para la salud humana y animal debido a la elevada toxicidad de estos compuestos y a su frecuente aparición en cultivos y alimentos procesados. Entre las micotoxinas de mayor toxicidad se encuentran las aflatoxinas, ya que causan un amplio rango de toxicidades a niveles agudo y crónico y se hallan fuertemente involucradas en procesos carcinogénicos. Por ello, el control de su presencia en los alimentos, y el efecto del cocinado y de la digestión gastrointestinal del alimento sobre las aflatoxinas constituyen una aproximación transversal y realista para evaluar los riesgos de exposición a estas sustancias.

La presente Tesis Doctoral titulada “Determinación de aflatoxinas en alimentos veganos: bioaccesibilidad y neurotoxicidad in vitro” aborda el riesgo a la exposición a las micotoxinas mediante un triple enfoque basado en los siguientes aspectos: 1) Desarrollo de metodologías para el análisis de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (AFs) en distintas variedades de arroz y bebidas vegetales, adquiridas comercialmente; 2) Evaluación de su bioaccesibilidad mediante la aplicación de sistemas de digestión in vitro sobre estos alimentos, y el efecto detoxificante del cocinado; 3) Evaluación de la neurotoxicidad in vitro de las AFs, la ocratoxina A (OTA) y la esterigmatocistina (STG) mediante su capacidad agregante sobre el péptido A β ₁₋₄₂ y su citotoxicidad empleando la línea celular neuronal SH-SY5Y.

La determinación de las aflatoxinas en las muestras seleccionadas se basó en el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), aplicando distintas metodologías de extracción y purificación de los extractos. La extracción de las aflatoxinas en distintas variedades de arroz comerciales (blanco, integral, basmati, jazmín) se llevó a cabo empleando metanol: agua (80:20, v/v) como extractante, seguido de una etapa de purificación y preconcentración mediante columnas de inmunoafinidad (IAC). Con relación a las muestras de bebidas vegetales comerciales (de arroz, avena, almendra y soja), la extracción se realizó con metanol al 33%, seguido de la eliminación de las grasas con hexano y de la purificación y preconcentración de analitos mediante extracción en fase sólida (SPE) de balance hidrofílico-lipofílico formado por una estructura polimérica (HLB). Las metodologías desarrolladas se caracterizaron en términos de exactitud,

linealidad y precisión. La aplicación de cada metodología detectó la presencia de la aflatoxina B1 en dos muestras de arroz comerciales y de las aflatoxinas B1, B2 y G1 en una muestra de bebida vegetal, confirmando la utilidad de los métodos desarrollados para la monitorización efectiva de aflatoxinas en este tipo de productos de elevado consumo.

Otro aspecto fundamental abordado en esta Tesis Doctoral es el comportamiento digestivo de las AFs tras su ingestión mediante la aplicación de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* que simula a escala laboratorio cada una de las etapas del proceso de digestión (salivar, gástrica y duodenal). Este proceso permitió además determinar la bioaccesibilidad de las aflatoxinas en los alimentos seleccionados. Para el arroz, la bioaccesibilidad fue evaluada en cada una de las etapas digestivas (salivar, gástrica y duodenal) empleando dos variedades de arroz (blanco e integral) y fortificados con una cantidad conocida de AFs. Los resultados obtenidos confirman un comportamiento similar entre aflatoxinas, su mayor bioaccesibilidad en arroz blanco que en el integral, así como una influencia determinante de la etapa digestiva gástrica sobre la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas presentes en el arroz integral. Paralelamente, la capacidad detoxificante del cocinado por cocción de ambos tipos de arroz confirmó la inestabilidad de las aflatoxinas G frente al tratamiento, así como el potencial de extracción del agua de cocción sobre las aflatoxinas, resultando superior en el arroz integral. En el caso de las bebidas vegetales se evaluó únicamente la bioaccesibilidad final de las AFs al término de la digestión duodenal y se compararon los valores obtenidos entre las bebidas vegetales seleccionadas (arroz, avena, almendra y soja) debido a sus diferencias en composición. En este caso, la bioaccesibilidad está influenciada por el tipo de aflatoxina y por la composición de la bebida vegetal, lo cual, evidencia la relevancia de la matriz alimentaria en el comportamiento digestivo de las aflatoxinas.

La Tesis Doctoral concluye con la evaluación del potencial neurotóxico *in vitro* de las AFs, la OTA y la STG, empleando dos aproximaciones: su capacidad agregante sobre el péptido A β ₁₋₄₂ y su citotoxicidad sobre la línea celular neuronal SH-SY5Y. Los resultados obtenidos mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) evidenciaron la capacidad de las aflatoxinas B1 y G1, la STG y en menor grado, la OTA, para agregar el péptido amiloide, mientras que los resultados de viabilidad celular empleando un ensayo MTT mostraron la elevada citotoxicidad de la STG y la OTA en comparación a las aflatoxinas G1 y B1, resultando ésta última la menos citotóxica. De manera adicional, la coadministración de la curcumina y de la cafeína con cada

micotoxina pueden reducir el efecto agregante de las aflatoxinas y la STG, así como la citotoxicidad de la aflatoxina B1, la OTA y la STG, lo que confirma su potencial efecto neuroprotector frente a estas micotoxinas.

III. SUMMARY

III. SUMMARY

Oral exposure to mycotoxins poses a serious risk to human and animal health due to their high toxic potential and frequent occurrence in crops and processed foods. Among the most toxic mycotoxins are aflatoxins, which cause a wide range of acute and chronic toxicities and are strongly implicated in carcinogenic processes. Consequently, controlling their presence in food and evaluating the effect of cooking and gastrointestinal digestion on the integrity of aflatoxins constitute a transversal and realistic approach to correctly evaluate the harmful effects of aflatoxins.

The Doctoral Thesis entitled "Determination of Aflatoxins in vegan foods: bioaccessibility and neurotoxicity in vitro assays", evaluates the risk of exposure to mycotoxins by applying a multi-faceted approach: 1) Development of analytical methodologies for the analysis of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 (AFs) in rice and plant-based beverages commercially acquired; 2) Evaluation of their bioaccessibility through the application of in vitro gastro-digestion assay and the detoxifying effect of cooking 3) Evaluation of neurotoxicity of AFs, ochratoxin A (OTA), and sterigmatocystin (STG) by means of their aggregating capacity on the A β ₁₋₄₂ peptide and their cytotoxicity on the SH-SY5Y neuronal cell line

The developed methodology to determine aflatoxins in the selected samples is based on the use of high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and by applying different extraction and clean-up procedures. Related to rice samples (white, brown, basmati, jasmine), aflatoxins were extracted (with a mixture of methanol : water (80:20, v/v), followed by a purification and preconcentration step using immunoaffinity columns (IAC). In the case of plant-based beverages (rice, oat, almond, and soy), AFs were extracted by using methanol (33%), followed by the removal of fat content with hexane and purification and preconcentration of analytes through solid-phase extraction (SPE) using a cartridge with a polymeric structure and hydrophilic-lipophilic balance (HLB). The developed methods were characterized in terms of accuracy, linearity, and precision. The application of the optimized methodologies allowed us to detect the presence of aflatoxin B1 in two rice samples and aflatoxins B1, B2, and G1 in one plant-based beverage sample, confirming

the effectiveness of both methodologies for monitoring aflatoxins in these highly consumed food products.

Another fundamental aspect addressed in this Doctoral Thesis is the digestive behavior of AFs after being ingested. For this purpose, an *in vitro* gastro-intestinal digestion assay was applied to the selected foods, and bioaccessibility of aflatoxins was calculated. For rice, bioaccessibility was evaluated at each of the digestive stages (salivary, gastric, and duodenal) in two varieties of rice (white and brown) fortified with aflatoxins. The results confirm similar behavior among aflatoxins, with the highest bioaccessibility of aflatoxins found in white rice, and a decisive influence of the gastric digestive stage on the final bioaccessibility of aflatoxins in brown rice. Additionally, the detoxifying capacity of cooking the rice by boiling confirms the instability of G aflatoxins to humid heat treatment and the potential of the hot water used for cooking to extract aflatoxins, being this effect higher for brown rice. For plant-based beverages (rice, oat, almond, and soy) only the final bioaccessibility at the end of duodenal digestion was evaluated to evaluate the effect of food matrix. In this case, bioaccessibility was influenced by the type of aflatoxin and, to a lesser extent, by the beverage's composition, which confirms again the important role of the food matrix in the digestive behavior of aflatoxins.

Finally, the Doctoral Thesis evaluates the *in vitro* neurotoxic potential of AFs, OTA, and STG through their aggregating capacity on the A β ₁₋₄₂ peptide and their cytotoxicity on the SH-SY5Y neuronal cell line. Results from Transmission electron microscopy (TEM) show that Aflatoxins B1 and G1, STG, and, to a lesser extent, OTA, exhibit significant capacity to aggregate the amyloid peptide, while cell viability data from a MTT assay evidenced that STG and OTA exert greater cytotoxicity than aflatoxins G1 and B1, with the latter being the least cytotoxic. Additionally, the coadministration of curcumin and caffeine with each mycotoxin decreases the aggregating effect of aflatoxins and STG as well as the cytotoxicity of aflatoxin B1, OTA, and STG, confirming their neuroprotective potential effect against these mycotoxins.

IV. INTRODUCCIÓN

IV. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos de exposición a las micotoxinas.

La presencia de micotoxinas y los efectos derivados de su exposición sobre la salud humana y animal ha sido una constante a lo largo de la historia. La exposición a estas toxinas naturales está fuertemente ligada al auge y desarrollo de la agricultura, ya que estos compuestos son producidos por una amplia variedad de hongos de presencia ubicua en el medio ambiente, y con gran prevalencia en toda la cadena alimentaria. Por tanto, el riesgo de exposición a las micotoxinas se remonta a la aparición de la propia agricultura (Pitt & David Miller, 2017). A lo largo de la historia se han reportado epidemias recurrentes en humanos y animales causadas por micotoxinas. Dentro de las más conocidas se encuentran las causadas por los alcaloides ergóticos, una familia de micotoxinas producidas por el hongo *Claviceps purpurea* que causan el síndrome del ergotismo, caracterizado por síntomas conocidos como “Fuego de San Antonio” (gangrenoso) y “baile de San Vito” (convulsivo). Esta grave enfermedad asociada con la ingestión de cereales (como el centeno) contaminados con los alcaloides ergóticos ha provocado la muerte de al menos cientos de miles de personas en todo el mundo durante el último milenio (Ayarragaray, 2014). Otras enfermedades asociadas con la exposición a micotoxinas son el beriberi cardíaco (vinculado con la exposición a la micotoxina citreoviridina presente en arroces contaminados con el hongo *Penicillium citreonigrum* y de gran incidencia en Japón y Brasil) (Uraguchi, 1978) y la aleucia tóxica alimentaria (ATA), una enfermedad provocada por la exposición a algunos tricotecenos como la toxina T-2, que causó la muerte de centenares de miles de personas en Europa del Este y Rusia durante la primera mitad del siglo XX (Pohland, 1993). Algunas toxinas producidas por el hongo *Penicillium* como la ocratoxina A (OTA) también han sido vinculadas con la aparición de una nefropatía endémica de los Balcanes (Stiborová et al., 2016).

El término "micotoxina" fue introducido por primera vez en el vocabulario científico y sanitario como consecuencia de la crisis veterinaria ocurrida en Londres en 1962 por la exposición de pavos a piensos contaminados con aflatoxinas producidas por las especies del género *Aspergillus*, lo que provocó la muerte de hasta 100.000 de estos animales. Este suceso alertó a las autoridades sanitarias sobre la existencia de una serie de metabolitos tóxicos desconocidos producidos por determinadas especies de hongos filamentosos (principalmente mohos). Estos metabolitos tóxicos fueron agrupados dentro

de la categoría de micotoxinas juntamente con otros metabolitos ya conocidos con anterioridad, como los alcaloides ergóticos o la patulina. Desde entonces, la búsqueda de nuevas micotoxinas y el estudio de su toxicidad y prevalencia ha crecido exponencialmente (Cole, 1986).

2. Definición de micotoxina.

Las micotoxinas se definen como metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, principalmente pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, *Claviceps* y *Alternaria*. Sin embargo, resulta ciertamente complicado definir el término micotoxina de una forma simple y concreta, ya que este término abarca diferentes familias de hasta 400 compuestos con diferentes estructuras, masas moleculares (entre 100-500 g/mol), y producidos por una amplia variedad de hongos en múltiples circunstancias, pero que tienden a estar interrelacionados entre sí a nivel químico y metabólico (Cole & Cox, 1981).

Por tanto, las micotoxinas constituyen un conjunto amplio y muy heterogéneo desde un punto de vista químico y toxicológico. Sin embargo, el interés científico se ha centrado solamente en una veintena de compuestos, por ser los que se encuentran en los productos alimenticios en niveles y prevalencia significativos como para suponer un riesgo para la seguridad alimentaria. Resulta importante destacar que las micotoxinas no son los únicos metabolitos secundarios producidos por los hongos. Sin embargo, el término micotoxina se aplica exclusivamente a aquellos metabolitos producidos por el metabolismo secundario de hongos y que pueden suponer un riesgo toxicológico para vertebrados y otros animales en concentraciones muy bajas, descartando así los metabolitos fúngicos que solamente son tóxicos para bacterias (antibióticos) o plantas (fitotoxinas), así como los que solamente son tóxicos para vertebrados a altos niveles de exposición (etanol, EtOH), de acuerdo con Bennett, 1987 y Bennett & Klich, 2003.

Con respecto a los hongos productores, solamente los metabolitos sintetizados por los hongos filamentosos de tipo moho (microhongos) son categorizados como micotoxinas, mientras que los venenos producidos por hongos de mayor tamaño (macrohongos), como las setas, se consideran exentos de esta categoría pese a ejercer una gran toxicidad a bajas concentraciones y ser también intermediarios del metabolismo fúngico. Esta distinción no sólo se explica por la diferencia de tamaño entre ambos tipos

de hongos (mohos y setas), sino atendiendo también a la intencionalidad de la exposición a la toxina fúngica. En el caso de las micotoxinas de origen mohoso la exposición suele ser de carácter accidental e involuntario (es decir, por contaminaciones fúngicas no detectables durante la producción y procesamiento de los alimentos o incluso por inhalación o contacto cutáneo), mientras que la exposición a los venenos de setas suele ser la consecuencia de una búsqueda directa de estos hongos para su consumo intencional o de una confusión entre la especie comestible y la especie venenosa (Bennett & Klich, 2003).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas sobre la salud se conocen como micotoxicosis y están asociados con la ingesta de un determinado tipo de alimento contaminado por las toxinas. Los fármacos y los antibióticos prácticamente no tienen efecto más allá de paliar los síntomas producidos. El estudio de las micotoxinas en su conjunto se conoce como micotoxicología (Forgacs, 1962).

A lo largo de esta introducción se abordarán los aspectos más relevantes relacionados con las micotoxinas, centrándose en su estructura química, clasificación, tipos y orígenes.

3. Clasificación de las micotoxinas.

Las micotoxinas pueden clasificarse en varios grupos o familias según varios criterios, como el hongo productor, la estructura química o su toxicidad.

3.1. Clasificación según las especies fúngicas productoras.

Las micotoxinas de mayor relevancia para la salud humana y animal son las producidas por los siguientes géneros fúngicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Claviceps*. Las especies del género *Aspergillus* son las principales responsables de la producción de las aflatoxinas, mientras que las especies *Aspergillus* y *Penicillium* son origen de la ocratoxina A. Las especies fúngicas del género *Fusarium* producen una mayor variedad de micotoxinas, como los tricotecenos (tipo A: toxina HT-2 y T-2, y tipo B: deoxinivalenol), la zearalenona, las fumonisinas B1 y B2, así como micotoxinas recientemente descritas, como la fusaproliferina, la moniliformina, la beauvericina y las eniatinas. El género *Claviceps* produce los alcaloides ergóticos,

mientras que las especies del género *Alternaria* son responsables de la producción del alternariol, el altenueno, el éter metílico de alternariol, la altertoxina y del ácido tenuazónico (Marin et al., 2013). Sin embargo, para contextualizar esta clasificación se deben de tener en cuenta las siguientes consideraciones: 1) una misma micotoxina puede producirse por diferentes géneros fúngicos; 2) otros géneros fúngicos no mencionados también pueden tener la capacidad de producir estas micotoxinas; 3) especies fúngicas pertenecientes al mismo género pueden producir diferentes tipos de micotoxinas. En la **Tabla 1** se indican los principales géneros y especies fúngicas con capacidad micotoxigénica y las micotoxinas que suelen producir, las cuales aparecen clasificadas de acuerdo con los géneros de hongos productores.

Tabla 1. Clasificación de las principales micotoxinas de relevancia toxicológica según el género y las especies fúngicas productoras.

Género Fúngico	Especie Fúngica	Micotoxina	Acrónimo	Ref.
<i>Aspergillus</i>	Sección <i>Flavi</i>	Aflatoxina B1	AFB1	Kumar et al., 2017
<i>Aspergillus</i>		Aflatoxina B2	AFB2	Kumar et al., 2017
<i>Aspergillus</i>		Aflatoxina G1	AFG1	Kumar et al., 2017
<i>Aspergillus</i>		Aflatoxina G2	AFG2	Kumar et al., 2017
<i>Aspergillus</i>	Sección <i>Flavi</i> Sección <i>Versicolor</i>	Esterigmatocistina	STG	Díaz Nieto et al., 2018
<i>Aspergillus</i>	Sección <i>Circumdati</i> y <i>Nigri</i>	Ocratoxina A	OTA	Díaz Nieto et al., 2018
<i>Aspergillus</i>	<i>clavatus</i>	Patulina	PAT	Vidal et al., 2019
<i>Aspergillus</i>	<i>terreus</i>	Citrinina	CIT	Flajs & Peraica, 2009
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus, oryzae, tamarii</i>	Ácido ciclopiazónico	CPA	Ostry et al., 2018
<i>Aspergillus</i>	Section <i>Circumdati</i>	Ácido penicílico	PCA	Frisvad, 2018
<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>	Gliotoxina	GT	Scharf et al., 2016
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	Fumonisin B	FBs	Moretti et al., 2013
<i>Penicillium</i>	<i>verrucosum, nordicum</i>	Ocratoxina A	OTA	Díaz Nieto et al., 2018
<i>Penicillium</i>	<i>expansum, patulum</i>	Patulina	PAT	Vidal et al., 2019
<i>Penicillium</i>	<i>expansum, verrucosum</i>	Citrinina	CIT	Flajs & Peraica, 2009
<i>Penicillium</i>	<i>griseofulvum, camemberti, commune, dipodomyicola</i>	Ácido ciclopiazónico	CPA	Ostry et al., 2018
<i>Penicillium</i>	9 Secciones diferentes	Ácido penicílico	PCA	Frisvad, 2018
<i>Penicillium</i>	<i>spp</i>	Gliotoxina	GT	Scharf et al., 2016
<i>Monascus</i>	<i>ruber</i>	Citrinina	CIT	Flajs & Peraica, 2009
<i>Fusarium</i>	<i>graminearum, culmorum, cerealis</i>	Deoxinivalenol (Tricoteceno Tipo B)	DON	McCormick et al., 2011
<i>Fusarium</i>	<i>acuminatum, poae</i>	Toxina HT-2	HT-2	McCormick et al., 2011

Tabla 1. Continuación.

Género Fúngico	Especie Fúngica	Micotoxina	Acrónimo	Ref.
<i>Fusarium</i>	<i>sporotrichioides langsethiae</i>	Toxina T-2	T-2	McCormick et al., 2011
<i>Fusarium</i>	<i>gramineatum, culmorum equiseti, cerealis verticillioides, incarnatum moniliforme, roseum tricinctum</i>	Zearalenona	ZEA	Han et al., 2022
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum, verticillioides, proliferatum, fujikuroi</i>	Fumonisinias A, B, C, P	FAs, FBs, FCs, FPs	Moretti et al., 2013
<i>Fusarium</i>	Sección <i>Liseola</i>	Moniliformina	MON	Frisvad, 2018
<i>Fusarium</i>		Beauvericina	BEA	Santini et al., 2012
<i>Fusarium</i>	<i>avenaceum tricinctum</i>	Eniatinas	ENNs	Santini et al., 2012
<i>Fusarium</i>	<i>poae, langsethiae sporotrichioides, proliferatum, subglutinans antophilum, begoniae, bulbicola, circinatum, concentricum, succisae, udum</i>	Fusaproliferina	FUSA	Santini et al., 2012
<i>Fusarium</i>	<i>culmorum, graminearum sulphureum, sambucinum, solani, crookwellense</i>	Fusarenon X	FX	Aupanun et al., 2016
<i>Fusarium</i>	<i>spp</i>	Esterigmatocistina	STG	Díaz Nieto et al., 2018

Tabla 1. Continuación.

Género Fúngico	Especie Fúngica	Micotoxina	Acrónimo	Ref.
<i>Fusarium</i>	<i>culmorum, graminearum, crookwellense, venenatum</i>	Culmorina	CUL	Khaneghah et al., 2019
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea, fusiformis, africana</i>	Alcaloides Ergóticos	EAs	Schiff, 2006
<i>Neotyphodium</i>	<i>spp</i>	Alcaloides Ergóticos	EAs	Schiff, 2006
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Alternariol	AOH	Ostry, 2008
<i>Alternaria</i>	<i>alternata, solani</i>	Alternariol monometil eter	AME	Ostry, 2008
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Ácido tenuazónico	TeA	Ostry, 2008
<i>Alternaria</i>	<i>alternata, tenuissima</i>	Altenueno y derivados	ALT	Marin et al., 2013
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Alttoxinas I, II y III	ALX-I, -II, -III	Marin et al., 2013
<i>Alternaria</i>	<i>alternata, porri</i>	Tentoxina	TEN	Marin et al., 2013
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	Altenusina	ALN	Marin et al., 2013

3.2. Clasificación según la estructura química de la micotoxina.

Teniendo en cuenta que el término micotoxina engloba a más de 400 compuestos con una elevada diversidad estructural, es ciertamente difícil establecer una clasificación sencilla de las micotoxinas en base a criterios puramente estructurales, incluso para aquellos compuestos sintetizados por los mismos géneros e incluso por las mismas especies fúngicas. Estas diferencias estructurales entre micotoxinas se deben fundamentalmente a la versatilidad metabólica de los hongos micotoxigénicos, capaces de sintetizar moléculas estructuralmente diversas incluso a partir de los mismos precursores metabólicos (Moretti et al., 2013). Sin embargo, la estructura de las micotoxinas afecta notablemente a sus propiedades fisicoquímicas y toxicidad, por lo que resulta imprescindible establecer una clasificación que permita relacionar entre sí y distinguir las micotoxinas de mayor relevancia en términos de prevalencia, exposición y toxicidad, desde un enfoque puramente estructural.

Por tanto, en este apartado se ha establecido una clasificación de las principales micotoxinas en base a su estructura y grupos químicos comunes. En el caso de las micotoxinas que no han podido agruparse en torno a ninguna de las categorías comunes, se ha procedido a establecer nuevas categorías basadas en rasgos estructurales específicos. También se especifican algunos casos en los que una misma micotoxina puede ser clasificada en varias categorías simultáneamente. A continuación, se exponen las principales categorías estructurales establecidas para las micotoxinas conocidas y de mayor relevancia, así como sus estructuras químicas.

3.2.1. Cumarínicas o benzopironas.

- *Derivadas de bis-furanocumarina:* Contienen dos anillos de furano adyacentes entre sí y acoplados a la cumarina, que pueden variar en base a su grado de insaturación:
 - ✓ *Bis-dihidrofurano-cumarinas:* Ambos anillos anexados a la cumarina son de 2,3-dihidrofurano. En esta subcategoría se incluyen las aflatoxinas B1, G1, la esterigmatocistina y el metabolito-aflatoxina M1 (AFM1) (**Figura 1**).
 - ✓ *Bis-(tetrahidrofuran-dihidrofurano)-cumarinas:* El anillo anexado a la cumarina es de 2,3-dihidrofurano pero el anillo restante es de tetrahidrofurano. Aquí se incluyen las aflatoxinas B2, G2 y el metabolito-aflatoxina M2 (AFM2) (**Figura 1**).

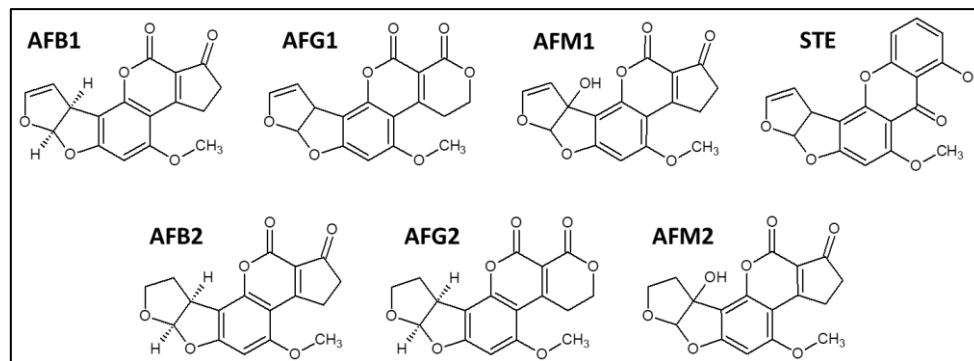


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas B1, G1, M1, esterigmatocistina (bis-dihidrofurano-cumarinas) y de las aflatoxinas B2, G2 y M2 (bis-(tetrahidrofuran-dihidrofurano)-cumarinas).

- *Derivadas de cumarina:* Presentan una estructura central derivada de la cumarina, pero carecen de anillos de furano. En esta subcategoría se incluyen el alternariol (AOH), el alternariol monometil éter (AME), la dehidroaltenucina y el altenueno (ALT, incluyendo las formas iso-ALT, neo-ALT y epi-ALT), entre otros, según Altemöller et al., 2006 (**Figura 2**). Otros autores también han clasificado a las ocratoxinas dentro de esta categoría, aunque su estructura cumarínica carece de aromaticidad en uno de los anillos.

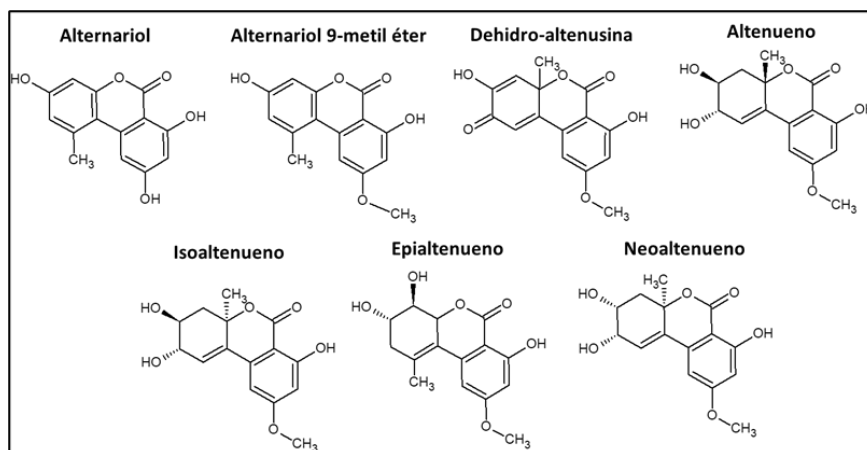


Figura 2. Estructuras químicas del alternariol, alternariol 9-metil éter, dehidroaltenucina, altenueno, isoaltenueno, epialtenueno y neoaltenueno.

3.2.2. Lactónicas.

Este grupo engloba aquellas micotoxinas cuyo rasgo estructural distintivo es la presencia de uno o más anillos lactónicos, como es el caso de las ocratoxinas A, B y C, la patulina, la moniliformina, el ácido penicílico y la butenolida, entre otras (Frisvad, 2018).

Dentro de este grupo se hallan los macrólidos, que contienen anillos lactónicos de gran tamaño, como la zearalenona (Rogowska et al., 2019). Las micotoxinas lactónicas mencionadas se muestran en la **Figura 3**. En esta categoría también se podrían incluir otras micotoxinas que contienen lactonas como grupos secundarios a la estructura característica principal, como puede ser el caso del altenueno (**Figura 2**) y la altenusina (**Figura 12**), las eniatinas (A, A1, B, B1), la beauvericina (**Figura 10**) y la verrucarina.

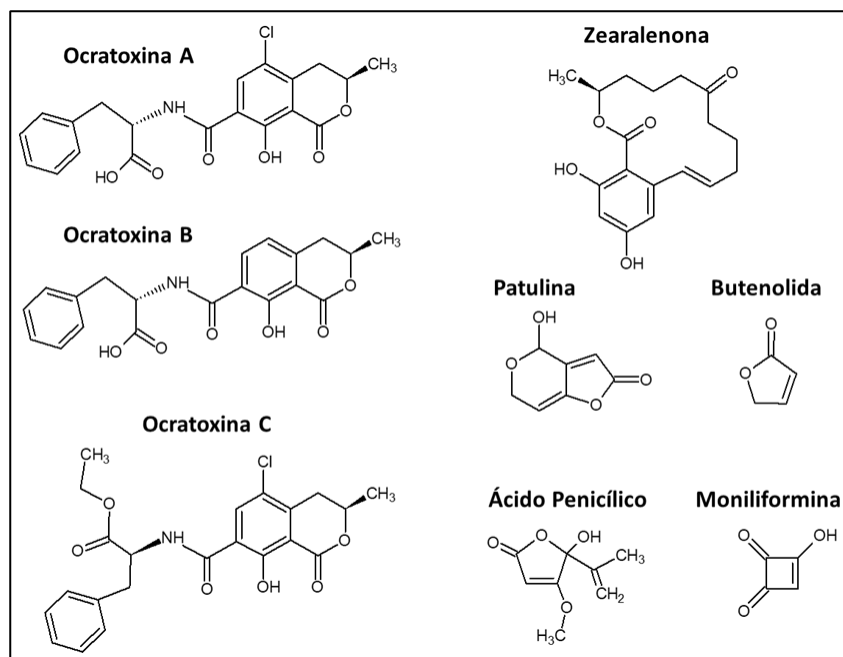


Figura 3. Estructuras químicas de las ocratoxinas A, B y C, zearalenona, patulina, butenolida, ácido penicílico y moniliformina.

3.2.3. Derivadas de terpenoides.

Esta categoría incluye a todas aquellas micotoxinas cuya estructura principal deriva de la ciclización de terpenos lineales, formados a su vez por diferentes unidades de isopreno:

- *Sesquiterpenos*: Derivados cíclicos terpenoides que contienen tres unidades de isopreno, como la culmorina. Entre estos, destacan los sesquiterpenos, con una estructura básica derivada de 12,13-epoxitricotec-9-eno (conocida comúnmente como tricoteceno, TCN), que abarca una familia de hasta 200 compuestos diferentes. Los tricotecenos, a su vez, se pueden clasificar en cuatro subcategorías diferentes según los tipos de sustituyentes que presente la estructura común, de acuerdo con el esquema

de la **Figura 4** procedente de la revisión de McCormick et al., 2011 y con la revisión realizada por Mahato et al., 2022:

- ✓ *TCN-A*: Tricotecenos con sustituyentes hidroxilo, éster o no sustituidos en la posición C8. Algunos ejemplos son las toxinas T-2 y HT-2, el diacetoxiscirpenol, el neosolaniol, la tricodermina, y el harzianum A.
- ✓ *TCN-B*: Tricotecenos con sustituyentes carbonílicos en la posición C8. Algunos ejemplos son el deoxinivalenol, el nivalenol, el fusarenon X y la tricotecina.
- ✓ *TCN-C*: Tricotecenos con un grupo epóxido entre las posiciones C7 y C8. Un ejemplo de este tipo de tricoteceno es la crotocina.
- ✓ *TCN-D*: Tricotecenos que presentan un anillo adicional enlazado a las posiciones C4 y C15. Algunos ejemplos son la roridina A, la verrucarina A y la satratoxina (G y H).

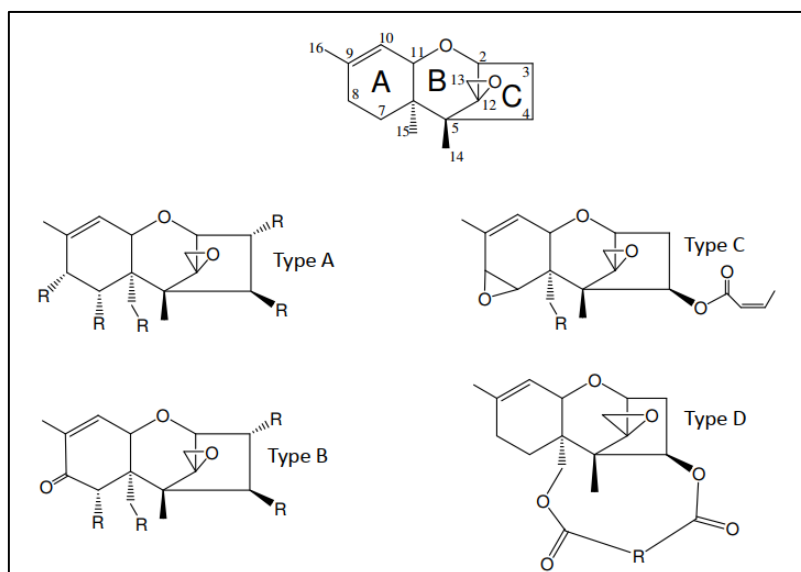


Figura 4. Esquema que muestra la estructura basal del TCN numerada según la IUPAC (parte superior), así como los tipos de tricotecenos A, B, C y D (parte inferior) según el tipo de sustituyentes presentes en las posiciones especificadas del TCN. La figura ha sido tomada del artículo de revisión elaborado por McCormick et al., 2011.

- *Sesterterpenos bicíclicos*: Derivados cíclicos terpenoides que contienen cinco unidades de isopreno, como la fusaproliferina y la deacetil-fusaproliferina, según Santini et al., 2012 (**Figura 5**).

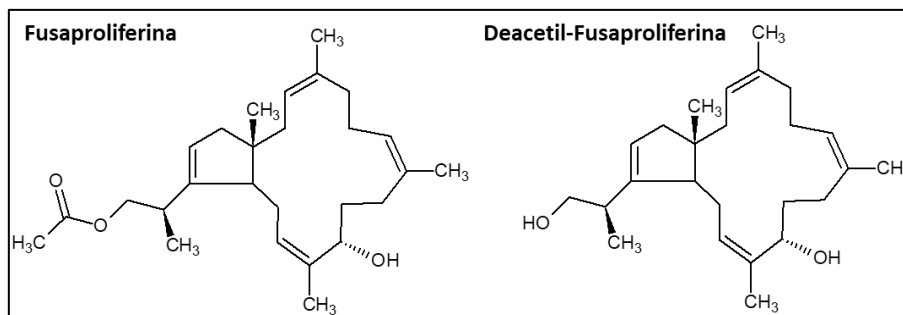


Figura 5. Estructuras químicas de la fusaproliferina y de la deacetil-fusaproliferina.

3.2.4. Fumonisinias (FBs).

Su estructura deriva de poliquétidos compuestos por una cadena alifática larga sustituida por un grupo aminado y por 1-4 grupos hidroxilo (amino-polihidroxiladas). Según la longitud de la cadena y su grado de ramificación, así como la sustitución del grupo nitrogenado, se pueden clasificar en cuatro subcategorías, de acuerdo con la revisión de Moretti et al., 2013:

- *Fumonisinias A*: Cadena alifática de 20 carbonos y un grupo amino acetilado. Las fumonisinias A1 y A2 se diferencian solamente en el sustituyente R_1 del C10 (un grupo hidroxilo para la A1 o un átomo de hidrógeno para la A2), de acuerdo con la **Figura 6**.

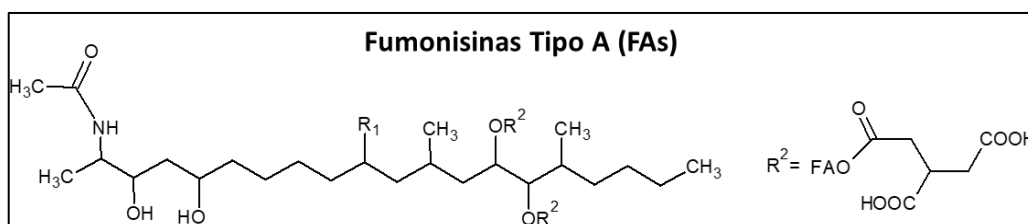


Figura 6. Esquema de la estructura química de las fumonisinias A1 ($R_1 = OH$) y A2 ($R_2 = H$).

- *Fumonisinias B*: Cadena alifática de 20 carbonos y grupo amino libre. Éstas se dividen a su vez en cuatro tipos de análogos estructurales según la presencia o ausencia de sustituyentes R_1 y R_2 de tipo hidroxilo en las posiciones C5 y C10 de la cadena alifática, según la **Figura 7**:

- ✓ *FB1*: Hidroxilada en las posiciones C5 y C10 de la cadena alifática.
- ✓ *FB2*: Hidroxilada en la posición C5 de la cadena alifática.
- ✓ *FB3*: Hidroxilada en la posición C10 de la cadena alifática.
- ✓ *FB4*: Carece de grupos hidroxilo en ambas posiciones C5 y C10 de la cadena alifática.

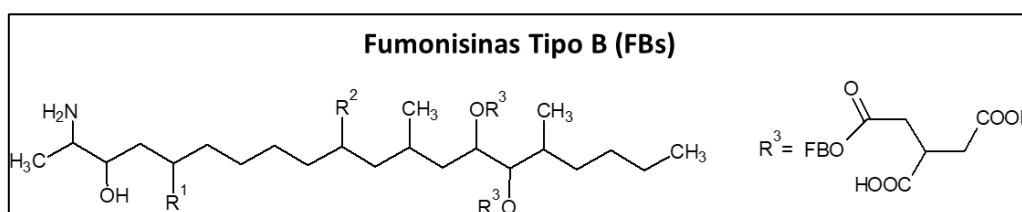


Figura 7. Esquema de la estructura química de las fumonisinas B1 ($R_1, R_2 = \text{OH}$), B2 ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$), B3 ($R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$) y B4 ($R_1, R_2 = \text{H}$).

- *Fumonisin C*: Cadena alifática de 19 carbonos y un grupo amino libre. Éstas se dividen a su vez en cinco subtipos según la presencia o ausencia de grupos hidroxilo como sustituyentes R_1, R_2 y R_3 de las posiciones C3, C4 y C9 de la cadena alifática (**Figura 8**):

- ✓ *FC1*: Hidroxilada en las posiciones C4 y C9 de la cadena alifática.
- ✓ *FC2*: Hidroxilada en la posición C4 de la cadena alifática.
- ✓ *FC3*: Hidroxilada en la posición C9 de la cadena alifática.
- ✓ *Iso-FC1*: Hidroxilada en las posiciones C3 y C9 de la cadena alifática.
- ✓ *Hidroxi-FC1*: Hidroxilada en las posiciones C3, C4 y C9 de la cadena alifática.

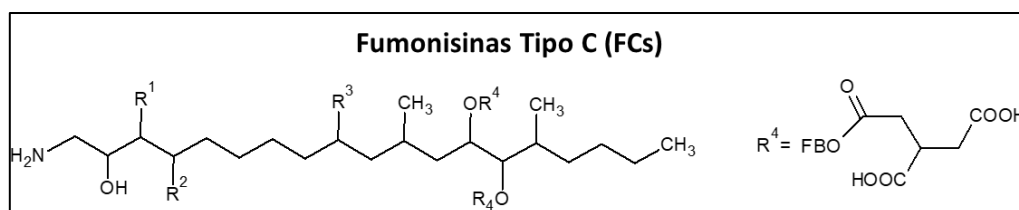


Figura 8. Esquema de la estructura química de las fumonisinas C1 ($R_1 = \text{H}; R_2, R_3 = \text{OH}$), C2 ($R_1, R_3 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$), C3 ($R_1, R_2 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$), Iso-C1 ($R_1, R_3 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$) e hidroxi-C1 ($R_1, R_2, R_3 = \text{OH}$).

- *Fumonisin P*: Cadena alifática de 20 carbonos y el grupo amino forma parte de una hidroxipiridina. Éstas se dividen a su vez en tres tipos de análogo según la presencia

o ausencia de sustituyentes R_1 y R_2 de tipo hidroxilo en las posiciones C5 y C10 de la cadena alifática, según la **Figura 9**:

- ✓ *FP1*: Hidroxilada en las posiciones C5 y C10 de la cadena alifática.
- ✓ *FP2*: Hidroxilada en la posición C5 de la cadena alifática.
- ✓ *FP3*: Hidroxilada en la posición C10 de la cadena alifática.

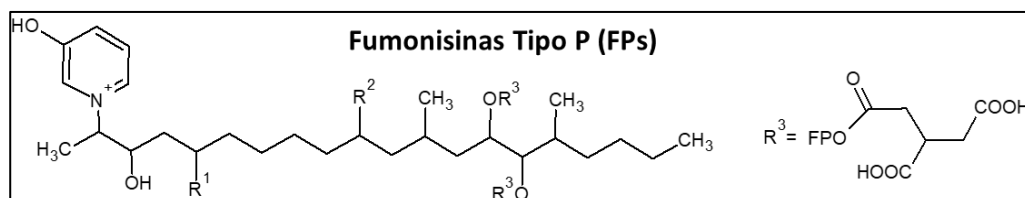


Figura 9. Esquema de la estructura química de las fumonisinas P1 ($R_1, R_2 = OH$), P2 ($R_1 = OH, R_2 = H$) y P3 ($R_1 = H, R_2 = OH$).

3.2.5. Ciclopéptidos.

Estas micotoxinas presentan estructuras formadas por ciclo-condensación peptídica, como es el caso de la tentoxina (**Figura 10**). Dentro de esta amplia categoría se pueden diferenciar dos subgrupos con características estructurales específicas:

- *Ciclohexadepsipéptidos*: El ciclopéptido integrante presenta uno o más grupos amida sustituidos por ésteres, como la beauvericina y las eniatinas A, A1, B y B1 (ENNs). Las eniatinas se diferencian entre sí según los sustituyentes R_1, R_2 y R_3 presentes en la estructura, tal como se detalla en la **Figura 10**, de acuerdo con Santini et al., 2012.
- *Derivados de epiditiodioxo-piperazinas (ETPs)*: Formadas por la condensación de dos aminoácidos, contienen un anillo de dicetopiperazina enlazada a dos átomos de azufre unidos entre sí por un puente disulfuro, como la gliotoxina (**Figura 10**), según Scharf et al., 2016.

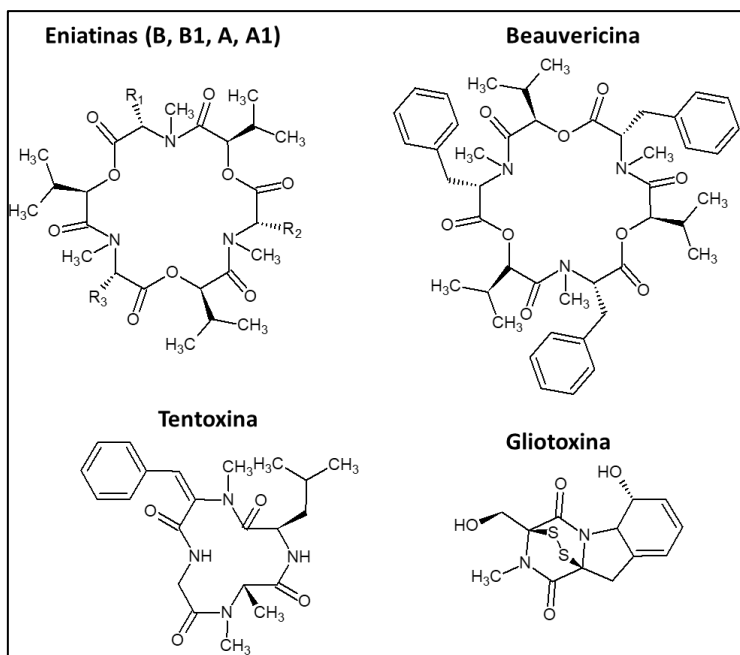


Figura 10. Estructuras químicas de las eniaticinas, la beauvericina, la tentoxina y la gliotoxina (ciclopéptidos). La eniaticinas se diferencian entre sí según los sustituyentes R₁, R₂ y R₃: eniaticina B (R₁,R₂,R₃ = isopropilo); eniaticina B1 (R₁,R₂ = isopropilo, R₃ = sec-butilo); eniaticina A (R₁,R₂,R₃ = sec-butilo); eniaticina A1 (R₁ = isopropilo, R₂,R₃ = sec-butilo).

3.2.6. Derivadas del indol.

Esta categoría engloba a las micotoxinas cuya estructura central está constituida por un grupo de indol. Esta categoría incluye algunas micotoxinas como el ácido ciclopiazónico (**Figura 12**) y los alcaloides ergóticos (Ostry et al., 2018). Estos últimos a su vez presentan una estructura basada en la ergolina:

- *Alcaloides ergolínicos*: Su estructura deriva de la ergolina (**Figura 11**), una estructura tetraheterocíclica indólica derivada del L-triptófano. Los alcaloides ergonílicos abarcan hasta 80 compuestos diferentes. A su vez, estos derivados se diferencian según el tipo de sustituyentes que presentan en la posición C8 de la ergolina, de acuerdo con Jastrzębski et al., 2022:
 - ✓ *Clavinos*: Presentan un sustituyente metilo en la posición C8 (**Figura 11.A**).
 - ✓ *6,7-Secoergolenos*: El sustituyente de la posición C8 provoca la apertura del anillo D entre las posiciones 6 y 7 (**Figura 11.B**).

- ✓ *Derivados del ácido lisérgico*: La posición C8 es sustituida por un ácido carboxílico que da lugar al ácido lisérgico. Este ácido carboxílico, a su vez, se puede convertir en una amida terciaria cuyo átomo de N puede ser sustituido a su vez de diferentes formas (**Figura 11.C**).
- ✓ *Peptídicos*: La posición C8 está sustituida por una amida secundaria que conecta la estructura principal de la ergolina con una molécula lactámica de origen peptídico (**Figura 11.D**).
- ✓ *Lactámicos*: La posición C8 está sustituida por una amida secundaria que conecta la estructura principal de la ergolina con una molécula lactámica de origen no peptídico (**Figura 11.E**).

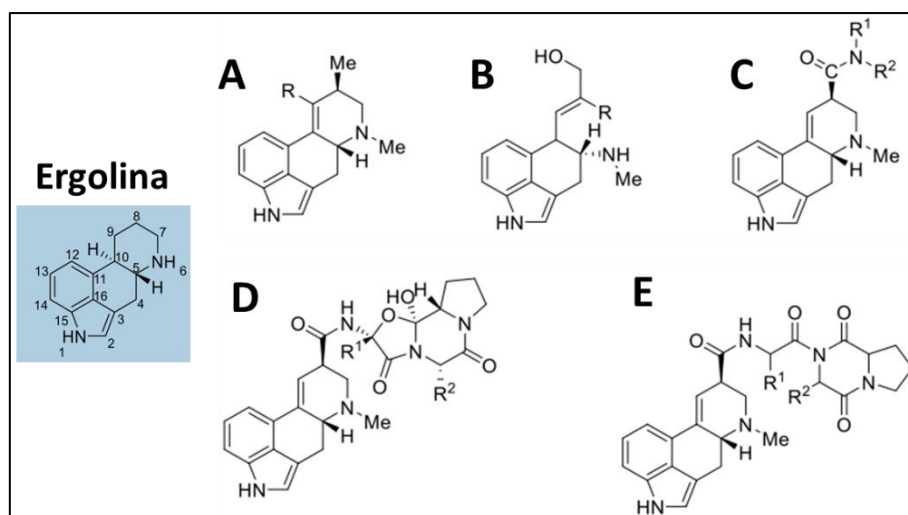


Figura 11. Estructura basal de la ergolina numerada según la IUPAC, así como de los diferentes tipos de alcaloides ergolínicos derivadas según la sustitución de las posiciones especificadas de la ergolina: A) clavinos; B) 6,7-secoergolenos; C) derivados del ácido lisérgico; D) peptídicos; E) lactámicos. La figura ha sido tomada del artículo de revisión elaborado por Jastrzębski et al., 2022.

3.2.7. Derivadas de bifenilo.

En este grupo se incluyen micotoxinas específicas con una estructura derivada del 1,1'-bifenilo, como la altemusina. Cabe señalar que Escrivá et al., 2017 clasifican esta micotoxina como benzopiranona, aunque su estructura no se considera acorde a este grupo, como se puede observar en la **Figura 12**.

3.2.8. Derivados de pirrolinas.

Estas micotoxinas contienen un anillo de pirrolina como base de su estructura química, como el ácido tenuazónico, un derivado del ácido tetrámico, de acuerdo con Kumari & Tirkey, 2019 (**Figura 12**).

3.2.9. Derivados de piridinas.

Se trata de micotoxinas cuya estructura central es un anillo de piridina, como el ácido fusárico (**Figura 12**). Otras micotoxinas que contienen piridina, como las fumonisinas P, cuya estructura se muestra en la **Figura 9**, también se podrían incluir en esta categoría, aunque no sea su principal componente estructural.

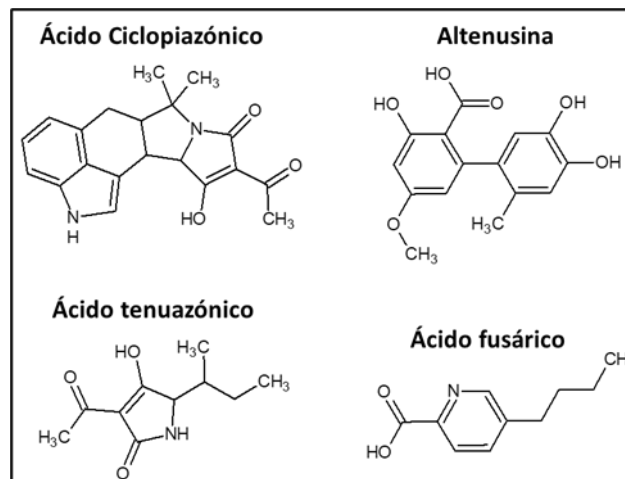


Figura 12. Estructuras químicas del ácido ciclopiazónico (indólico), altenusina (bifenílica), ácido tenuazónico (pirrolínico) y ácido fusárico (piridínico).

3.2.10. Derivadas de quinonas.

Dentro de este grupo se incluyen las micotoxinas cuya estructura contiene anillos de quinonas como rasgo estructuralmente distintivo, como es el caso de la citrinina, que contiene dos grupos benzocetónicos interconvertibles por isomerización según Xu et al., 2006 o del ácido kojico (**Figura 13**). Dentro de este grupo se pueden distinguir:

- *Perilen-quinonas*: Hidrocarburos aromáticos policíclicos sustituidos con quinona. Incluyen las altertoxinas (I, II y III) y el alterperilenol (**Figura 13**), según Escrivá et al., 2017.

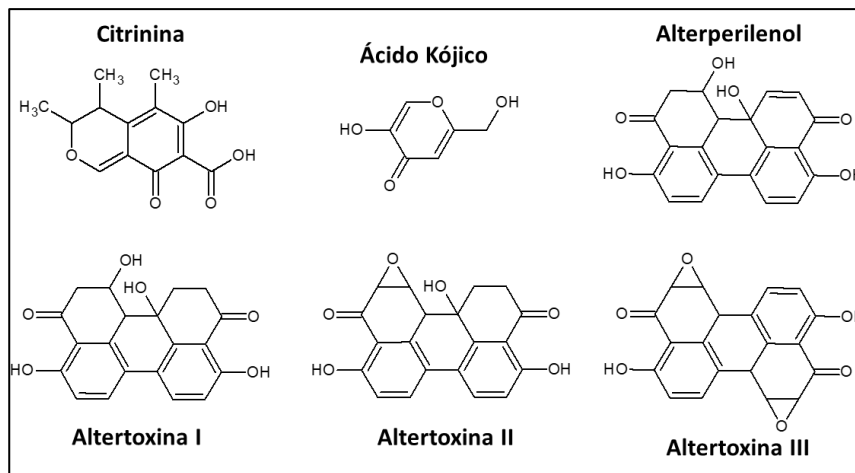


Figura 13. Estructuras químicas de la citrinina, el ácido kójico, el alterperilenol y las alkermoxinas I, II y III (quinonas).

3.3. Clasificación en función de su potencial carcinogénico.

En 1987, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) presentó evidencias sólidas sobre la carcinogenicidad de ciertas micotoxinas. En base a estos datos, las micotoxinas de mayor relevancia por su presencia en alimentos y su toxicidad han sido clasificadas en cinco categorías dependiendo de su potencial carcinogénico (IARC, 2012):

- **Grupo 1:** Se aplica a agentes para los cuáles existen evidencias suficientes como para concluir que causan cáncer en humanos (carcinógeno confirmado).
- **Grupo 2A:** Se aplica a agentes para los que existen fuertes evidencias científicas experimentales para establecer su efecto carcinógeno en humanos, pero los datos existentes aún no son suficientes (probablemente carcinógeno).
- **Grupo 2B:** Se aplica a agentes para los que existen algunas evidencias científicas que apoyan su efecto carcinógeno en humanos, siendo necesarias más evidencias para confirmar su capacidad cancerosa (posiblemente carcinógeno).
- **Grupo 3:** Se aplica a agentes para los cuáles las evidencias científicas sobre su posible efecto carcinógeno son muy limitadas, inadecuadas o inexistentes, por lo que no son consideradas carcinogénicas (no clasificable como carcinógeno).
- **Grupo 4:** Se aplica a agentes para los que existen evidencias suficientes como para descartar que puedan causar cáncer en humanos (exentos de riesgo carcinogénico).

La clasificación de las micotoxinas en base a cada uno de los grupos se detalla en la **Tabla 2**. Las micotoxinas ausentes en esta clasificación se consideran del grupo 4.

Tabla 2. Clasificación de las principales micotoxinas con riesgo carcinogénico de cualquier tipo (1, 2A, 2B o 3) según las monografías de la IARC.

Micotoxina	Grupo	Volumen
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1	1	100 F
Esterigmatocistina	2B	Suppl. 7
Ocratoxina A	2B	56
Deoxinivalenol	3	56
Nivalenol	3	56
Zearalenona	3	56
Patulina	3	Suppl. 7
Citrinina	3	Suppl. 7
Toxina T-2	3	56
Fumonisina B1	2B	82
Fumonisina B2	2B	56
Fusarenon X	3	56
Fusarin C	2B	56
Rugulosin	3	Suppl. 7
Ácido Penicílico	3	Suppl. 7
Luteoskirina	3	Suppl. 7
Cicloclorotina	3	Suppl. 7
Ácido Kójico	3	79

4. Biosíntesis fúngica y condiciones de producción micotoxigénica.

Las micotoxinas se producen como resultado de la interacción compleja entre los hongos productores y su entorno. Las plantas son los principales organismos diana de colonización por parte de los hongos micotoxigénicos. Se estima que entre un 10-20% de los cultivos vegetales se pierden anualmente en todo el mundo por la acción de estos hongos. Este hecho, además de suponer gravísimas pérdidas económicas, también dificulta el abastecimiento alimentario de la población (especialmente en países del tercer

mundo y en vías de desarrollo), y supone la principal vía de exposición animal y humana a las micotoxinas por ingestión alimentaria (Savary et al., 2019).

Los hongos fitotóxicos y micotoxigénicos se dividen en tres categorías según sus mecanismos para colonizar y causar la enfermedad en las plantas: necrotrofos, biotrofos y hemibiotrofos. Mientras que los necrotrofos matan los tejidos vegetales para extraer los nutrientes que necesitan, los biotrofos establecen una relación parasitaria para extraer los nutrientes de los tejidos vegetales vivos, y los hemibiotrofos ejercen una relación de carácter biotrofa en los estadios tempranos de la colonización para finalmente convertirse en necrotrofos (Vincent et al., 2020). Entre las estrategias fúngicas de colonización respecto a la planta y de competencia frente a otros microorganismos colonizadores se encuentra la síntesis de un conjunto muy amplio de metabolitos secundarios de bajo peso molecular, entre los cuales están las micotoxinas.

Por lo tanto, la producción de micotoxinas está íntimamente ligada a procesos de colonización fúngica de las plantas, con roles defensivos y de competencia frente a otros microorganismos presentes en el mismo nicho ecológico. Esto explica la toxicidad manifestada por las micotoxinas y demás metabolitos fúngicos secundarios como una forma de aumentar la virulencia y la patogenicidad del hongo productor sobre la planta y sobre otros microorganismos colonizadores, de acuerdo con Zeilinger et al., 2016, y como una respuesta a situaciones de estrés provocadas por factores abióticos (temperatura, actividad de agua, pH y concentración ambiental de dióxido de carbono (CO₂), entre otros). No obstante, la versatilidad del metabolismo fúngico también sitúa a las micotoxinas en roles intermediarios de numerosas rutas metabólicas imprescindibles para la subsistencia fúngica, por lo que se piensa que su síntesis podría no ser siempre intencionada (Garvey & Keller, 2010).

Actualmente se han identificado más de cien tipos de micotoxinas como potenciales contaminantes de cultivos, siendo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium* (Miller, 2016) los géneros fúngicos fitopatogénicos más comunes.

La biosíntesis fúngica de las micotoxinas abarca un conjunto heterogéneo de rutas metabólicas cuyas enzimas se expresan de manera regulada a partir de numerosos genes que se agrupan en clústeres junto al resto de genes involucrados en las rutas metabólicas de síntesis micotoxigénica. La presencia o ausencia de estos genes y su secuencia específica suele variar en función de las especies fúngicas, aunque éstas tengan capacidad

para producir el mismo tipo de micotoxina. Además, la expresión de estos genes puede ser estimulada o reprimida por otros genes presentes en el mismo clúster, lo que a su vez varía en función de un amplio abanico de estímulos ambientales.

La expresión de los genes micotoxigénicos y, por tanto, la síntesis de micotoxinas está fuertemente influenciada por una serie de factores abióticos relacionados con el clima y con la actividad humana, así como con los ecosistemas microbianos presentes en los nichos ecológicos colonizados por los hongos micotoxigénicos.

4.1. Factores abióticos que influyen en la síntesis micotoxigénica (climáticos y químicos).

Los factores abióticos con influencia sobre la proliferación fúngica y la síntesis de micotoxinas pueden ser de tipo climático y químico. Los factores con una influencia decisiva son la temperatura, la actividad de agua (a_w), la presencia de CO_2 y, en menor medida, la luz solar. En el caso de los factores químicos de mayor influencia, estos son el pH, disponibilidad de sustrato, e incluso el uso de plaguicidas, entre otros (Yunes et al., 2020). El rango óptimo de temperatura y de actividad de agua varía según el tipo de micotoxina, oscilando entre 18-33 °C y 0.96-0.99 a_w , respectivamente para las micotoxinas más comunes (Kolawole et al., 2021). Las condiciones abióticas de naturaleza climática favorecen la proliferación de hongos micotoxigénicos especialmente en las zonas con climas tropicales y subtropicales, aunque no de forma exclusiva, sobre todo si se tiene en cuenta que el cambio climático está alterando las condiciones de temperatura, humedad y climatología a lo largo del planeta de forma significativa (Cervini et al., 2021).

Por otro lado, el uso de plaguicidas genéricos y fungicidas también afecta a la síntesis de micotoxinas. La acción inespecífica de los pesticidas de amplio espectro tiende a reducir la diversidad y el equilibrio del microbioma presente en el suelo y en los cultivos. Como consecuencia, se elimina parcialmente la competencia microbiana que mantiene controlada la proliferación de hongos micotoxigénicos, aumentando así la colonización y desarrollo de estos hongos en los cultivos, lo que incrementa la probabilidad de producción de las micotoxinas. Por otro lado, si bien los fungicidas específicos que actúan frente a los hongos micotoxigénicos producen una reducción de la presencia del hongo productor (Wegulo et al., 2015), algunos estudios han demostrado

que la exposición del hongo al fungicida puede aumentar drásticamente la producción de micotoxinas como un mecanismo de respuesta fúngica adaptativa al estrés producido por la toxicidad del fungicida, especialmente cuando estos biocidas se aplican en dosis subletales. Incluso cuando el fungicida es aplicado en la dosis correcta, el efecto combinado del fungicida con otros factores adicionales de estrés abiótico puede provocar un aumento de la biosíntesis de micotoxinas (Li et al., 2018).

4.2. Factores eco-fisiológicos que influyen en la síntesis micotoxigénica.

Los factores que influyen en la producción de las micotoxinas también deben de considerarse desde una perspectiva bio-ecológica, teniendo en cuenta los roles de estas sustancias sobre la colonización fúngica y la competencia microbiana que ejercen los hongos micotoxigénicos para establecerse en sus nichos ecológicos (Pfliegler et al., 2020). Desde esta perspectiva, la producción de micotoxinas es una consecuencia indirecta de las interacciones hongo-microbiota, hongo-planta y hongo-macroorganismos. Sin embargo, actualmente los mecanismos eco-fisiológicos específicos que promueven la síntesis micotoxigénica se desconocen en su mayor parte (O'Brien & Wright, 2011).

Algunos de estos mecanismos señalan una función de las micotoxinas como biocidas sobre un amplio conjunto de micro- y macroorganismos competidores y predadores de los hongos, e incluso como mecanismo de competencia antagonista entre diferentes tipos de hongos micotoxigénicos y no micotoxigénicos (Janzen, 1977). Sin embargo, otros autores también han confirmado su papel como elementos de señalización química entre los hongos y otros reinos, como su acción inhibitoria del *quorum sensing* (entendido como una forma de comunicación entre bacterias mediante la secreción de señales químicas al medio) y de factores de virulencia de otros patógenos, de acuerdo con Rasmussen et al., 2005. Otros han señalado su efecto repelente sobre la depredación por insectos, de acuerdo con Rohlf et al., 2007 e incluso otros estudios han confirmado sus efectos fitotóxicos frente a los tejidos vegetales para favorecer su colonización fúngica (Toba Samuel & Valentine, 2014). Por otro lado, también se ha demostrado la capacidad moduladora de algunos microorganismos como bacterias y levaduras sobre la síntesis de micotoxinas en determinadas circunstancias, de acuerdo con Verheecke et al., 2015, entre otros. Cabe destacar que tanto los microorganismos como los organismos macroscópicos

(insectos, plantas y animales) expuestos a las micotoxinas pueden internalizar, metabolizar, degradar y enmascarar estas toxinas de forma diferente. Esto supone un problema en el caso de las plantas, las cuales pueden absorber las micotoxinas y acumularlas en semillas vegetales y frutos, con su consecuente incorporación a la cadena alimenticia (Hariprasad et al., 2015). Por otro lado, la resistencia natural de las plantas a la colonización por hongos con potencial micotoxigénico también es un factor biótico importante a tener en cuenta, dado que no todas las especies e incluso variedades intra-especie de plantas presentan la misma susceptibilidad a los hongos micotoxigénicos, siendo algunas más resistentes que otras. Dicho factor se está potenciando mediante técnicas de biotecnología tradicional y recombinante con la finalidad de desarrollar cultivos más resistentes frente a estos hongos y reducir así la prevalencia de micotoxinas en dichos cultivos (Balan et al., 2024).

En definitiva, la producción de micotoxinas se halla influenciada por el equilibrio resultante entre diferentes factores abióticos ambientales y químicos en combinación con las relaciones establecidas entre los hongos micotoxigénicos y el resto de los microorganismos y macroorganismos presentes en los ecosistemas en los que los hongos micotoxigénicos establecen sus nichos ecológicos. Dicho equilibrio tendrá un carácter dinámico, lo que dificulta significativamente la prevención y el control de la presencia de micotoxinas en el ambiente.

5. Micotoxinas estructuralmente modificadas, enmascaradas o crípticas.

Actualmente, el análisis de micotoxinas gira en torno a las estructuras químicas originales conocidas, es decir, aquellas estructuras resultantes del metabolismo fúngico a través de rutas biosintéticas conocidas. Sin embargo, las micotoxinas originales o “libres” pueden sufrir modificaciones de diversa naturaleza sobre su estructura original, ya sea como consecuencia de los tratamientos fisicoquímicos que sufren durante el procesado y cocinado de los alimentos, o mediante su metabolización por plantas, animales y humanos. Estas modificaciones dan lugar a estructuras diferentes que muchas veces no son detectadas, salvo conocimiento previo de la estructura exacta generada (Bryła et al., 2018).

Estas micotoxinas se definen como “enmascaradas”, y algunos autores las denominan "crípticas". De acuerdo con Rychlik et al., 2014, las micotoxinas

enmascaradas se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con la naturaleza química de la modificación de la micotoxina original:

- ***Micotoxinas asociadas a la matriz:*** Dentro de esta categoría se encuentran las micotoxinas que establecen interacciones con componentes de la matriz alimentaria (proteínas, almidón, lípidos, etc.), incluyendo tanto las micotoxinas que se unen de manera reversible con los compuestos de la matriz (complejadas, disueltas, micelizadas o adsorbidas físicamente) como aquellas que forman interacciones covalentes con los componentes de la matriz sin ver alterada su estructura original. También es posible observar la combinación de ambos tipos de uniones.
- ***Micotoxinas modificadas:*** Incluyen las micotoxinas que experimentan cualquier tipo de modificación que altera la estructura original de la micotoxina. Estas modificaciones pueden deberse a causas biológicas o químicas:
 - ✓ Las *micotoxinas biológicamente modificadas* se forman a través de la metabolización humana, animal, vegetal, fúngica e incluso por la microbiota. Dentro de esta categoría se incluyen los metabolitos micotoxigénicos generados tras la fase I y los conjugados generados tras la fase II del metabolismo humano de micotoxinas.
 - ✓ Las *micotoxinas químicamente modificadas* surgen fundamentalmente como subproductos del procesado industrial y del cocinado de los alimentos contaminados con micotoxinas, constituyéndose como el grupo más extenso de micotoxinas modificadas. En particular, está demostrado que algunas prácticas de procesado y cocinado como el horneado, la fritura, el tostado, la extrusión o la nixtamalización, entre otros, generan modificaciones químicas sobre la estructura original de la micotoxina. La aplicación de calor aporta la energía necesaria para la ruptura y formación de ciertos tipos de enlaces intramoleculares. Las modificaciones químicas pueden ocurrir por dos vías:
 - *Modificación térmica*, es decir, formadas bajo la aplicación de tratamientos térmicos en presencia o ausencia de agua y/o de otros disolventes y sustancias.
 - *Modificación no térmica*, es decir, formadas bajo condiciones químicas de tipo alcalino, ácido o en presencia de sustancias químicas específicas, o bajo

otros tipos de condiciones como la exposición a radiación ultravioleta o de microondas, entre otros tratamientos.

6. Rutas de exposición más comunes.

Las rutas de exposición a las micotoxinas pueden variar dependiendo de diversos factores, como el tipo de micotoxina, la fuente de exposición (alimentos, instalaciones, objetos, etc.), e incluso las prácticas agrícolas y de higiene aplicadas durante el procesado de los alimentos. Las principales rutas de exposición incluyen:

- ***Ingestión:*** La exposición más común a las micotoxinas ocurre a través de la ingesta de alimentos o piensos contaminados, ya sea por contaminación directa del cultivo o durante el procesado alimentario (contaminaciones cruzadas). En el caso de alimentos de origen animal, se produce también mediante la ingestión y la acumulación de la micotoxina y sus metabolitos derivados en los tejidos del animal. Las micotoxinas pueden acumularse en granos, frutas, verduras, frutos secos, carnes y productos lácteos, entre otros alimentos. El agua contaminada con micotoxinas, así como bebidas como el vino, la cerveza y los jugos de frutas también se hallan entre las fuentes de exposición oral más comunes. Además, algunos suplementos alimenticios también se pueden ver contaminados con micotoxinas, lo que representa una ruta de exposición adicional para la ingesta oral.
- ***Inhalación:*** Otra ruta de exposición es la inhalación de esporas de hongos productores de micotoxinas. Esto puede ocurrir en entornos con altos niveles de contaminación por hongos, como granjas, silos o almacenes de granos.
- ***Contacto dérmico:*** Aunque menos común, las micotoxinas también pueden absorberse a través de la piel en contacto directo con alimentos o materiales contaminados. Productos como champús, lociones o pinturas pueden contener micotoxinas como resultado de la contaminación fúngica.
- ***Transferencia vertical:*** Las micotoxinas también pueden transferirse de la madre al feto a través de la placenta, o a través de la leche materna (siendo ésta última la forma más común de transferencia vertical, especialmente en zonas con altas tasas de exposición materna a micotoxinas).

El conocimiento de estas rutas de exposición es crucial para diseñar estrategias efectivas de control y prevención de la contaminación por micotoxinas, con el objetivo de reducir los riesgos para la salud pública y animal (Williams et al., 2004).

7. Biodisponibilidad oral de las micotoxinas.

La biodisponibilidad oral es el último y definitivo factor que condiciona la exposición final del organismo a las micotoxinas por vía alimentaria, una vez que el alimento contaminado ha sido procesado, detoxificado y/o cocinado y está listo para consumir. De acuerdo con esto, la cantidad de micotoxina presente en el alimento ingerido no es un valor representativo para evaluar la exposición real del organismo a la micotoxina, ya que la cantidad final de toxina que ejercerá una toxicidad efectiva es la fracción capaz de alcanzar el sistema circulatorio general, también conocida como micotoxina biodisponible. Por tanto, la fracción biodisponible de una micotoxina se define como la proporción resultante de la toxina inicialmente ingerida que, tras sufrir los procesos de digestión, liberación, absorción intestinal y metabolización hepática, pasaría a estar disponible para ser distribuida por el organismo. En otras palabras, es la fracción micotoxigénica que se absorbe y alcanza las dianas potenciales de acción tóxica dentro del organismo (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004). La biodisponibilidad se halla influenciada por diferentes factores derivados del estado fisiológico del individuo, como su salud gastrointestinal, su edad y su perfil de dieta específico, entre otros condicionantes, y también presenta una elevada variabilidad entre especies.

La biodisponibilidad final de la micotoxina está determinada fundamentalmente por tres procesos fisiológicos previos que transcurren de manera consecutiva (Brandon et al., 2006), de acuerdo con el esquema de la **Figura 14**:

- 1) La digestión gastrointestinal, que determina la bioaccesibilidad de la micotoxina.
- 2) La absorción de la micotoxina bioaccesible a través del epitelio intestinal hacia el sistema circulatorio.
- 3) La metabolización hepática previa a la distribución final de la micotoxina y de sus metabolitos derivados a través de la circulación sistémica.

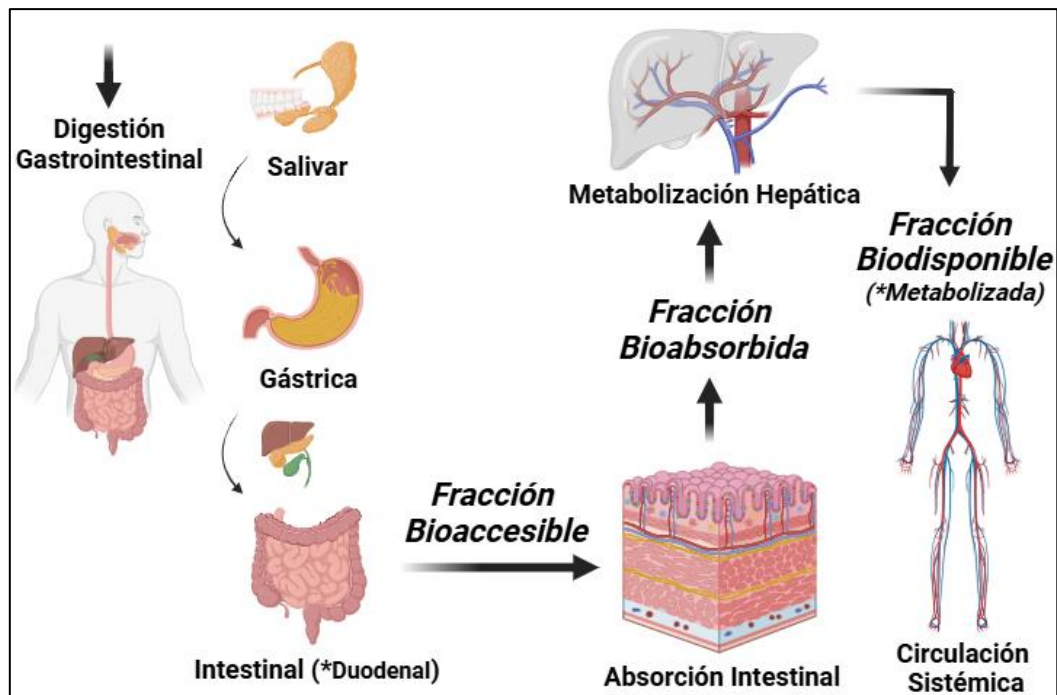


Figura 14. Fases de las micotoxinas desde su ingestión hasta alcanzar la circulación sistémica (fracción biodisponible): La digestión gastrointestinal (que da lugar a la fracción bioaccesible de la micotoxina y consta de tres etapas, salivar, gástrica e intestinal); la absorción intestinal (que origina la fracción bioabsorbida de la micotoxina); y la metabolización hepática (que metaboliza la micotoxina de forma previa a su distribución sistémica por todo el organismo).

*Duodenal: Para la digestión de aflatoxinas solamente se considera relevante la digestión intestinal efectuada en el duodeno.

*Metabolizada: Entendido como los metabolitos derivados de la micotoxina original, que son liberados a la circulación sistémica junto a la micotoxina original restante que no ha sido metabolizada por el hígado.

7.1. Bioaccesibilidad.

En la evaluación de la biodisponibilidad oral de una micotoxina, el primer paso es la determinación de su bioaccesibilidad, es decir, el porcentaje de micotoxina liberada desde la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal durante la digestión. La digestión gastrointestinal posibilita la extracción de la micotoxina a partir del alimento y su liberación hacia la fracción acuosa soluble de los fluidos digestivos (quimo) en mayor o menor grado. De este modo, la micotoxina se vuelve bioaccesible, es decir, quedaría disponible para su absorción en el tracto gastrointestinal. Por tanto, es la fracción

micotoxigénica capaz de ser extraída a partir del alimento, alcanzar el intestino y ser susceptible de absorción por el organismo. En condiciones ideales se asume que la bioaccesibilidad de las micotoxinas sería del 100% si se ingieren en agua pura, sin embargo, la matriz alimentaria se considera la principal barrera que dificulta la bioaccesibilidad de las micotoxinas (Versantvoort et al., 2005). Además, la micotoxina puede extraerse del alimento en su forma original o bien adsorbida o conjugada a otros componentes del alimento (Fernández-García et al., 2009).

La digestión gastrointestinal es un proceso fisiológico complejo que comprende la aplicación de un conjunto de procedimientos mecánicos y fisicoquímicos mediante los cuales el alimento es disgregado en partículas más pequeñas y mezclado con diferentes tipos de fluidos digestivos para su transformación mediante tratamientos químicos (condiciones extremas y variables de pH ácido-básico, fuerza iónica, emulsiones, etc.) y reacciones enzimáticas (hidrólisis de carbohidratos, proteínas y grasas, entre otros) que favorecen la liberación de los nutrientes susceptibles de ser absorbidos por el epitelio intestinal. A continuación, se describen las principales etapas del proceso digestivo estándar y su posible influencia sobre la digestión de micotoxinas (Sensoy, 2021):

- En la ***etapa oral***, la masticación disgrega el alimento y lo mezcla con la saliva para formar el bolo alimenticio. La saliva es una disolución acuosa de pH 7 que contiene diferentes tipos de electrolitos inorgánicos y algunos compuestos nitrogenados como la urea, así como la enzima α -amilasa que inicia la descomposición de los carbohidratos con enlaces α -glucosídicos (almidón, glucógeno y oligosacáridos). También contiene una pequeña proporción de lipasas (baja tasa de hidrólisis lipídica) y mucina (para facilitar el paso del bolo hasta el estómago). Esta etapa no tiene una influencia relevante sobre la bioaccesibilidad micotoxigénica más allá de favorecer su extracción indirecta mediante la disgregación mecánica y enzimática del alimento, que es particularmente efectiva en alimentos con una composición mayoritaria en carbohidratos.
- En la ***etapa gástrica***, el bolo llega al estómago, donde el ácido clorhídrico del fluido gástrico reduce el pH por debajo 3, mientras que la pepsina (una combinación de endoproteasas) y la lipasa gástrica realizan la digestión de proteínas y grasas que da lugar al quimo. El tiempo de permanencia del quimo en el estómago es altamente variable según la fase del alimento (sólido o líquido), la cantidad ingerida, la presión osmótica y el contenido calórico del alimento (rango de permanencia entre 1.5-4 h).

Si bien es cierto que esta etapa tiene una función principalmente digestiva, se ha demostrado que el epitelio gástrico también puede absorber ciertas sustancias como el agua, alcohol, determinados minerales, monosacáridos simples e incluso xenobióticos. Sin embargo, no existen evidencias de que las micotoxinas puedan ser absorbidas por el epitelio gástrico a este nivel, pero se ha demostrado que la elevada acidez estomacal tiene un efecto desestabilizante sobre la estructura de algunas micotoxinas como las aflatoxinas.

- Durante la **etapa intestinal** se completa la digestión del alimento (entendida como la liberación de sus nutrientes y demás componentes hacia la fracción soluble digestiva) mediante la adición de la secreción pancreática y de las sales biliares producidas en hígado vía vesícula biliar al quimo, una vez introducido en el primer tramo del intestino delgado (es decir, en el duodeno). Mientras que las enzimas pancreáticas completan la digestión de proteínas, carbohidratos y grasas, las sales biliares neutralizan el pH ácido del quimo y emulsionan de las grasas para facilitar su absorción. A continuación, los nutrientes y el resto de las sustancias extraídas del alimento pre-digerido pasan a ser absorbidas por los enterocitos del epitelio intestinal. Se ha demostrado que la absorción de las micotoxinas transcurre de manera predominante en el duodeno, de lo que se deduce un patrón general de absorción intestinal rápida (Versantvoort et al., 2005). El recorrido del quimo a lo largo del intestino delgado también varía en un rango entre 3-6 h.
- Existe una etapa intestinal adicional que transcurre en el **intestino grueso**, donde la microbiota intestinal presente en esta sección puede metabolizar parcialmente diversos nutrientes no digeridos y así contribuir a la absorción adicional de nutrientes que no hayan podido ser liberados previamente por las enzimas digestivas. La eficiencia de esta etapa es altamente variable según la composición específica de la microbiota del individuo, así como del tipo de alimento ingerido. Con respecto a las micotoxinas, se ha demostrado que determinados microorganismos de la flora intestinal tienen capacidad para incorporar y detoxificar algunas micotoxinas gracias a la versatilidad del metabolismo microbiano (Kabak, 2009). Sin embargo, la localización de la microbiota en el intestino grueso, así como la rápida y predominante absorción de las micotoxinas en el duodeno implicaría que la mayor parte de la micotoxina ya haya sido absorbida previamente al contacto con la microbiota intestinal.

La temperatura a la que transcurre el proceso de digestión se sitúa en torno a los 37 °C. Por otra parte, la peristalsis provocada por los músculos situados en las paredes del tubo digestivo permite el movimiento del alimento a través del tubo digestivo y su mezcla continua con los fluidos y las secreciones digestivas aplicadas (acción mecánica y flujo hidrodinámico).

Las condiciones químicas y enzimáticas aplicadas durante la digestión pueden promover alteraciones estructurales de la micotoxina original, o bien la ruptura de interacciones previamente establecidas entre la micotoxina y otros componentes del alimento (De Saeger & Van Egmond, 2012). El principal factor es el bajo pH gástrico (1-3), que puede generar modificaciones en la estructura de la micotoxina original (como la conversión de la AFB1 en AFB2a, entre otras), e incluso podría facilitar la hidrólisis ácida de enlaces previamente establecidos entre la micotoxina y otros componentes del alimento como las proteínas mediante la activación de la pepsina (Rushing & Selim, 2016). Por otro lado, la acción emulsionante de las sales biliares facilita la disolución de las micotoxinas, dada la baja polaridad de la mayoría de las micotoxinas y su posible interacción inicial con el contenido lipídico en ciertos alimentos. Sin embargo, no parece que las enzimas empleadas durante la digestión tengan un efecto directo sobre las micotoxinas, aunque puedan condicionar de forma indirecta las interacciones establecidas entre la micotoxina y el resto de los componentes digeridos del alimento (Versantvoort et al., 2005).

En cualquier caso, la modificación estructural de la micotoxina original puede alterar su absorción intestinal con efectos desconocidos. También se ha demostrado el potencial de adsorción de ciertos componentes nutricionales de los alimentos (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) sobre los diferentes tipos de micotoxinas.

Teniendo en cuenta lo anterior, la bioaccesibilidad final de las micotoxinas estará determinada por la combinación de los siguientes factores (Rebellato et al., 2021):

- 1) La estructura y propiedades fisicoquímicas de la micotoxina, que determinarán su estabilidad en las condiciones digestivas aplicadas, su capacidad de interacción con el resto de los componentes del alimento digerido y su extracción final hacia la fracción biosoluble digestiva.
- 2) El nivel de micotoxina presente en el alimento.

- 3) La composición del alimento y la forma en que se procesa o cocina, ya que pueden dar lugar a micotoxinas enmascaradas con un comportamiento digestivo diferente al de la micotoxina original.
- 4) La composición específica de los diferentes fluidos digestivos y sus condiciones de aplicación sobre el alimento. Se trata de un factor altamente variable dependiendo de las características del individuo, y del tipo y cantidad de alimento ingerido.

Durante las últimas décadas la bioaccesibilidad de las micotoxinas ha sido evaluada mediante el empleo de estudios *in vivo* e *in vitro*. Los sistemas digestivos *in vivo* representan un enfoque experimental en el que se emplean organismos vivos (animales de experimentación e incluso ensayos clínicos con humanos). Estos estudios emplean condiciones fisiológicas reales y posibilitan el estudio adicional de la absorción intestinal, el metabolismo y la excreción del compuesto de interés. Además, estudian la interacción entre diferentes órganos y sistemas del organismo, así como la influencia de otros factores como la microbiota intestinal, el flujo sanguíneo y las hormonas, entre otros. Los estudios *in vivo* poseen una gran relevancia clínica por su aplicabilidad directa a seres humanos (Sensoy, 2021). Sin embargo, en la práctica estos estudios son muy costosos en tiempo, recursos y requieren personal e instalaciones altamente cualificados (especialmente para trabajar con modelos animales). Por otra parte, los ensayos clínicos con humanos para el estudio de toxinas son prácticamente inviables por su elevado riesgo para la salud. Estos estudios también implican importantes consideraciones éticas respecto a las condiciones de bienestar animal. Además, los resultados obtenidos en animales pueden diferir considerablemente entre especies, motivo por el que la extrapolación de sus resultados a humanos debe considerarse con cautela (Cheli et al., 2015).

Por tanto, las importantes dificultades técnicas, éticas y de seguridad implícitas en la aplicación de los sistemas de digestión *in vivo* han provocado el desarrollo de los modelos digestivos *in vitro*. Se trata de una técnica alternativa consistente en un sistema experimental diseñado para simular el proceso de digestión. Para este propósito, se deben seleccionar unas condiciones lo más realistas y representativas del proceso digestivo, mediante la simulación de las condiciones físicas (masticación, temperatura, peristalsis), químicas (pH, composición de los fluidos digestivos), biológicas (enzimas activas) y su aplicación secuencial en cada etapa de la digestión alimentaria. Las etapas contempladas dentro del proceso de digestión *in vitro* se suelen dividir en digestión oral (fluido salivar simulado a pH neutro, acción enzimática de la α -amilasa y masticación), gástrica (fluido

gástrico simulado a bajo pH, acción enzimática de la pepsina y peristalsis) e intestinal (jugos pancreáticos y sales biliares simulados, neutralización del pH y peristalsis) (Fernández-García et al., 2009). Los modelos de digestión *in vitro* permiten estudiar la digestión, la absorción e incluso el metabolismo de micotoxinas de una manera más simple, rápida y de menor coste ya que no requieren el empleo de condiciones ni instalaciones de manejo específicas y evitan la exposición humana y/o animal a micotoxinas. Por todo ello, se descarta cualquier consideración ética y de seguridad al respecto, si bien es cierto que su enfoque es más limitado que el de los sistemas *in vivo*. Además, permiten establecer un mayor control de las variables implicadas en la digestión, aumentan la versatilidad de las condiciones y la reproducibilidad de los resultados obtenidos entre ensayos con respecto a los modelos *in vivo* (Dixit et al., 2024).

Sin embargo, los sistemas digestivos *in vitro* no abarcan toda la complejidad del sistema digestivo en condiciones *in vivo* y no contemplan algunos procesos fisiológicos relevantes que ocurren durante la digestión, como las interacciones inmunitarias y hormonales que influyen sobre su desarrollo o la existencia de la microbiota intestinal (omitiendo la etapa digestiva que transcurre en el intestino grueso). Esta última etapa digestiva es irrelevante sobre la bioaccesibilidad de las micotoxinas si se tiene en cuenta que estas toxinas se absorben mayoritariamente en el intestino delgado. La falta de dinamismo de las condiciones digestivas aplicadas en los sistemas de digestión *in vitro* estáticos ha supuesto su principal limitación de, ya que establecen unas condiciones de simulación digestiva fijas por defecto. Estos sistemas establecen valores fijos de pH, tiempos y concentraciones enzimáticas en cada etapa y no simulan el movimiento de los alimentos a lo largo del tracto digestivo ni la liberación progresiva de los fluidos digestivos, aunque su simplicidad permite una operatividad sencilla y una elevada reproducibilidad (Sensoy, 2021, Cheli et al., 2015). Para compensar la falta de dinamismo de los sistemas estáticos, estos han evolucionado hacia los sistemas de digestión *in vitro* dinámicos, que consisten en simulaciones más complejas y avanzadas que reproducen las condiciones digestivas desde una perspectiva más cambiante (los cambios de pH, así como la adición de fluidos y de enzimas se aplican de manera progresiva, se simula la peristalsis y la motilidad intestinal e incluso se añaden interacciones con la microbiota intestinal). Aunque se trata de una aproximación más realista y completa del proceso digestivo, los sistemas dinámicos son más costosos, difíciles de operar, requieren más tiempo de ejecución experimental y la elevada complejidad puede reducir la precisión de

los resultados (Fernández-García et al., 2009). Por tanto, ambos tipos de sistemas de digestión *in vitro* (estáticos y dinámicos) se emplean actualmente para evaluar la bioaccesibilidad de las micotoxinas a partir de diferentes tipos de alimento según los objetivos específicos del estudio y el nivel de detalle requerido (González-Arias et al., 2013).

Con respecto a la aplicación específica de modelos digestivos *in vitro* sobre alimentos con micotoxinas, Versantvoort et al., 2005 determinaron por primera vez la bioaccesibilidad de la AFB1 en pasta de cacahuets. Desde entonces, la evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro* de micotoxinas a partir de diferentes matrices alimentarias ha experimentado un notable desarrollo mediante modelos estáticos y dinámicos. Entre las micotoxinas más frecuentemente evaluadas destaca la AFB1, cuya absorción intestinal mayoritaria transcurre mayoritariamente en la parte superior del intestino delgado (en una proporción superior al 75%), siendo sus valores de bioaccesibilidad promedio elevados (superiores al 80%) (González-Arias et al., 2013). Otras micotoxinas evaluadas mediante digestión *in vitro* han sido la ocratoxina A, el deoxinivalenol, la zearalenona, la fumonisina B1, la patulina, las eniatinas, la beauvericina y el nivalenol (Rebellato et al., 2021).

8. Propiedades, toxicidad y metabolismo de las micotoxinas objeto de estudio

A continuación, se detallan las propiedades, toxicidad y metabolismo de las micotoxinas que han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

8.1. Aflatoxinas y esterigmatocistina.

Las aflatoxinas están consideradas como las micotoxinas de mayor toxicidad tanto para mamíferos, peces e incluso aves. Actualmente se han categorizado hasta 20 formas diferentes de aflatoxinas, de las cuales las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2 son las más importantes. Mientras que las aflatoxinas de tipo B y G son sintetizadas directamente por los hongos micotoxigénicos, las aflatoxinas de tipo M son metabolitos hidroxilados producidos por el metabolismo hepático de la AFB1 y AFB2 en mamíferos (Rushing & Selim, 2019). Otros metabolitos derivados del metabolismo humano y animal de las aflatoxinas originales como el aflatoxicol y las aflatoxinas P1 y Q1 no han sido considerados porque, además de no estar contemplados en la legislación vigente, tampoco

son tan frecuentes ni tóxicos como las aflatoxinas M1 y M2. En cuanto a la esterigmatocistina (STG), aunque no es una aflatoxina, su origen biosintético común, su elevada similitud estructural y sus efectos tóxicos comunes (especialmente a nivel carcinogénico) permiten vincularla con las aflatoxinas (Díaz Nieto et al., 2018).

Las aflatoxinas presentan una solubilidad muy limitada en agua (10-20 mg/L), así como una elevada solubilidad y estabilidad en disolventes orgánicos (acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), dimetilsulfóxido (DMSO), cloroformo y acetona, entre otros). En general, presentan una elevada absorbancia a 265 nm y a 360 nm, así como fluorescencia inherente cuando se exponen a la luz ultravioleta (las aflatoxinas de tipo B y la aflatoxina M1 emiten a 425 nm y las de tipo G emiten a 450 nm debido al grupo ciclopentano de las B y al anillo lactónico de las G). Con respecto a su tamaño, aunque en general tienen masas moleculares similares, los números 1 ó 2 de su nomenclatura se corresponden con una diferente movilidad cromatográfica relativa en cromatografía en capa delgada (Tahir et al., 2018). Estas moléculas son sensibles a la luz ultravioleta (especialmente cuando se hallan en disolución), a la presencia de oxígeno, así como a condiciones de pH extremos, pudiendo ser degradadas mediante tratamientos químicos con ácidos y bases. Las modificaciones sufridas por estos tratamientos químicos pueden ser de carácter reversible tras la restauración del pH original (Carvajal, 2013).

Además, las aflatoxinas destacan por su elevada termoestabilidad, con estructuras químicas capaces de resistir temperaturas de hasta 237-306 °C. Sin embargo, su termoestabilidad depende de varios factores: la temperatura aplicada, la presencia y proporción de agua presente (que disminuye su estabilidad térmica), la duración del tratamiento aplicado, la composición del alimento, la fuerza iónica y la aplicación de otros factores como, por ejemplo, la presencia de ácidos/bases, altas presiones, etc (Rustom, 1997). Sin embargo, se ha demostrado su capacidad para resistir tratamientos térmicos como la ultrapasterización, la cocción, la fritura e incluso la nixtamalización, lo que supone un grave problema para su detoxificación a escala industrial y doméstica previo a la ingesta de alimentos contaminados.

Las propiedades fisicoquímicas de la esterigmatocistina aún se desconocen en su mayor parte, al tratarse de una micotoxina que tradicionalmente no ha sido contemplada en la legislación. Sin embargo, su elevada similitud estructural con la aflatoxina B1

implica un comportamiento similar a ésta, al menos en lo referente a su estabilidad en disolución (Veršilovskis & de Saeger, 2010).

El orden de toxicidad de las aflatoxinas es $B1 > G1 > B2 > G2 > M1 > M2$, por lo que la aflatoxina B1 es considerada como la más tóxica, unido además a su elevada prevalencia sobre las demás en alimentos. Sin embargo, esta clasificación general puede variar en función del tejido u órgano expuesto y de la aproximación experimental realizada (Tahir et al., 2018). Las enfermedades derivadas de la exposición a estas micotoxinas se conocen como aflatoxicosis, con síntomas agudos o crónicos según el nivel de exposición, siendo el hígado el órgano más afectado dada su función detoxificadora. Se han demostrado además sus efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e inmunosupresores tanto en humanos como en animales. Las aflatoxicosis agudas están vinculadas a una elevada exposición durante un corto período de tiempo, pudiendo provocar un 25% de mortalidad, aunque son menos comunes que las crónicas. Los niños son más vulnerables a ellas que los adultos (Williams et al., 2004). Las intoxicaciones agudas producen diarrea, inflamación intestinal, letargia, edema, ictericia, hepatitis severa y hemorragias, entre otros síntomas. Por el contrario, las aflatoxicosis crónicas están vinculadas con síntomas a largo plazo como inmunosupresión, la disfunción nutricional y con la proliferación de diversos tipos de cáncer (con una alta incidencia de hepatocarcinomas), motivo por el que la IARC clasificó a todas las aflatoxinas con el máximo nivel de carcinogenicidad, considerando la exposición a ellas como una de las principales causas de la aparición de hepatocarcinomas (Benkerroum, 2020).

Al contrario que las aflatoxinas, la toxicidad generada en el organismo por la exposición a la esterigmatocistina no es muy conocida, aunque esta micotoxina también se ha vinculado con el riesgo de padecer cáncer hepático, intestinal y gástrico, de acuerdo con diversos estudios (Zingales et al., 2020). Esta micotoxina también se ha relacionado con daños hepáticos y renales agudos, la interrupción del crecimiento y del desarrollo metabólico, desórdenes gastrointestinales y con una influencia negativa sobre la función inmunitaria (Veršilovskis & de Saeger, 2010).

También se ha propuesto que las aflatoxinas y la esterigmatocistina pueden generar efectos neurotóxicos, estando relacionadas incluso con el auge y progresión de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (V. T. T. Nguyen et

al., 2022). Sin embargo, sus posibles efectos neurotóxicos son menos evidentes a nivel clínico y están aún en fase de investigación a niveles *in vitro* e *in vivo* (Bhat et al., 2016).

El potencial neurotóxico de las aflatoxinas y de la esterigmatocistina deriva principalmente de su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB), de su capacidad para generar estrés oxidativo, de su genotoxicidad (Qureshi et al., 2015), de su capacidad disruptiva sobre la señalización y el ciclo celulares y de su capacidad estimulante de la apoptosis celular. En el caso de la esterigmatocistina depende, además, de su capacidad para desestabilizar el metabolismo y la función mitocondrial (Zingales et al., 2020b). Estos efectos moleculares han resultado ser los desencadenantes en última instancia de las principales enfermedades provocadas por estas micotoxinas, de acuerdo con Chen et al., 2023.

La elevada influencia de las aflatoxinas sobre el desarrollo del cáncer hepático se debe a que el hígado es el principal órgano encargado de la metabolización de las aflatoxinas para así neutralizar sus efectos tóxicos (a excepción de una posible capacidad de metabolización residual por el epitelio gastrointestinal). La citotoxicidad de las aflatoxinas se debe fundamentalmente a su inestabilidad electrónica, lo que aumenta considerablemente el estrés oxidativo dentro de las células, que provoca la oxidación de proteínas, el ácido desoxirribonucleico (DNA) y los lípidos de membrana. Esta elevada capacidad oxidante provoca la pérdida de funcionalidad de las proteínas celulares, daños en el DNA, pérdida en la integridad de las membranas celulares, interrupción de la señalización celular y, finalmente, la muerte celular (Benkerroum, 2020).

Para prevenir estos daños, el metabolismo hepático transforma las aflatoxinas originales en metabolitos de menor toxicidad que se tratan de conjugar con otras biomoléculas para facilitar su detoxificación y excreción. Estas transformaciones metabólicas son llevadas a cabo principalmente por las enzimas pertenecientes al complejo del citocromo P450, en un proceso que consta de dos fases (Dohnal et al., 2014). En la primera fase, las enzimas del complejo (fundamentalmente CYP1A2 y CYP3A4) catalizan la reducción de diversos grupos cetónicos presentes en la molécula, dando lugar a diferentes metabolitos hidroxilados como las aflatoxinas M1, P1, Q1, B2a, H1 y aflatoxicol (este último catalizado por una NADPH reductasa), y también catalizan la epoxidación de la molécula que da lugar a la aflatoxina B1-8,9-epóxido (AFBO, formada por dos isómeros endo- y exo-), como se detalla en la **Figura 15** (Rushing & Selim, 2019).

Solamente las aflatoxinas B1, G1 y M1 pueden ser epoxidadas debido a que contienen un doble enlace en la posición 8,9 del anillo de furano. Con estas reacciones se pretende aumentar la estabilidad electrónica de las aflatoxinas para disminuir su capacidad oxidante, si bien los metabolitos generados son aun parcialmente tóxicos. Mientras que los metabolitos hidroxilados pueden ser excretados de forma directa (o metabolizados de nuevo para dar lugar a otros metabolitos, como ocurre con la aflatoxina M1), la elevada inestabilidad electrónica de la AFBO dota a este metabolito de una elevada afinidad de unión a las proteínas y a las bases nitrogenadas del DNA, lo que requerirá de su conjugación a biomoléculas como el glutatión o la albúmina (previa hidroxilación a AFB1-dialdehído) para neutralizarla y proceder a su excreción de forma segura durante la segunda fase del metabolismo aflatoxigénico (Marchese et al., 2018) así como su excreción directa previa conversión en un dihidroalcohol. Sin embargo, una parte de estos metabolitos se une de manera indeseada a residuos de lisina de proteínas celulares provocando su desnaturalización. Además, una parte de la AFBO no conjugada resulta genotóxica, es decir, posee una gran afinidad de unión a las bases nitrogenadas de guanina presentes en genes específicos como el p53, un gen fuertemente involucrado en la regulación del ciclo celular (AFB1-N7-Guanina), de acuerdo con la **Figura 15** (Rushing & Selim, 2019). Este intercalamiento génico del AFBO provocará mutaciones en éste y otros genes mediante generación de sitios apurínicos y del aducto AFB1-Formamidopiridina (AFB1-FAPy), que alterarán la regulación de la proliferación celular y provocarán que la célula se vuelva cancerígena. Estas rutas metabólicas son comunes a humanos, animales, e incluso peces y aves, aunque el grado de metabolización varía según el tipo de aflatoxina y la especie, siendo más fácil de epoxidar la aflatoxina B1 que el resto de las aflatoxinas. Este hecho permite explicar su mayor citotoxicidad, mientras que la aflatoxina M1 es menos propensa a ser transformada en AFBO (Wogan & Paglialung, 1974).

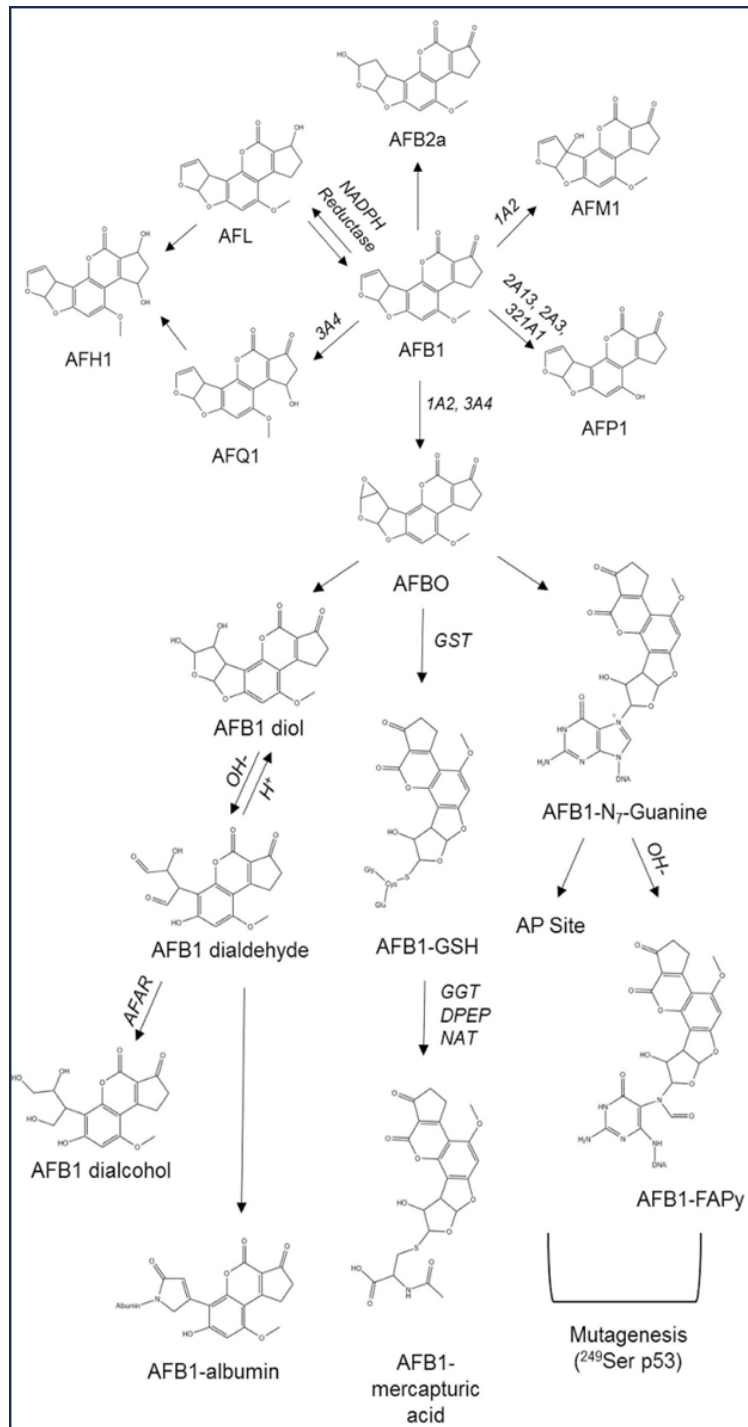


Figura 15. Esquema del metabolismo humano y animal de la aflatoxina B1 (representativo para las aflatoxinas B y G), procedente de la revisión efectuada por Rushing & Selim, 2019. GST: Glutathion S-transferasa; AFAR: Aflatoxina aldehído reductada; GGT: γ -glutamiltanspeptidasa; DPEP: Dipeptidasa; NAT: N-acetiltransferasa; AP-Site: Sitio Apurínico.

El metabolismo específico de la esterigmatocistina es menos conocido que el de las aflatoxinas (Zingales et al., 2020c), aunque se considera que su elevada similitud

estructural con respecto a la aflatoxina B1 implica que la activación metabólica de la esterigmatocistina ocurre en el mismo sitio que en la aflatoxina B1 (es decir, insaturación entre los C8-C9), de tal manera que la esterigmatocistina también puede ser epoxidada en esta posición (Esterigmatocistina-8,9-epóxido), como demostraron experimentalmente Essigmann et al., 1979 y Essigmann JM, 1980 a niveles *in vitro* e *in vivo*. Estos autores confirmaron de forma indirecta la epoxidación de la esterigmatocistina mediante la obtención del aducto genotóxico 1,2-dihidro-2-(N7-guanil)-1-hidroxi-STG, cuya generación requiere de la epoxidación previa de la esterigmatocistina en las posiciones C8-C9. Además, Pfeiffer et al., 2014 hallaron una ruta metabólica alternativa consistente en la hidroxilación adicional del anillo fenólico de la esterigmatocistina, que da lugar a la formación de un metabolito catecol. Esta ruta también demostró ser una vía mayoritaria de detoxificación comparada con la epoxidación, siendo catalizada también por las isoenzimas del citocromo P450.

8.2. Ocratoxina A.

Esta micotoxina se descubrió y se caracterizó por primera vez en 1965 y, desde entonces, se le considera entre las micotoxinas de mayor relevancia por tres motivos: 1) su elevada toxicidad, que puede afectar a diferentes órganos, 2) su presencia en alimentos de diversa índole, tanto de origen vegetal como animal, lo que podría estar relacionado con la prevalencia de esta micotoxina en cultivos, y 3) su estructura estable, lo que dificulta su detoxificación. Estos rasgos han centrado el interés sobre la ocratoxina A sobre el resto de ocratoxinas conocidas (ocratoxinas B, C, α , β , ocratoxinas A y B hidroxiladas), las cuales son bastante menos frecuentes y tóxicas (Ding et al., 2023).

En general, se trata de una micotoxina con baja solubilidad en agua (<1 mg/mL), lo que contrasta con la elevada solubilidad acuosa de la fenilalanina (aminoácido del que deriva estructuralmente esta micotoxina). Por el contrario, es altamente soluble y estable en disolventes orgánicos polares como MeOH, EtOH, ACN y cloroformo, entre otros, aunque su solubilidad acuosa puede aumentar en su forma de sal sódica. Esta micotoxina se comporta como un ácido débil capaz de absorber radiación ultravioleta a 215 y 333 nm y de emitir fluorescencia a un máximo de 465 nm. Además, la presencia de un átomo de cloro en su estructura destaca como sustituyente poco común en comparación con el resto

de las micotoxinas y está considerado como la principal fuente de toxicidad de la ocratoxina A (Ding et al., 2023).

Se trata de una molécula con una estabilidad variable en función de las condiciones fisicoquímicas aplicadas. Por un lado, se ha demostrado una inestabilidad relativa frente a la irradiación con luz ultravioleta y con radiaciones ionizantes gamma. Por otro lado, también es inestable en presencia de múltiples agentes químicos como el hipoclorito sodio, ácido fórmico (HCOOH) y ácido propiónico en bajas concentraciones, frente a bases (amonio e hidróxido de sodio) y a agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, ozono e incluso en presencia de oxígeno), de acuerdo con Varga et al., 2010. Sin embargo, la ocratoxina A ha demostrado ser una molécula con una elevada termoestabilidad. Si bien es cierto que esta micotoxina puede resistir temperaturas de hasta 150-200 °C, su termoestabilidad es altamente variable según si está sólida o en disolución, así como el tipo de disolvente, la composición de la matriz alimentaria en la que esté presente, según el tipo de calentamiento (seco o húmedo) y la duración del tratamiento aplicados (Scott, 1996). Este hecho dificulta su detoxificación. Finalmente, su elevada capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) de forma directa a nivel intracelular permite suponer cierta inestabilidad electrónica en su estructura que dota a la molécula de capacidad oxidante.

En la actualidad se ha confirmado que la ocratoxina A es nefrotóxica, hepatotóxica, carcinogénica (clase 2B según la IARC), teratogénica, neurotóxica, inmunotóxica y tóxica a nivel reproductivo, tanto en humanos como en diferentes animales. El riñón es el principal órgano afectado por la ocratoxina A, cuya toxicidad provoca graves enfermedades renales como la nefropatía tubulointersticial, así como tumores del tracto urinario e incluso fallo renal, entre otros problemas renales de elevada mortalidad (Tao et al., 2018). También se ha demostrado su influencia sobre la proliferación de hepatocarcinomas, su efecto inmunosupresor sobre las células de tipo NK de la inmunidad innata y sobre la síntesis del interferón, así como su capacidad para alterar la integridad de la BBB. También se ha demostrado que se acumula en los tejidos nerviosos del Sistema Nervioso Central, estando relacionada con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Niaz et al., 2020).

Aunque los mecanismos moleculares específicos que desencadenan los efectos anteriormente descritos aún no son del todo conocidos, sí se ha demostrado que la

toxicidad derivada de la exposición a la ocratoxina A se halla fuertemente vinculada con su gran capacidad para generar ROS y especies reactivas de nitrógeno (NRS) intracelulares (Abdel-Wahhab et al., 2017). Estos radicales libres provocan un desequilibrio del balance oxidativo celular que, en última instancia, causará la oxidación de los lípidos de membrana, las proteínas y el DNA, entre otras macromoléculas. La oxidación de estos componentes celulares provocará alteraciones de la integridad de membranas, desnaturalización de enzimas clave para el funcionamiento celular, interrupción del metabolismo mitocondrial, mutaciones del DNA y descontrol de las cascadas de señalización celular que provocarían finalmente la apoptosis celular o bien la conversión en células cancerosas (Tao et al., 2018). Con respecto a la neurotoxicidad, también se ha demostrado que la analogía estructural de la ocratoxina A con el aminoácido fenilalanina (precursor metabólico de neurotransmisores como la dopamina) puede alterar la comunicación neuronal de diferentes formas, de acuerdo con Sava et al., 2006.

El metabolismo de la ocratoxina A consta de dos fases (I y II). La fase I puede transcurrir en el intestino, hígado y riñones, y consiste en la modificación de la estructura original para originar metabolitos de menor toxicidad. Estas modificaciones son catalizadas mayoritariamente por las isoenzimas del complejo del citocromo P450 (CYP450) y transcurren mediante varias rutas metabólicas. Una de ellas es la eliminación del sustituyente fenilalanilo que da lugar a la ocratoxina α ($OT\alpha$, catalizada por la carboxipeptidasa A, tripsina, α -quimotripsina y catepsina C). Otra, la declorinación que da lugar a la ocratoxina B, que a su vez puede generar la ocratoxina β ($OT\beta$) por escisión posterior del sustituyente fenilalanilo. También puede producirse la hidroxilación que da lugar a la 10-hidroxi-OTA (10-OH-OTA) y a la 4-hidroxi-OTA (4-OH-OTA) o la sustitución del cloro por un grupo quinona. Además, de manera excepcional, se puede dar la hidrólisis de la lactona, dando lugar a LO-OTA, un metabolito aún más tóxico que la ocratoxina A. A continuación, la ocratoxina A original no metabolizada y algunos de sus metabolitos derivados se conjugan con glutatión, ácido glucurónico, sulfatos o hexosas/pentosas durante la fase II del metabolismo (principalmente en hígado) para reducir su toxicidad y facilitar su excreción urinaria (Tran et al., 2020). Las diferentes rutas metabólicas de la ocratoxina A se detallan en el esquema de la **Figura 16**.

Finalmente, la baja eficiencia y la lentitud del metabolismo de la ocratoxina A, añadido a su elevada tasa de absorción intestinal y a la elevada afinidad de unión de esta micotoxina y sus metabolitos a la albúmina sérica (que aumenta considerablemente su

instituciones internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), las micotoxinas de mayor interés son: las aflatoxinas, el deoxinivalenol, las ocratoxinas, las fumonisinas, la zearalenona, las toxinas T-2 y HT-2, la citrinina, la patulina y, en menor medida, las toxinas de *Alternaria*, los alcaloides ergóticos y la esterigmatocistina (Owolabi et al., 2023). Además de su frecuente presencia en los alimentos, el interés en estos tipos de micotoxinas está motivado por su elevada toxicidad. En la **Tabla 3** se recogen los alimentos más frecuentemente relacionados con cada tipo de micotoxinas, de acuerdo con los datos de la FAO, la EFSA y del Sistema Europeo de Alerta Rápida en Piensos y Alimentos (Rapid Alert System Feed and Food, RASSF), entre otros organismos internacionales, así como los límites máximos de ingesta diaria tolerable (TDI) establecidos por la EFSA para algunas de las micotoxinas.

Tabla 3. Tipos de alimentos más susceptibles a la contaminación por los principales tipos de micotoxinas de mayor relevancia tóxica y límites de ingesta diaria tolerable (TDI, $\mu\text{g}/\text{kg}$ *Body Weight/day*) establecidos por la EFSA para estas micotoxinas (en el caso de haber sido establecidos).

Micotoxina	Tipo de Alimento	Ejemplos más frecuentes	TDI
Aflatoxinas B y G	Piensos y forraje (+)	Múltiple	*MOE < 10,000 (Schrenk, Bignami, et al., 2020)
	Cereales (+)	Maíz (+), arroz (+), trigo (+), sorgo, cebada, centeno, avena y derivados (cervezas)	
	Frutos secos (+)	Almendra (+), pistacho (+), nuez, anacardo, castaña	
	Semillas oleaginosas (+)	Cacahuete (+), soja, lenteja, semillas de algodón, girasol, mostaza, linaza, cártamo, canola y colza	
	Frutas desecadas (+)	Higo (+), uva pasa, mango y frutas escarchadas (múltiple)	
	Especias (+)	Cúrcuma, chiles, jengibre, cilantro, pimienta negra, pimentón, comino, nuez moscada	
	Frutas frescas	Coco, cacao, uvas, albaricoques y derivados (vinos y zumos)	
	Hierbas	Múltiple	
	Otros	Café, miel, carnes, quesos, huevos, pescados	
Aflatoxina M1	Alimentos de origen animal (+)	Leches animales y humanas (+), derivados lácteos, carnes.	*MOE < 10,000 (Schrenk, Bignami, et al., 2020)
Esterigmatocistina	Piensos y forraje (?)	Múltiple	-
	Cereales (?)	Maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, sorgo y derivados (cervezas)	
	Semillas oleaginosas (?)	Cacahuete, soja, semillas de girasol, colza	
	Frutos secos (?)	Pistacho	
	Especias (?)	Pimienta negra, pimentón, hinojo, comino, chiles	
	Otros (?)	Café, cacao, carnes curadas, leche, quesos (+), vegetales, hortalizas	

Tabla 3. Continuación.

Micotoxina	Tipo de Alimento	Ejemplos más frecuentes	TDI
Ocratoxina A	Piensos y forraje	Múltiple	*MOE = 10,000 (Schrenk, Bodin, et al., 2020)
	Cereales (+)	Trigo (+), maíz, arroz, avena, cebada, centeno y derivados (cerveza)	
	Semillas oleaginosas	Soja, semillas de girasol	
	Frutas frescas (+)	Uvas y derivados (vinos y zumos) (+)	
	Frutas desecadas (+)	Uvas pasas, albaricoques, dátiles, higos, mango	
	Frutos secos	Pistachos	
	Espicias	Nuez moscada, chile, pimentón, jengibre, pimienta negra, cúrcuma	
	Otros (+)	Cacao (+), café (+), leche, quesos (+), carnes (+), regaliz	
Zearalenona	Piensos y forraje	Múltiple	0.25 µg / kg BW / day (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2016)
	Cereales (+)	Trigo (+) y maíz (+), arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y derivados (cerveza)	
	Semillas oleaginosas	Cacahuetes, soja, semillas de girasol, judías	
	Frutas desecadas	Higos	
	Espicias	Pimentón, chiles	
	Alimentos de origen animal	Leche, carne, huevos	
	Otros	Hierbas aromáticas y medicinales	
Deoxinivalenol	Piensos y forraje	Múltiple	1 µg / kg BW / day (Knutsen et al., 2017)
	Cereales (+)	Trigo (+), maíz (+), avena, cebada, centeno y derivados (pasta, panadería y bollería, cerveza)	

Tabla 3. Continuación.

Micotoxina	Tipo de Alimento	Ejemplos más frecuentes	TDI
Nivalenol	Piensos y forraje	Múltiple	1.2 µg / kg BW / day (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2013)
	Cereales (+)	Trigo (+), maíz (+), avena, cebada, centeno y derivados (pasta, panadería, bollería, cerveza)	
	Otros	Productos de confitería	
Toxinas T-2 y HT-2	Piensos y forraje	Múltiple	0.02 µg / kg BW / day (T-2 + HT-2) (Arcella et al., 2017)
	Cereales (+)	Avena (+), trigo (+), maíz (+), arroz, cebada, centeno, sorgo y derivados (pasta, panadería, bollería, cerveza)	
Fumonisina B1	Piensos y forraje	Múltiple	1 µg / kg BW / day (FB1-FB4) (Knutsen et al., 2018)
	Cereales (+)	Maíz (+), trigo, cebada, arroz, sorgo y derivados (cerveza)	
	Semillas oleaginosas	Soja	
	Especias	Chiles, cilantro, curry	
	Hierbas	Té negro, infusiones	
Patulina	Frutas frescas (+)	Manzana (+), pera, melocotón, fresa, uvas y derivados (zumo de manzana y sidra)	0.4 µg / kg BW / day (Majerus et al., 2002)
Citrinina	Piensos y forraje	Múltiple	0.2 µg / kg BW / day (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2012b)
	Cereales (+)	Arroz de levadura roja (+), centeno (+), trigo, maíz, cebada y derivados	
	Frutas frescas (+)	Manzana (+), coco y derivados	
	Leguminosas	Judías, guisantes	
	Otros	Frutos secos, vegetales, quesos, aceitunas, hierbas	

Tabla 3. Continuación.

Micotoxina	Tipo de Alimento	Ejemplos más frecuentes	TDI
Eniáticas / Beauvericina	Piensos y forraje	Múltiple	-
	Cereales (+)	Cebada (+), trigo (+), centeno (+), maíz (+), arroz, avena y derivados (pasta, panadería, bollería)	
	Semillas oleaginosas	Cacahuetes, soja, semillas de girasol	
	Frutas desecadas	Higos	
	Otros	Café y derivados	
	Frutas frescas y verduras (?)	Múltiple	
Alcaloides ergóticos	Piensos y forrajes	Múltiple	0.6 µg / kg BW / day (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2012a)
	Cereales (+)	Centeno (+), trigo, cebada, mijo, avena y derivados (pasta, panadería, bollería)	
Toxinas de <i>Alternaria</i> (AOH, AME, TeA, TEN)	Piensos y forraje	Múltiple	-
	Cereales (+)	Maíz, trigo, avena, arroz, cebada, centeno y derivados (pasta, panadería, bollería, cerveza)	
	Semillas oleaginosas (+)	Soja, semillas de girasol, sésamo, lino	
	Frutas y hortalizas (+)	Peras (+), tomates (+), uvas, ciruelas, bayas, albaricoques, manzanas, naranjas	
	Frutos secos (?)	Castañas (+), nueces, avellanas, almendras	
	Frutas desecadas (?)	Higos (+)	
	Espicias (?)	Pimentón	
	Otros (?)	Aceite de oliva, hierbas	

(+): Prevalencia especialmente elevada en el tipo de alimento.

(?): Prevalencia irregular aún por documentar en el tipo de alimento (en el caso de micotoxinas emergentes y/o menos monitorizadas).

*Teniendo en cuenta la elevada genotoxicidad de ciertos tipos de micotoxinas independientemente de la dosis de exposición, el Comité Científico de la EFSA considera que no se puede establecer ningún valor de TDI como referencia, por lo que se emplea el enfoque basado en el margen de exposición (MOE), un valor de estimación del peligro sanitario sin cuantificación del riesgo. Según este indicador: 1) $MOE \geq 10,000$ = Riesgo Bajo de Peligro de la sustancia cancerígena; 2) $MOE < 10,000$ = Riesgo para la salud del consumidor a cualquier nivel de exposición.

Los estudios de determinación de micotoxinas en alimentos han permitido establecer ciertos patrones específicos de contaminación de las diferentes micotoxinas en función de los tipos de alimentos. Los cereales y, en menor medida, las semillas oleaginosas (pseudocereales) y los frutos secos son los alimentos más frecuentemente contaminados a nivel global por diferentes tipos de micotoxinas. Por el contrario, otros alimentos más específicos como la leche u otros productos de origen animal son más susceptibles a la contaminación por micotoxinas específicas como la aflatoxina M1 y M2, al tratarse de metabolitos generados por el propio animal a partir de la micotoxina original.

En línea con lo anterior, también se ha demostrado que los alimentos de origen vegetal y los alimentos que se consumen crudos presentan una mayor prevalencia de contaminación micotoxigénica, si bien es cierto que los alimentos procesados tampoco están exentos de riesgo (Gil-Serna et al., 2020). Esto se debe a que las plantas son los principales organismos susceptibles a la colonización por hongos micotoxigénicos, y a la resistencia de las micotoxinas a la mayoría de los tratamientos aplicados para su detoxificación una vez presentes en los alimentos. Por otra parte, el auge del cultivo ecológico, en ausencia de fitosanitarios y de abonos de composición química, no parece alterar significativamente la prevalencia micotoxigénica en los productos de origen vegetal más afectados por micotoxinas (Wang et al., 2024). Estos autores realizaron una revisión bibliográfica sobre la influencia de la técnica de cultivo aplicada (convencional o ecológico) sobre la incidencia de diferentes micotoxinas, y solamente hallaron diferencias significativas en la prevalencia del deoxinivalenol, con una menor incidencia en cultivos ecológicos. Por el contrario, no hallaron diferencias relevantes respecto a la

incidencia de otras micotoxinas como las toxinas T-2/HT-2, zearalenona, eniatinas, beauvericina, ocratoxina A, ni aflatoxinas.

Los productos agrícolas procedentes de países del tercer mundo y en vías de desarrollo son los más afectados por contaminaciones micotoxigénicas. Esto se debe a las deficiencias de su infraestructura agrícola en lo referente a la optimización de las técnicas de cultivo, a una incorrecta manipulación y almacenamiento de los productos, así como la falta de implementación de sistemas eficientes para la detoxificación de las micotoxinas ya presentes en los alimentos (Khodaei et al., 2021). Teniendo en cuenta que dichos países son grandes exportadores de cereales, semillas y demás productos vegetales, su mayor prevalencia de contaminación adquiere una escala global.

Si se considera que los cereales son la base de la dieta común a nivel global, así como la materia prima con la que se fabrican numerosos productos derivados tanto para consumo humano como animal, la elevada frecuencia e intensidad de contaminación por micotoxinas en cereales supone un grave problema en términos económicos y sanitarios. Además, el hecho de que la mayoría de los piensos de alimentación animal se manufacturen a partir de cereales explica la presencia de micotoxinas también en alimentos de origen animal (Khaneghah et al., 2018). Adicionalmente, el auge de nuevas tendencias alimentarias como el vegetarianismo y veganismo ha supuesto una dependencia aún mayor si cabe de los cereales, las semillas y los frutos secos como pilares fundamentales de la alimentación para una población en continuo aumento. Estas nuevas tendencias de consumo han reposicionado la problemática tradicional de las micotoxinas en alimentos de origen vegetal como un desafío reemergente a nivel global (Gil-Serna et al., 2020).

Aunque la mayoría de las micotoxinas de relevancia toxicológica presentan una elevada frecuencia de contaminación en cereales, semillas oleaginosas y frutos secos (**Tabla 3**), el control alimentario se ha focalizado principalmente en las aflatoxinas, las cuales, aun siendo muy frecuentes en estos tipos de alimentos, se suelen encontrar en cantidades inferiores a otras micotoxinas como el deoxinivalenol, la zearalenona, la ocratoxina A e incluso las fumonisinas (Khaneghah et al., 2018.). Sin embargo, su toxicidad es mayor.

La elevada toxicidad de las aflatoxinas que, como se ha mencionado anteriormente, son las únicas micotoxinas que ostentan el nivel 1 de carcinogenicidad por

la IARC, ha generado un incremento del seguimiento y control de estas micotoxinas en alimentos por parte de los sistemas de vigilancia nacionales e internacionales. Este hecho, sumado al establecimiento de límites máximos más restrictivos para las aflatoxinas que para el resto de las micotoxinas en alimentos por la legislación vigente, ha favorecido el considerable aumento del número de alertas registradas por parte de organismos internacionales. Tal es el caso de la RASFF, el organismo europeo que monitoriza y registra todas las alertas positivas por contaminaciones de aflatoxinas presentes en alimentos comercializados dentro de la UE procedentes de países internos y externos. Solamente este organismo registró un total de hasta 606 alertas que excedían los límites máximos de aflatoxinas en diferentes alimentos durante los dos últimos años (01/2023 - 07/2024), una cantidad de alertas muy superior a las recibidas para el deoxinivalenol, la zearalenona, la ocratoxina A o las fumonisinas durante el mismo período de tiempo (Rapid Alert System Feed and Food, RASSF), como se puede apreciar en el gráfico A de la **Figura 17**. Entre los alimentos más frecuentemente contaminados por aflatoxinas y que han sido registrados por la RASSF destacan las semillas oleaginosas, los frutos secos, las frutas desecadas, los cereales, las especias y sus productos derivados, como se muestra en el gráfico B de la **Figura 17**.

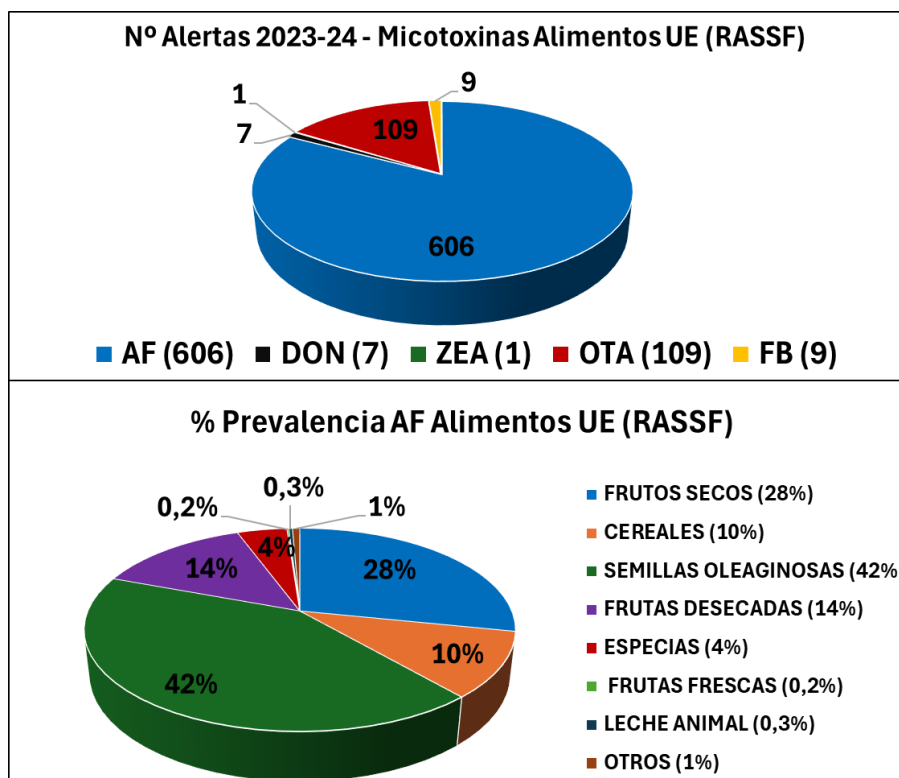


Figura 17. Alertas positivas por contaminaciones micotoxigénicas registradas por la RASSF entre el 01/2023 y el 07/2024. A) Número de alertas registradas para aflatoxinas, deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A y fumonisinas B en todo tipo de alimentos. B) Porcentajes de prevalencia de aflatoxinas en los diferentes tipos de alimentos contaminados que han sido notificados (frutos secos, cereales, semillas oleaginosas, frutas desecadas, especias, frutas frescas, leche animal y otros).

Sin embargo, se debe de tener en cuenta que la prevalencia de aflatoxinas es altamente variable según las tendencias de consumo dentro de la Unión Europea (UE) y de los lugares de origen de la producción alimentaria, entre otros factores. Si se tiene en cuenta que más de la mitad de las alertas por aflatoxinas se han producido en semillas oleaginosas y en cereales, que componen la base de la dieta, estos son los alimentos que más contribuyen al riesgo al consumo de micotoxinas.

En la **Tabla 4** se recogen diversos estudios relacionados en la determinación de las aflatoxinas más relevantes en estos tipos de alimentos (cereales, semillas oleaginosas, frutos secos y sus productos derivados) desde 2018 hasta la actualidad.

Tabla 4. Estudios de monitorización de aflatoxinas en cereales, semillas oleaginosas (pseudocereales), frutos secos y productos derivados publicados entre 2018-2024, (Khodaei et al., 2021, Nazareth et al., 2024, Balan et al., 2024 y Hellany et al., 2023, entre otros).

Cereales y Derivados							
Cereal y Derivados	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FC (%)	Ref.
Arroz	AFB1	2018	Tailandia	30	ND-2.33	23	(Choochuay et al., 2018)
Arroz	AFB1	2020	Vietnam	144	ND-93	9	(Do et al., 2020)
Arroz	AFB1	2018	Brasil	25	4.9	4	(Savi et al., 2018)
Arroz	AFB1	2018	China	13	ND-16.7	77	(Ma et al., 2018)
Arroz	AFs	2019	Arabia Saudí	88	0.01 -0.12	-	(Al-Zoreky & Saleh, 2019)
Arroz	AFB1	2018	Oeste de África	88	ND-14	56	(Manizan et al., 2018)
Arroz	AFB1	2018	Pakistán	180	ND-44.1	56	(Majeed et al., 2018)
Arroz	AFB1	2019	China	100	ND-0.14	2	(Y. Zhao et al., 2019)
Arroz	AFs	2019	Guyana	182	ND-172	8	(Morrison et al., 2019)
Arroz	AFs	2019	Grecia	26	ND-0.6	31	(Skendi et al., 2020)
Arroz	AFB1	2019	Ghana	27	ND-65.7	52	(Korley Kortei et al., 2019)
Arroz	AFs	2021	Nigeria	40	ND-6.42	50	(Suleiman et al., 2021)
Arroz	AFB1	2020	Pakistán	62	ND-71.56	66	(Xia et al., 2020)
Arroz	AFs	2020	Nigeria	116	2.1-248.2	100	(Onyedum et al., 2020)
Bebida de arroz	AFs	2022	España	10	ND	-	(Juan et al., 2022)

Tabla 4. Continuación.

Cereales y Derivados							
Cereal y Derivados	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FC (%)	Ref.
Bebida de arroz	AFs	2024	España	6	ND-0.05	66	(Rodríguez-Cañás et al., 2024)
Maíz	AFB1	2019	Kenia	338	2.14-411	100	(Nabwire et al., 2020)
Maíz	AFs	2019	Somalia	42	28.3-1080	100	(Wielogorska et al., 2019)
Maíz	AFB1	2019	Timor-Leste	116	ND >100	32	(de Almeida et al., 2019)
Maíz	AFB1	2018	Vietnam	378	ND- 417	91	(Nguyen et al., 2018)
Maíz	AFs	2018	Qatar	10	ND-120	70	(Hassan et al., 2018)
Maíz	AFB1	2018	Tailandia	30	ND-11.72	77	(Choochuay et al., 2018)
Maíz	AFB1	2020	Vietnam	189	ND-1572	30	(Do et al., 2020)
Maíz	AFs	2019	Ghana	34	ND-821	76	(Dadzie et al., 2019)
Maíz	AFs	2020	Haití	20	ND-185.9	55	(Aristil et al., 2020)
Maíz	AFs	2018	Kenia	130	ND-72	58	(Gachara et al., 2018)
Maíz	AFB1	2018	China	250	ND-67.6	96	(Ma et al., 2018)
Maíz	AFs	2018	Etiopia	100	ND-513	8	(Getachew et al., 2018)
Maíz	AFs	2019	Egipto	61	ND-44.9	34	(Abdallah et al., 2019)
Maíz	AFs	2020	Serbia	204	ND-205	94	(Kos et al., 2020)
Maíz	AFs	2018	Congo	19	2.2-330	100	(Udomkun et al., 2018)

Tabla 4. Continuación.

Cereales y Derivados							
Cereal y Derivados	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FC (%)	Ref.
Maíz	AFs	2020	Nigeria	40	2.7-41.7	100	(Onyedum et al., 2020)
Maíz	AFs	2020	Grecia	6	1.3-13	100	(Skendi et al., 2020)
Maíz	AFs	2018	Ghana	326	ND-341	38	(Agbetiameh et al., 2018)
Maíz	AFB1	2019	México	120	ND-22.17	85	(Wall-Martínez et al., 2019)
Maíz	AFB1	2018	Japón	246	ND-24	46	(Nomura et al., 2018)
Maíz	AFB1	2019	Nigeria	69	ND-27.9	52	(Liverpool-Tasie et al., 2019)
Maíz	AFB1	2020	Líbano	300	ND-7.38	48	(Joubrane et al., 2020)
Maíz	AFs	2020	Sudáfrica	24	ND-0.21	4	(Tebele et al., 2020)
Maíz	AFs	2020	Uganda	256	ND-3760	26	(Sserumaga et al., 2020)
Maíz	AFs	2020	Indonesia	12	ND-89.08	-	(Rahayu et al., 2020)
Maíz	AFs	2019	Togo	55	ND-256	38	(Hanvi et al., 2019)
Maíz	AFs	2020	Nigeria	20	2.7-41.7	100	(Onyedum et al., 2020)
Trigo	AFB1	2018	China	32	ND-0.12	22	(Y. Zhao et al., 2018)
Trigo	AFs	2018	Qatar	10	ND-14	40	(Hassan et al., 2018)
Trigo	AFB1	2018	China	14	1.5-4.9	100	(Ma et al., 2018)
Trigo	AFs	2020	Turquía	141	ND-0.44	2	(Turksoy & Kabak, 2020)

Tabla 4. Continuación.

Cereales y Derivados							
Cereal y Derivados	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FC (%)	Ref.
Trigo	AFB1	2020	Pakistán	195	ND-1.59	2	(Xia et al., 2020)
Trigo	AFs	2020	Grecia	18	ND-1.3	22	(Skendi et al., 2020)
Trigo	AFs	2020	Egipto	36	ND-49.79	100	(Hathout et al., 2020)
Trigo	AFs	2023	Túnez	90	ND-0.58	54.5	(Ben Hassouna et al., 2023)
Trigo	AFB1	2019	Canadá	83	ND	-	(Shi et al., 2019)
Trigo	AFs	2019	Somalia	58	ND	-	(Wielogorska et al., 2019)
Trigo	AFs	2020	Sudáfrica	3	ND	0	(Tebele et al., 2020)
Cebada	AFs	2018	Qatar	4	ND-9	75	(Hassan et al., 2018)
Cebada	AFB1	2019	Canadá	72	20	1.3	(Shi et al., 2019)
Cebada	AFB1	2018	China	6	ND-2.8	83	(Ma et al., 2018)
Cebada	AFs	2020	Grecia	6	ND-4	67	(Skendi et al., 2020)
Sorgo	AFB1	2018	Túnez	64	ND-31.7	59.4	(Lahouar et al., 2018)
Sorgo	AFs	2018	Sub-Sáhara	1533	ND-359	13	(Ssepuuya et al., 2018)
Sorgo	AFs	2019	Somalia	40	ND-105	42.5	(Wielogorska et al., 2019)
Sorgo	AFs	2018	Congo	23	2.5-490	100	(Udomkun et al., 2018)
Sorgo	AFs	2020	Nigeria	40	4.8-42.6	100	(Onyedum et al., 2020)

Tabla 4. Continuación.

Cereales y Derivados							
Cereal y Derivados	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FC (%)	Ref.
Sorgo	AFs	2020	Sudáfrica	8	ND	0	(Tebele et al., 2020)
Sorgo	AFB1	2019	Togo	12	ND-16	25	(Hanvi et al., 2019)
Avena	AFs	2019	Grecia	14	ND-2.2	71.4	(Skendi et al., 2020)
Avena	AFs	2018	Qatar	6	ND	0	(Hassan et al., 2018)
Bebida de avena	AFs	2022	España	17	ND-0.1	-	(Juan et al., 2022)
Bebida de avena	AFs	2024	España	16	ND	-	(Rodríguez-Cañás et al., 2024)
Centeno	AFs	2020	Grecia	4	ND-7.4	50	(Skendi et al., 2020)
Mijo	AFs	2020	Nigeria	40	4.8-45.6	100	(Onyedum et al., 2020)
Mijo	AFs	2018	Qatar	7	4-23	100	(Hassan et al., 2018)
Semillas de amapola	AFs	2018	Pakistán	13	ND-14.3	38	(Iqbal et al., 2018)
Semillas de sésamo	AFB1	2020	Vietnam	129	ND-30	9	(Do et al., 2020)
Fórmulas infantiles	B1 y B2	2024	Brasil	60	ND-3.5	5	(Ponce Giomo et al., 2024)

Tabla 4. Continuación.

Semillas Oleaginosas / Pseudocereales y derivados							
Tipo de Semilla Oleaginosa	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FC (%)	Ref.
Derivados de Soja	AFB1	2018	China	31	ND-6.9	94	(Ma et al., 2018)
Derivados de Soja	AFB1	2018	Japón	126	ND-6.7	30	(Nomura et al., 2018)
Soja	AFs	2018	Qatar	6	5-150	100	(Hassan et al., 2018)
Soja	AFs	2018	Ruanda	300	ND-11.2	3	(Niyibituronsa et al., 2018)
Soja	AFs	2018	Congo	11	2.3-4.2	100	(Udomkun et al., 2018)
Pasta de soja Meju	AFs	2019	Corea del Sur	145	ND-48.3	15	(Jeong et al., 2019)
Frijoles	AFs	2021	Nigeria	40	ND-6.92	40	(Suleiman et al., 2021)
Frijoles	AFs	2018	Congo	31	1.9-6.6	100	(Udomkun et al., 2018)
Bebida de soja	AFs	2022	España	18	ND	-	(Juan et al., 2022)
Bebida de soja	AFB1	2022	Irán	8	0.0016-0.0039	100	(Rezaeefar et al., 2022)
Bebida de soja	AFs	2024	España	9	ND-0.05	11	(Rodríguez-Cañás et al., 2024)
Cacahuetes	AFs	2019	Turquía	102	ND-2177.2	84	(Lavkor et al., 2019)
Cacahuetes	AFs	2021	Uganda	179	ND-1327	98	(Sserumaga et al., 2021)
Cacahuetes	AFs	2019	Brasil	22	ND-130.91	64	(Kujbida et al., 2019)
Cacahuetes	AFs	2018	Pakistán	25	ND-13.4	60	(Iqbal et al., 2018)
Cacahuetes	AFs	2018	Congo	16	2.2-29.3	100	(Udomkun et al., 2018)

Tabla 4. Continuación.

Semillas Oleaginosas / Pseudocereales y derivados							
Tipo de Semilla Oleaginosa	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango (µg/kg)	FC (%)	Ref.
Cacahuetes	AFs	2018	Ghana	183	ND-3868	37	(Agbetiameh et al., 2018)
Cacahuetes	AFB1	2018	Tailandia	30	ND-33.76	40	(Choochuay et al., 2018)
Cacahuetes	AFs	2020	Haití	8	ND-70.2	25	(Aristil et al., 2020)
Cacahuetes	AFB1	2020	Vietnam	144	ND-362	24	(Do et al., 2020)
Frutos Secos y derivados							
Tipo de Fruto Seco	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango (µg/kg)	FC (%)	Ref.
Anacardos	AFs	2019	Brasil	12	ND-4.16	33.3	(Kujbida et al., 2019)
Nueces	AFs	2018	China	35	ND-2.24	40	(Y. Wang et al., 2018)
Castañas	AFs	2018	China	33	ND-40.71	6	(Y. Wang et al., 2018)
Avellanas	AFs	2018	China	20	ND-2.1	5	(Y. Wang et al., 2018)
Piñones	AFs	2018	China	-	ND	-	(Y. Wang et al., 2018)
Almendras	AFs	2018	China	25	ND-2.16	32	(Y. Wang et al., 2018)
Pistachos	AFs	2018	Pakistán	31	ND-20.7	42	(Iqbal et al., 2018)
Anacardos	AFs	2018	Pakistán	30	ND-11.3	50	(Iqbal et al., 2018)

Tabla 4. Continuación.

Frutos Secos y derivados							
Tipo de Fruto Seco	Tipo de AF	Año del estudio	País	Nº Total muestras	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FC (%)	Ref.
Almendras	AFs	2018	Pakistán	29	ND-15.3	45	(Iqbal et al., 2018)
Almendras	AFs	2019	Turquía	80	ND-0.51	15	(Kanik & Kabak, 2019)
Bebida de almendra	AFs	2022	España	11	ND-0.7	-	(Juan et al., 2022)
Bebida de almendra	AFs	2024	España	7	ND-0.03	28	(Rodríguez-Cañás et al., 2024)

***ND**: No Detectado (este valor ha sido aplicado como límite inferior de concentración en los estudios en los que una o más muestras han resultado negativas para la presencia de aflatoxinas). **FC**: Frecuencia de contaminación en las muestras totales (%). El término AFs incluye la agrupación de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

La elevada prevalencia de aflatoxinas en cereales ha demostrado ser independiente del clima, al contrario que en otros alimentos. Se piensa que los cereales son especialmente susceptibles a las aflatoxinas por su elevado contenido en carbohidratos, al ser nutrientes fácilmente movilizables en términos metabólicos y, por tanto, capaces de proporcionar glucosa (fuente energética) y carbono (materia para la biosíntesis molecular orgánica) de forma rápida a los hongos aflatoxigénicos, favoreciendo así su crecimiento. De forma más específica, se ha demostrado que la ribosa, la glucosa, la xilosa, la sacarosa y el glicerol son los sustratos más efectivos para la síntesis de aflatoxinas, de acuerdo con Ahmad et al., 2013.

Sin embargo, la elevada prevalencia de aflatoxinas en semillas oleaginosas y en frutos secos se encuentra estrechamente relacionada con el alto contenido lipídico de estos alimentos, puesto que la biosíntesis de aflatoxinas es metabólicamente dependiente de la disponibilidad de lípidos presentes en el nicho ecológico, lo que explicaría la particular susceptibilidad de estos alimentos a aflatoxinas (Ahmad et al., 2013). Sin embargo, en el caso de las frutas desecadas, la combinación nutricional que supone su alto contenido en azúcares y en lípidos podría explicar la importante presencia de las aflatoxinas en este tipo de alimentos durante los últimos años, como se ha visto en las alertas registradas por la RASSF (**Figura 17**).

Estos factores nutricionales, en combinación con otros factores ambientales (temperatura, humedad, radiación solar, etc.), químicos (presencia de oxígeno, acidez, pesticidas, etc.), biológicos (cepa fúngica, tipo de planta, etc.) y de procesado (condiciones inadecuadas de tratamiento y almacenaje del producto), ya descritos anteriormente, permiten explicar la elevada prevalencia aflatoxigénica en cereales, en semillas oleaginosas y en frutos secos (Khaneghah et al., 2018). Sin embargo, el conocimiento sobre las causas que promueven la síntesis aflatoxigénica sobre estos alimentos vegetales clave para la dieta global es aún muy limitado, por lo que es necesario realizar nuevos estudios que profundicen el entendimiento del ciclo Hongo-Alimento -Aflatoxinas.

10. Estrategias de prevención y detoxificación de micotoxinas en cultivos y alimentos.

La presencia alimentaria de micotoxinas en general, y de aflatoxinas en particular, es objeto de preocupación tanto para la industria alimentaria como para los organismos reguladores. La elevada carcinogenicidad y prevalencia alimentaria de las aflatoxinas representan un riesgo para la salud humana y animal, por lo que su prevención y detoxificación en la cadena alimentaria constituye una prioridad para la industria agroalimentaria y para los organismos reguladores.

10.1. Prevención.

Las estrategias de prevención se orientan fundamentalmente en evitar, en la medida de lo posible, tanto el crecimiento de los hongos aflatoxigénicos como la producción de aflatoxinas por estos en los cultivos y en los alimentos durante su procesado y distribución. Estas estrategias abarcan desde prácticas agrícolas sostenibles y tecnologías de producción avanzadas, hasta medidas de control de calidad y seguridad alimentaria en las etapas de procesado y distribución.

En el ámbito pre-cosecha, las prácticas agrícolas sostenibles desempeñan un papel crucial en la prevención de la contaminación por aflatoxinas. La implementación de buenas prácticas agrícolas (BPA), como la siembra y cosecha en época adecuada, el uso de variedades de cultivos resistentes al parasitismo fúngico, la rotación de cultivos, la gestión integrada de plagas y enfermedades y la mejora de la infraestructura de riego y drenaje, son solo algunos de los factores que pueden ayudar a reducir el riesgo de proliferación fúngica y de síntesis aflatoxigénica en los cultivos. Respecto al uso de pesticidas y fungicidas para reducir la presencia de hongos micotoxigénicos, cabe destacar que, aunque a priori estas sustancias pueden eliminar parcialmente estos hongos, diversos estudios han demostrado que su aplicación indiscriminada y su falta de selectividad pueden ser contraproducentes. Los pesticidas eliminan una amplia variedad de microorganismos presentes en el suelo que son potenciales competidores de los hongos micotoxigénicos (limitando su capacidad de colonización de suelo y cultivo), lo que genera un desequilibrio en el ecosistema que favorece la colonización del nicho ecológico por parte de los hongos micotoxigénicos. Además, también se ha demostrado que la aplicación de pesticidas y fungicidas en concentraciones sub-letales para el hongo

micotoxigénico y que, por tanto, no llegan a eliminarlo por completo, provocan a su vez una respuesta al estrés por parte del hongo que habitualmente incluye una estimulación adicional de la síntesis de micotoxinas. Otras estrategias de control más novedosas como la implementación de microorganismos específicos (hongos, bacterias o levaduras) e incluso de moléculas orgánicas (ácidos orgánicos, anticuerpos, enzimas o extractos de plantas) para limitar la proliferación de hongos micotoxigénicos y para inhibir la biosíntesis micotoxigénica son prometedoras a largo plazo, pero aún no están totalmente desarrolladas (Ren et al., 2020).

En el ámbito post-cosecha, la clasificación y el descarte de las materias primas infectadas a simple vista con hongos, la adopción de medidas de almacenamiento (temperatura, humedad, e higiene de las instalaciones) y una manipulación adecuada son factores esenciales para prevenir la proliferación de hongos micotoxigénicos y la consecuente contaminación de los alimentos y piensos con micotoxinas. Para lograr estos fines es fundamental la aplicación del análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC), consistente en un conjunto de medidas básicas de prevención que han demostrado una probada eficacia y que incluyen la implementación de sistemas de almacenamiento herméticos y controlados, la aplicación de prácticas de higiene y limpieza rigurosas y la monitorización regular de la calidad y seguridad de los productos almacenados (Jallow et al., 2021).

10.2. Detoxificación.

Las estrategias de detoxificación consisten en la reducción del contenido de las micotoxinas que ya están presentes en los alimentos contaminados hasta niveles aceptables para la salud humana o, al menos, hasta niveles inferiores a los establecidos por la legislación vigente. Estas estrategias suponen la última línea de defensa entre el consumidor y las micotoxinas, pero deben de cumplir una serie de requisitos para considerarse mínimamente eficientes, seguros y aplicables, de acuerdo con la FAO:

- ✓ Degradar las aflatoxinas en el mayor grado posible hacia formas no tóxicas o de menor toxicidad, así como eliminar los hongos y esporas presentes para evitar la síntesis futura de más aflatoxinas.
- ✓ No generar especies o sustancias secundarias adicionales que puedan ser tóxicas, carcinogénicas o nocivas.

- ✓ No alterar las propiedades nutricionales y organolépticas originales del alimento tras la aplicación del tratamiento.
- ✓ Tener una aplicación que sea viable económica y que permita su escalado.
- ✓ Evitar, en la medida de lo posible, que el tratamiento propicie la modificación estructural de la aflatoxina original hacia formas enmascaradas que puedan pasar desapercibidas durante los controles de seguridad alimentaria.

En los últimos años se han desarrollado estrategias de detoxificación que incluyen una variedad de tecnologías que integran diferentes metodologías de tratamiento (físicas, químicas y biológicas). Con ellas se pretende reducir, tanto como sea posible, la presencia de aflatoxinas en alimentos y piensos contaminados. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas asociadas a su eficacia para eliminar aflatoxinas. También se ha probado la efectividad de diversos métodos de cocinado para reducir el contenido de aflatoxinas en alimentos.

10.2.1. Métodos físicos

El empleo de las técnicas físicas de detoxificación es muy común para reducir el contenido en aflatoxinas dada su seguridad, su bajo coste, su escalabilidad y su efectividad. Los métodos físicos de detoxificación se dividen en diferentes tipos de metodologías: técnicas de limpieza, tratamientos térmicos, irradiación y adsorción:

- ✓ Las *técnicas de limpieza* más frecuentes y efectivas para la eliminación de aflatoxinas son el lavado, la separación y el descascarillado, entre otras.

Las técnicas de lavado se consideran como la principal metodología de limpieza, y se aplican a cualquier alimento sólido que sea capaz de mantener sus características y su integridad tras el remojo y posterior secado. Se suelen aplicar para eliminar la suciedad de granos, frutos secos y otros alimentos recolectados, con independencia de la presencia de aflatoxinas. Su capacidad detoxificante se basa en la extracción de las aflatoxinas desde el alimento hacia las aguas de lavado, lo cual transcurre con diferente efectividad según el tipo de interacciones previas que las toxinas hayan establecido con la matriz alimentaria. Su limitación está relacionada con la baja solubilidad acuosa de las aflatoxinas, motivo por el cual el lavado se suele combinar con calor o con sustancias en disolución que aumenten la afinidad por las aflatoxinas.

Además, las aflatoxinas presentes en las partes más internas del grano son difícilmente movilizables por el lavado (Karlovsky et al., 2016).

Los métodos físicos de limpieza mediante separación, cribado y decantación consisten en la separación de los productos en mal estado o dañados, entre los cuales se encuentran aquellos contaminados por hongos, disminuyendo así la presencia aflatoxigénica y evitando la contaminación cruzada adicional del resto de productos. Estas técnicas son aplicables fundamentalmente sobre productos agrícolas constituidos por unidades separables. La identificación y separación de los productos contaminados ha pasado de realizarse manualmente al empleo de irradiación con luz ultravioleta e infrarroja, capaces de detectar patrones de absorción específicos en los productos contaminados. La decantación de los granos mediante su inmersión en una fase acuosa también es fácilmente aplicable en base a las diferencias de densidad de los granos en presencia y en ausencia de hongos (Cheng et al., 2019).

Finalmente, los métodos físicos de limpieza mediante el descascarillado y la molienda son aplicables solamente a determinados cereales o semillas. El descascarillado permite la separación de algunas de las partes más contaminadas del grano, lo que reduce el contenido neto de aflatoxinas en el producto. Sin embargo, se debe prestar especial atención al uso que se le dará a las partes separadas, ya que su empleo para la alimentación del ganado puede provocar la reincorporación de las aflatoxinas en la cadena alimentaria. Por otro lado, los procesos de molienda posibilitan la homogeneización de la contaminación remanente, reduciendo así la concentración en peso seco de las aflatoxinas (Park, 2002).

- ✓ Los tratamiento térmicos constituyen uno de los métodos físicos más extendidos para el control de aflatoxinas, aunque estos tratamientos se limitan a aquellos alimentos capaces de resistir el tratamiento térmico sin que se vea alterada ni su composición ni sus propiedades, como es el caso de los cereales, semillas, frutos secos, alimentos desecados o determinados líquidos, entre otros (Rushing & Selim, 2019). La elevada estabilidad térmica de las aflatoxinas supone el principal factor limitante de este tipo de metodología. Sin embargo, a pesar de que la temperatura de descomposición de las aflatoxinas se encuentra entre los 237-306 °C, se ha demostrado que se pueden degradar hasta en un 79% en un intervalo de temperaturas de 150-200 °C. La termoestabilidad inicial de las micotoxinas se ve sensiblemente reducida por factores como la presencia de agua, el tiempo de aplicación del tratamiento o la composición

nutricional específica del alimento tratado (Zheng et al., 2015). Por un lado, la presencia de agua promueve la hidrólisis de la molécula, mientras que los componentes de la matriz alimentaria pueden disminuir la estabilidad química de las toxinas. Por tanto, la aplicación de altas temperaturas en combinación con estos factores durante el tiempo adecuado aumenta significativamente la reactividad de la toxina, facilitando así su alteración estructural y, por tanto, su degradación (Kumar et al., 2017). Si bien es cierto que los tratamientos térmicos en presencia de agua son más efectivos, algunos tratamientos térmicos en seco, como el tostado o el horneado, también logran una detoxificación relevante de aflatoxinas en alimentos específicos. Además, la combinación del calor con otros tratamientos como el uso de disoluciones alcalinas (nixtamalización), la fritura en presencia de aceites o las altas presiones (extrusión) aumentan la eficacia del tratamiento térmico (Karlovsky et al., 2016). No obstante, el éxito de cada tratamiento térmico debe ser comprobado para el alimento específico al que le será aplicado y en las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y duración, lo que dificulta la generalización de su uso.

- ✓ La irradiación del alimento es una tecnología detoxificante de aflatoxinas ampliamente aceptada dada su eficacia, seguridad y adecuación a diferentes formatos de alimento. Sin embargo, su eficacia está condicionada por el nivel inicial de contaminación, la dosis de irradiación y el estado físico y composición de la matriz, resultando ser menos efectiva en sustratos de alto contenido graso (Calado et al., 2014). Las radiaciones con potencial detoxificante pueden ser no ionizantes (ultravioleta, microondas, solar, etc.) e ionizantes (rayos gamma), siendo estas últimas las más efectivas con una reducción promedio del 65% del contenido de aflatoxinas (Di Stefano et al., 2014a y Di Stefano et al., 2014b). Sin embargo, la aplicación de radiaciones puede alterar la composición nutricional del alimento, y su uso está legalmente restringido a alimentos específicos. Otras tecnologías nuevas como el uso de plasma frío mediante un gas portador (oxígeno, nitrógeno, helio, argón) también han demostrado su eficacia sobre diversos tipos de alimentos, pero aún se desconoce si su aplicación pudiera generar especies tóxicas (Schlüter et al., 2013).
- ✓ El empleo de sustancias adsorbentes es otra opción para disminuir la concentración de micotoxinas. Algunos de estos compuestos con potencial adsorbente sobre las aflatoxinas son, por ejemplo, las arcillas de montmorilonita, bentonita, SB-E o NovaSil. Su suplementación con determinados alimentos podría reducir la

bioaccesibilidad y absorción intestinal de las aflatoxinas (Berillo & Ermukhambetova, 2024). Sin embargo, la seguridad alimentaria de estos compuestos y su efectividad aún están en fase de estudio y, una vez confirmada su inocuidad, su aplicación quedaría condicionada a que no alteren las propiedades del alimento suplementado.

10.2.2. Métodos químicos

Los tratamientos químicos empleados incluyen: sustancias químicas oxidantes, reductores, ácidos y bases. Entre ellos, el tratamiento de alimentos con sales de amonio ha proporcionado elevados valores de degradación, dada la facilidad de esta sustancia para producir la apertura del anillo lactónico de las aflatoxinas. Sin embargo, su eficacia depende en gran medida del tipo de alimento, la temperatura, la humedad o la presión aplicadas durante el tratamiento (Moerck et al., 1980). Otras sustancias alcalinas con potencial detoxificante confirmado son los hidróxidos de sodio y de calcio, especialmente este último cuando se aplica en disolución acuosa en presencia de calor durante 8-16 h sobre cereales, lo que se conoce como nixtamalización. Tras ello, la disolución se decanta y el cereal se lava (J. A. Méndez-Albores et al., 2004). Por otro lado, algunos agentes químicos oxidantes como el ozono y el peróxido de hidrógeno también son capaces de inactivar las aflatoxinas presentes en diferentes alimentos (leche, higos, maíz o cacahuets, entre otros) mediante su reacción con la insaturación en posición C8-C9 (Proctor et al., 2004). También se ha demostrado la capacidad detoxificante del gas cloro. Por último, la presencia de ciertos aditivos químicos de uso alimentario como el bisulfito de sodio, el hidrosulfito de sodio o el metabisulfito de sodio también tienen potencial para degradar las aflatoxinas hacia productos no tóxicos.

A pesar de la eficacia demostrada de los tratamientos químicos, el uso de muchos de estos agentes no está permitido por su toxicidad para la salud, mientras que otros sí lo están, pero no son del todo fiables por los residuos que pueden dejar en el alimento tras su aplicación, los cuáles también podrían resultar tóxicos. Además, la aplicación de estos agentes también puede alterar significativamente la composición nutricional y las propiedades organolépticas de la mayoría de los alimentos. Por tanto, solamente serán aplicables aquellos agentes químicos permitidos por ley sobre alimentos específicos, siempre que no alteren significativamente las propiedades del alimento tratado.

10.2.3. Métodos biológicos

Este enfoque se fundamenta en el uso directo de microorganismos o de sustancias derivadas de éstos y de otros organismos para la detoxificación de aflatoxinas presentes en alimentos (Tian & Chun, 2017). Por un lado, se ha demostrado la eficacia de ciertas bacterias pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Bacillus* o *Actinomycetales* y de cepas fúngicas atoxigénicas, que son capaces de incorporar y metabolizar las aflatoxinas hacia formas no tóxicas o de menor toxicidad con altas tasas de conversión, mientras que determinadas levaduras y bacterias del género *Lactobacillus* son capaces de adsorber las aflatoxinas en sus paredes celulares. La aplicación de enzimas específicas con capacidad para degradar las aflatoxinas de forma específica, así como otras sustancias (ácido cítrico, extractos vegetales) también ha demostrado ser eficaz (Ji et al., 2016).

Sin embargo, a pesar de sus ventajas, la aplicabilidad de estos métodos biológicos para la detoxificación de aflatoxinas está afectada por factores como el pH, la temperatura o el inóculo. Además, aún se desconoce la naturaleza de los metabolitos generados tras la detoxificación de las aflatoxinas y la presencia de estos microorganismos y/o compuestos también puede comprometer las propiedades organolépticas del alimento, especialmente en la presencia de microorganismos con altas tasas de proliferación a expensas de la composición nutricional de éste (Loi et al., 2020).

10.2.4. Prácticas culinarias

El cocinado puede reducir la exposición a las aflatoxinas (Dhanshetty et al., 2021). Los principales tratamientos aplicados en el cocinado son de tipo térmico, tanto en presencia de agua (cocción o vaporizado) como en su ausencia (horneado, microondas o fritura), alcanzando un rango medio de temperaturas entre los 100-200 °C. La limitada capacidad detoxificante del tratamiento térmico puede aumentarse considerablemente al combinar estos tratamientos con otros como los lavados consecutivos con el agua que se desecha o el cocinado a alta presiones (Je & Kim, 2006). Otro factor que posiblemente afecta a la integridad estructural de las aflatoxinas es la adición de ingredientes y condimentos culinarios. Las interacciones establecidas entre las aflatoxinas y los ingredientes empleados en el cocinado pueden favorecer la adsorción de las aflatoxinas, o bien estimular su degradación o su conjugación a biomoléculas (biotransformación). En cualquier caso, se reduciría su bioaccesibilidad y su absorción intestinal y facilitaría su

excreción, siempre que las uniones sean lo suficientemente estables como para resistir las condiciones fisicoquímicas de la digestión (Jalili, 2015).

Algunos estudios señalan que la presencia de diferentes sustancias orgánicas, como determinadas proteínas, oligosacáridos o polisacáridos, pueden tener cierto potencial adsorbente sobre las aflatoxinas. Por ejemplo, diferentes autores han demostrado la capacidad adsorbente de los beta-D-glucanos (celulosa, hemicelulosa, lignina), que son capaces de formar enlaces de hidrógeno y de van der Waals con aflatoxinas capaces de resistir las condiciones digestivas (Jouany, 2007). Otros han demostrado que la suplementación proteica puede reducir los efectos tóxicos de las aflatoxinas, aunque se desconocen las interacciones específicas y los mecanismos desencadenantes del efecto detoxificante (Mézes et al., 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que la condimentación con determinados ácidos débiles y sales de uso culinario habitual puede reducir significativamente la estabilidad de las aflatoxinas en medio acuoso, el cual por sí mismo tiene efecto desestabilizante. Por ejemplo, Jubeen et al., 2020 demostraron que el ácido cítrico (utilizado como condimento y conservante), el ácido láctico y el propiónico (empleados como conservantes) en combinación con agua pueden degradar la AFB1 presente en diferentes tipos de frutos secos. Otros autores como Méndez-Albores et al., 2005, Safara et al., 2010 y Lee et al., 2015 lograron la detoxificación de aflatoxinas B y G en maíz, arroz y semillas de soja contaminados, respectivamente, en presencia de humedad con eficacias superiores al 90%, mientras que la aplicación de altas temperaturas aceleró la capacidad detoxificante de los ácidos. Además, Rushing & Selim, 2016 demostraron la capacidad detoxificante del ácido acético (HAc) sobre aflatoxinas puras.

La gran variedad de combinaciones culinarias disponibles y de condiciones fisicoquímicas aplicables durante el cocinado, añadidas a las características nutricionales del propio alimento contaminado, impiden abarcar los efectos del cocinado doméstico sobre la detoxificación aflatoxigénica desde una perspectiva general. Sin embargo, el estudio de la aplicación de aditivos alimentarios específicos de alto potencial detoxificante sobre la estabilidad de las aflatoxinas y las posibles interacciones aflatoxina-aditivo resultantes tras la aplicación de técnicas preestablecidas de cocinado estándar (cocción, horneado, fritura, etc.) supondría un enfoque más factible para su estudio (Karlovsky et al., 2016).

11. Legislación vigente con relación a la presencia de micotoxinas en alimentos.

El conocimiento adquirido en las últimas décadas sobre los efectos nocivos que provocan las micotoxinas sobre la salud de personas y animales ha impulsado a una gran variedad de países a legislar diferentes aspectos de la exposición a estas toxinas mediante el desarrollo de reglamentos para proteger la salud humana, sin perjuicio de los intereses económicos de los productores ni de las actividades comerciales. La primera legislación surgió en la década de 1960 para el control de la exposición a aflatoxinas. Tras ello, se fueron incorporando otras micotoxinas como la aflatoxina M1, el deoxinivalenol, la zearalenona, las fumonisinas B1, B2 y B3, la ocratoxina A, la Patulina, las toxinas T-2 y HT-2, e incluso la esterigmatocistina y los alcaloides ergóticos.

Sin embargo, el mayor impulso en el desarrollo de legislaciones para limitar la exposición a micotoxinas se estableció con la creación del programa conjunto entre la OMS y la FAO sobre normas de seguridad alimentaria. Este organismo internacional mixto ha desarrollado una serie de evaluaciones de riesgos y recomendaciones a lo largo de las últimas décadas respecto a los niveles de micotoxinas tolerables en alimentos para consumo humano y animal, actualizando sus directrices conforme se realizaban nuevos hallazgos científicos concernientes a la toxicidad y la exposición a micotoxinas. El primer estudio realizado por este organismo se llevó a cabo en 1997 y supuso un punto de inflexión en el impulso de nuevas legislaciones, así como la mejora de las existentes (FAO, 2004). Si bien es cierto que este programa conjunto OMS/FAO no establece límites legales obligatorios de forma directa, en su lugar proporciona una serie de recomendaciones en las que se inspiran las diferentes legislaciones específicas de carácter obligatorio establecidas por cada país (FAO, 2004).

11.1. Legislación internacional de carácter no obligatorio: el Codex Alimentarius.

La versión del Codex Alimentarius 193-1995 (CXS 193-1995) fue la primera que estableció algunos niveles máximos para diferentes micotoxinas en alimentos específicos, entre otros contaminantes alimentarios que implican un riesgo apreciable para la salud. Desde entonces, estos niveles máximos micotoxigénicos han sido actualizados y

ampliados a otras micotoxinas en una mayor variedad de alimentos. El nivel máximo establecido por el Codex para una micotoxina presente en un alimento de consumo humano o pienso animal se considera como la concentración máxima recomendada por la Comisión del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos para permitir el consumo seguro de dicho alimento (CCCF, 2023).

La versión del CXS 193-1995 y posteriores actualizaciones establece niveles máximos para la suma de aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) en frutos secos (rango entre 10-15 µg/kg para almendras, nueces de Brasil, avellanas, cacahuete y pistacho sin cáscara), en frutas desecadas (10 µg/kg en higos secos), en especias (20 µg/kg en chile y nuez moscada), en cereales y harinas derivadas (rango entre 5-20 µg/kg para maíz, arroz, trigo, sorgo y sus harinas) así como en productos derivados de cereales para lactantes y niños pequeños (rango entre 5-10 µg/kg según si el producto se destina a un programa de ayuda alimentaria). Los rangos descritos varían en función de si el alimento se consume en crudo (límite bajo) o si es sometido a algún tipo de procesado capaz de reducir los niveles de la micotoxina (límite alto) (CCCF, 2023). Sin embargo, el Codex no establece niveles máximos permitidos para la AFB1 individual, lo que algunos expertos consideran un enfoque inadecuado si se tiene en cuenta que la AFB1 es mucho más tóxica y frecuente en alimentos que el resto de las aflatoxinas. En cambio, sí establece un nivel máximo para la AFM1 en leche de origen animal a 0.5 µg/kg.

El Codex también establece los niveles máximos para las siguientes micotoxinas:

- ✓ DON en cereales como trigo, maíz y cebada (2000 µg/kg para su procesado posterior), en harinas y sémolas de trigo, maíz y cebada (1000 µg/kg) y en alimentos a base de cereales para lactantes y niños pequeños (200 µg/kg).
- ✓ Fumonisin B1+B2 en maíz crudo (4000 µg/kg) y en harinas y sémolas de maíz (2000 µg/kg).
- ✓ OTA en trigo, cebada y centeno (5 µg/kg) y en especias como chile, pimentón dulce y nuez moscada (20 µg/kg).
- ✓ PAT en zumos y jugos de manzana (50 µg/kg para consumo directo e ingrediente).

Las directrices y recomendaciones establecidas por el Codex y sus posteriores actualizaciones han establecido los cimientos para el desarrollo de la legislación referente a micotoxinas en los distintos países. Aunque en la práctica es difícil establecer el número exacto de países que cuentan con algún tipo de legislación propia para establecer límites

de exposición frente a micotoxinas en alimentos, se estima que en la actualidad al menos 100-120 países han implementado una legislación propia, mientras que otros no tienen una legislación propia a nivel estatal, pero siguen las directrices del Codex Alimentarius (dado su carácter referencial sobre las legislación nacional e internacional). Así mismo, algunos países han normalizado sus respectivas legislaciones individuales en una legislación internacional común aplicable a todos los países integrantes, como son los casos de los países que integran la Unión Europea o el MERCOSUR, así como alianzas entre países específicos como Australia y Nueva Zelanda. Así mismo, la legislación establecida en cuanto a límites máximos tolerables de micotoxinas y según qué alimentos estén contemplados o no en dicha legislación es altamente variable entre países, siendo las establecidas por la UE, Estados Unidos (EE.UU), China, MERCOSUR, Canadá, Japón o Australia-Nueva Zelanda algunas de las más restrictivas a nivel mundial (Balan et al., 2024):

11.2. Legislación obligatoria aplicable en la Unión Europea.

La Unión Europea ha establecido una legislación estricta, completa y rigurosa con respecto al control de diferentes micotoxinas, con especificaciones sobre una amplia variedad de alimentos y teniendo también en cuenta las circunstancias de procesamiento previo del alimento con respecto al consumo directo del alimento. Además, su legislación comunitaria es de obligado cumplimiento en los 27 países de la UE. A diferencia de otras legislaciones, la europea desarrolla por separado los Reglamentos que regulan los límites máximos de micotoxinas en alimentos para consumo humano y para piensos de consumo animal.

El primer Reglamento Europeo armonizado que estableció límites máximos para las micotoxinas en alimentos de consumo humano fue el Reglamento 1525/98, que fijó los límites máximos para las aflatoxinas (B1 individual y la suma de B1+B2+G1+G2) en cereales y productos derivados. Esta legislación ya contemplaba la obligación de realizar un etiquetado adecuado que contenga información sobre el destino del producto, en el caso de alimentos que excedan los límites máximos establecidos y vayan a emplearse con fines que no sean el consumo directo. También incluía las prohibiciones de emplear tratamientos químicos para la detoxificación de micotoxinas y de mezclar alimentos que exceden los límites con otros que los cumplan para reducir la concentración

micotoxigénica de los primeros (Commission Regulation (EC) No 1525/98). La aplicación de este Reglamento vino acompañada de la publicación de la Directiva 98/53/CE que establecía los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de estas micotoxinas en alimentos (Commission Directive 98/53/EC).

Esta legislación inicial fue incluida en la publicación del posterior Reglamento 466/2001, ampliándose el establecimiento de límites máximos a la aflatoxina M1 (aplicable a leches y preparados con fines dietéticos e infantiles), la ocratoxina A (cereales y derivados, café, vinos, zumos y uvas pasas y preparados con fines dietéticos y para lactantes), la patulina (frutas, zumos, bebidas alcohólicas y derivadas a base de frutas), el deoxinivalenol (cereales y derivados que incluyen preparados infantiles) y a la zearalenona (cereales y derivados que incluyen preparados infantiles). Además, este Reglamento también incorporó el compromiso de establecer límites futuros antes de 2007 para las fumonisinas y las toxinas T-2 y HT-2 en cereales y derivados (Commission Regulation (EC) No 466/2001). Por tanto, el Reglamento 466/2001 fue la piedra angular sobre la cual se ha desarrollado toda la legislación posterior sobre los límites de las micotoxinas. Dicho reglamento fue reemplazado por el Reglamento 1881/2006 al que se añadieron nuevas sustancias de naturaleza no micotoxigénica que era necesario regular, en concordancia con la actualización del Codex Alimentarius (Commission Regulation (EC) No 1881/2006). El Reglamento 1881/2006 también se complementó con la publicación del Reglamento 401/2006 (Commission Regulation (EC) No 401/2006), que actualizaba los métodos de muestreo y de análisis para el control de micotoxinas en alimentos (evolución de la Directiva 98/53/CE).

El Reglamento 1881/2006 ha estado vigente durante las últimas dos décadas, si bien ha sido objeto de diversas modificaciones que han ido surgiendo en forma de nuevos reglamentos adicionales que han actualizado algunos aspectos sin alterar su contenido global. La mayoría de los cambios han consistido en modificaciones o ampliaciones de los límites máximos de alguna micotoxina. Entre estas "enmiendas" destaca el Reglamento 2015/1940, que aclara la definición de "cereales no elaborados" en relación con el establecimiento de diferentes valores de límite máximo para una micotoxina en un mismo tipo de alimento (fundamentalmente para cereales y frutos secos). Un valor u otro se aplica según si el alimento está destinado al consumo directo (más restrictivo) o bien si va a ser sometido a algún proceso físico de selección y/o detoxificación de eficacia probada para la reducción del contenido de la micotoxina inicial previo a su consumo

(límite más permisivo, siempre que después de aplicar el tratamiento se cumpla con el nivel más restrictivo para autorizar su consumo) (Commission Regulation (EU) 2015/1940).

Sin embargo, la cantidad de modificaciones realizadas hicieron necesaria una agrupación física del Reglamento 1881/2006 con todos los reglamentos que contienen sus enmiendas y actualizaciones en un nuevo texto, lo que dio lugar a su sustitución por el Reglamento 2023/915. Hoy en día, se trata de la versión más actualizada en vigor y comprende todo lo referente al establecimiento de límites máximos de micotoxinas y de otras sustancias reguladas en la UE (Commission Regulation (EU) 2023/915). Además de incorporar todas las actualizaciones de los reglamentos anteriores, el Reglamento 2023/915 también contempla la aplicación de límites máximos adicionales a determinar por la autoridad sanitaria competente sobre alimentos desecados, diluidos, transformados y compuestos que no se hallen regulados de manera específica por este Reglamento. Además, también considera los límites máximos sobre aquellos alimentos que deriven de materias primas reguladas en los que dicha materia regulada se halle en una proporción inferior al 80%, previa exigencia al fabricante alimentario de aportar los factores específicos de dilución, concentración, transformación y la proporción de ingredientes (Artículo 3 del Reglamento).

En la actualidad, el Reglamento 2023/915 establece los siguientes límites específicos para la aflatoxina B1, la aflatoxina M1 y la suma de las aflatoxinas B1+B2+G1+G2 (**Tabla 5**):

Tabla 5. Límites máximos establecidos por el Reglamento Europeo (UE) 2023/915 para aflatoxinas (B1 individual, suma de B1+B2+G1+G2 y M1 individual) en diferentes alimentos (los destinados al consumo directo o como ingredientes y los que deberán ser sometidos a cualquier tratamiento previo de selección o detoxificación).

Aflatoxinas (µg/kg)			
Tipo de alimento	B1	B1+B2+G1+G2	M1
Frutas desecadas (Selección / Detoxificar)	5	10	-
Frutas desecadas (Consumo / Ingrediente)	2*	4*	-
Higos Secos	6*	10*	-
Cacahuets y semillas oleaginosas (Selección / Detoxificar)	8	15	-
Cacahuets y semillas oleaginosas (Consumo / Ingrediente)	2*	4*	-
Frutos de cáscara arbóreos (Selección / Detoxificar)	5	10	-
Frutos de cáscara arbóreos (Consumo / Ingrediente)	2*	4*	-
Almendra, pistacho y Hueso de albaricoque (Selección / Detoxificar)	12	15	-
Almendra, pistacho y Hueso de albaricoque (Consumo / Ingrediente)	8*	10*	-
Avellanas y nueces de Brasil (Selección / Detoxificar)	8	15	-
Avellanas y nueces de Brasil (Consumo / Ingrediente)	5*	10*	-
Cereales y sus derivados	2*	4*	-
Maíz y arroz (Selección / Detoxificar)	5	10	-
Espicias secas (<i>Capsicum</i> spp, pimienta, cúrcuma, mezclas)	5	10	-
Jengibre (seco)	5	10	-
Leche cruda / tratada y derivados lácteos	-	-	0.05
Derivados lácteos para lactantes /infantiles	-	-	0.025
Alimentos infantiles derivados de cereales	0.1	-	-
Alimentos especiales (Uso médico para lactantes/infantiles)	0.1	-	0.025

*El límite máximo también es aplicable a los productos derivados de la materia prima regulada constituidos en su totalidad o al menos en un 80% de su composición por la materia prima regulada.

La presencia de micotoxinas en productos de origen agrícola no solamente pone en riesgo directo a la salud humana, sino que también tiene efectos nocivos sobre la salud de los animales destinados al consumo humano. La intoxicación de estos animales por micotoxinas provoca la acumulación de la micotoxina original en los tejidos del animal y de otros metabolitos producidos por el animal a partir de la micotoxina original (como, por ejemplo, la formación de la aflatoxina M1 a partir de la aflatoxina B1). Además, también genera un perjuicio a nivel productivo y económico dado que las micotoxinas provocan alteraciones en el desarrollo y en la producción del animal. Por ello, la Comisión Europea ha establecido una serie de límites máximos obligatorios para esta aflatoxina B1 en las materias primas empleadas para la fabricación de los piensos a través de la Directiva 2002/32/CE (rango de 5-50 µg/kg), así como un límite de 1000 mg/kg para el hongo del cornezuelo de centeno. Esta normativa continúa vigente en la actualidad con una serie de modificaciones que establecen valores adicionales de carácter orientativo para la ocratoxina A (0.05-0.25 mg/kg), el deoxinivalenol (0.9-12 mg/kg), la zearalenona (0.1-3 mg/kg), las fumonisinas (10-60 mg/kg) y las toxinas T-2 y HT-2 (0.05 mg/kg) en piensos de diferente composición destinados a la alimentación de diferentes tipos de animales (AFHSE, 2015). Esta legislación también prohíbe mezclar piensos que excedan los límites de micotoxinas para diluir sus niveles, pero permite el uso de procesos químicos para reducir los niveles de micotoxinas en piensos animales (previamente reconocidos y autorizados por la legislación) (Directive 2002/32/EC).

En conclusión, si se compara la normativa actual de la UE con la del resto de países y con lo establecido en el Codex Alimentarius, se puede concluir, sin lugar a duda, que la normativa europea comunitaria actual es la más restrictiva en cuanto a los niveles máximos. Además, es la más extensa y detallada con respecto al número de micotoxinas incluidas, a la variedad de alimentos contemplados para cada micotoxina y a las condiciones especificadas de los alimentos legislados, con importantes distinciones entre alimentos listos para consumir ("no elaborados") y alimentos que van a someterse a procesos de elaboración posterior que reducirían el contenido inicial de micotoxinas.

12. Metodologías para el análisis de aflatoxinas en alimentos.

Considerando los elevados riesgos asociados a la exposición a aflatoxinas, así como su prevalencia en una amplia variedad de alimentos y la estricta regulación en torno

a su presencia alimentaria, el desarrollo de metodologías analíticas efectivas para su detección y cuantificación es la principal herramienta para ejercer una adecuada monitorización de estas micotoxinas y controlar su exposición humana y animal. Desde que se aplicó el primer método para el análisis de aflatoxinas en piensos en la década de 1960, se han desarrollado métodos más rápidos, exactos, precisos y de mayor sensibilidad analítica para su determinación en todos los alimentos susceptibles a la contaminación mediante el empleo de diferentes metodologías analíticas. Cualquier método eficaz para el análisis de aflatoxinas debe desarrollarse en base a las propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas (polaridad, solubilidad acuosa y orgánica, termoestabilidad, pKa, coeficiente de partición, etc.), así como a la composición nutricional del alimento analizado, a las condiciones de extracción y purificación óptimas y al tipo de instrumentación empleada para la detección y sus características analíticas (Zhang & Banerjee, 2020).

12.1. Preparación de la muestra.

Existe una amplia variedad de alimentos susceptibles a la contaminación por aflatoxinas. Sin embargo, estos alimentos presentan importantes diferencias según su composición nutricional (es decir, contenido acuoso, azúcares, grasas, proteínas, sales y aditivos) y estado físico (sólidos o líquidos de diferente consistencia o viscosidad). Además, las metodologías analíticas disponibles presentan una serie de limitaciones en relación con la sensibilidad alcanzada y con respecto a la complejidad y a los interferentes de matriz (Castells et al., 2008). Por tanto, la mayoría de los alimentos requieren una preparación previa al análisis con los siguientes objetivos:

- 1) Homogeneizar la distribución inicial que presentan frecuentemente las aflatoxinas en los alimentos contaminados (normalmente, distribuciones heterogéneas).
- 2) Favorecer la ruptura de las interacciones establecidas entre las aflatoxinas y la composición del alimento para la liberación de la micotoxina en su forma libre. En el caso de alimentos sólidos o semisólidos se requiere la extracción de las aflatoxinas desde la matriz sólida inicial hacia una solución líquida que pueda ser objeto de análisis mientras que, en el caso de los alimentos líquidos, aunque no es obligatorio, es altamente aconsejable.

3) Reducir el efecto matriz derivado de la composición del alimento para evitar interferencias sobre la determinación de las aflatoxinas mediante procesos de purificación (*clean-up*).

4) Preconcentrar el analito extraído para compensar las limitaciones de sensibilidad de la técnica analítica

12.1.1. Homogeneización de la muestra.

Al igual que otros analitos, las micotoxinas presentes en muestras complejas no se encuentran uniformemente distribuidas. Sin embargo, en el caso de las micotoxinas esta heterogeneidad puede ser aún mayor como consecuencia de la colonización irregular ejercida por los hongos micotoxigénicos a lo largo de la superficie y hacia las partes internas del alimento. La forma más habitual de homogeneizar la distribución de aflatoxinas en un alimento sólido es la molienda del alimento hasta asegurar un tamaño de partícula suficientemente pequeño. Para asegurar la uniformidad y la reducción del tamaño de partícula conviene tamizar el alimento una vez molido y finalmente removerlo para redistribuir las toxinas de manera homogénea. Este método es idóneo para alimentos sólidos altamente compactados y deshidratados, como la mayoría de los cereales (arroz, maíz, trigo, avena, etc.), frutos secos (cacahuete, pistacho), frutas deshidratadas (higos, albaricoques, dátiles, uvas...), especias (pimienta negra y pimentón), cacao, café, piensos e incluso ciertas hortalizas de bajo contenido acuoso como los chiles (Zhang & Banerjee, 2020).

Si el alimento posee un tamaño de partícula lo suficientemente pequeño se puede realizar directamente la extracción sin homogeneizarlo previamente. La homogeneización mediante molienda se desaconseja en el caso de alimentos sólidos con alto contenido graso, glucídico o gelatinosos, los cuales no se muelen adecuadamente ya que tienden a formar una "pasta" indeseada que dificulta la extracción posterior. Tampoco se aconseja en alimentos térmicamente susceptibles, ya que el calor generado durante la molienda podría alterar las propiedades originales del alimento, generar una consistencia pastosa que impida alcanzar el tamaño de partícula adecuado y la homogeneización de la contaminación e incluso promover interacciones indeseadas con las aflatoxinas (Spanjer et al., 2006).

Debido a las características de algunos alimentos, a veces es necesaria su mezcla con agua u otro disolvente orgánico antes de su trituración o molienda (Whitaker, 2006). Este método ha demostrado su eficacia sobre mantequillas, semillas oleaginosas e incluso cacahuets, pistachos, cacao y café, sobre los que la homogeneización húmeda ha resultado ser más eficiente que en seco (Spanjer et al., 2006). También se ha demostrado que la presencia de disolventes durante la homogeneización puede facilitar la extracción posterior de las aflatoxinas. Sin embargo, la elección del tipo de disolvente y la optimización de la relación muestra-disolvente es esencial para asegurar la efectividad del método en generar partículas suficientemente pequeñas, uniformes y para lograr una adecuada homogeneización de las aflatoxinas. Sin embargo, una mala elección del tipo de disolvente o de su proporción sobre un alimento no soluble o de excesiva higroscopicidad podría favorecer efectos indeseados como la generación de varias fases no miscibles o consistencias pastosas. Por último, la molienda del alimento previamente criogenizado con hielo seco o nitrógeno líquido favorece el proceso de disminución del tamaño de partícula de la muestra, la homogeneización del analito y la preservación de la muestra (Kujawski M, 2014).

Una vez realizada la homogenización, otro factor a determinar previo a la extracción de aflatoxinas es la cantidad o volumen de muestra para realizar el análisis. La cantidad de muestra seleccionada para el análisis estará condicionada por el límite de detección de la técnica seleccionada. Por un lado, el análisis de una muestra de gran tamaño (25-50 g) permite extraer una mayor proporción de analito y, por tanto, compensa la falta de sensibilidad de ciertas técnicas instrumentales analíticas tradicionalmente empleadas para el análisis de aflatoxinas, como la detección por fotodiodos (DAD), aunque también aumentaría la proporción de interferentes de la matriz alimentaria. Sin embargo, el auge de técnicas instrumentales analíticas de mayor sensibilidad como la detección por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite tomar cantidades menores del alimento homogeneizado (0.5-5 g), lo que a su vez disminuye la proporción de los interferentes de matriz, reduce el uso de reactivos y facilita la manipulación de muestras durante la extracción y purificación de los analitos (Zhang & Banerjee, 2020).

12.1.2. Extracción y purificación de las aflatoxinas.

Los procesos de extracción y purificación constituyen el eje central de la preparación de la muestra para lograr una adecuada detección analítica de las aflatoxinas. El método de extracción seleccionado debe separar el analito del propio alimento manteniendo la integridad del mismo. En general, tras la etapa de extracción se requiere de una etapa posterior de limpieza (*clean-up*) con el fin de reducir tanto como sea posible los interferentes de matriz que hayan sido extraídos junto las micotoxinas.

En el transcurso de las últimas décadas se han desarrollado diversos procedimientos para la extracción y purificación de las aflatoxinas procedentes de alimentos de todo tipo. Sin embargo, no existe una metodología universal que se pueda aplicar indiscriminadamente a cualquier alimento, sino que la aplicación de los métodos disponibles está fuertemente condicionada por las características fisicoquímicas tanto del alimento a analizar como de las aflatoxinas, así como por las características analíticas de la técnica instrumental seleccionada para su posterior detección y/o cuantificación. Con relación a los procesos de extracción, la tendencia mayoritaria consiste en procesos cada vez más selectivos, empleando menor volumen de disolvente y disminuyendo el tiempo de tratamiento.

Dado el carácter moderadamente polar de las aflatoxinas, los disolventes más adecuados para su extracción son de tipo orgánico y polar, siendo los más empleados el ACN, MeOH, cloroformo y acetona (García et al., 1994). Para realizar la extracción de las aflatoxinas se suele aplicar un solo disolvente de manera individual, o bien una combinación de dos disolventes orgánicos polares o de un disolvente orgánico con una proporción minoritaria de agua (miscibles en todos los casos). El pH del disolvente también puede modificarse para aumentar la eficiencia de extracción; por ejemplo, la acidificación con HCOOH, HAc o cítrico puede mejorar la extracción de las aflatoxinas a partir de algunos alimentos (Perestrelo et al., 2019). Los procedimientos más empleados para el aislamiento de las aflatoxinas de muestras sólidas incluyen la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción líquido-líquido dispersiva (DLLE), que añade un tercer disolvente (dispersante) que emulsiona los disolventes y fases no miscibles o bien separa dos fases inicialmente miscibles (*partitioning*) (Campone et al., 2013), la extracción por Soxhlet, los QuEChERS (*“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”*) y la extracción en fase sólida (Perestrelo et al., 2019). La principal desventaja de los métodos de extracción mencionados es el elevado volumen de disolvente empleado. En los últimos años la tendencia es reducir el volumen de disolvente empleando en consonancia con los

principios de la química verde, bien mediante la miniaturización de los sistemas (Quigley et al., 2016). o bien mediante la aplicación de fluidos supercríticos con CO₂. Esta última metodología ha mostrado una gran eficiencia para la extracción de aflatoxinas presentes en maíz, cacahuètes, hígado, piensos y hierbas medicinales. Sin embargo, el carácter mínimamente polar de las aflatoxinas reduce su afinidad por el CO₂, por lo que requiere la adición de modificadores (ACN, MeOH) que aumenten la solubilidad de las aflatoxinas en el CO₂ (Anklam et al., 1998).

Los procesos de extracción pueden coextraer interferentes de la matriz del alimento junto a las aflatoxinas, por lo que se requiere de una etapa de purificación adicional de los extractos (Taylor et al., 1993). La práctica más habitual para realizarla es mediante la aplicación de la extracción en fase sólida (SPE). A continuación, se detallarán los aspectos más relevantes de estos sistemas de aislamiento y limpieza.

- ***Extracción en fase sólida y aplicación de columnas de inmunoafinidad.***

La metodología de extracción en fase sólida, más conocida bajo las siglas en inglés SPE (*Solid Phase Extraction*), consiste en la extracción de las aflatoxinas desde una fase líquida (que puede ser la propia matriz alimentaria líquida sin pretratar o bien un extracto que contiene las aflatoxinas previamente extraídas del alimento) (Juan et al., 2022) hacia una fase sólida (sorbente que se encuentra dentro de un cartucho o columna) en la que quedan retenidas (Tahir et al., 2018). Las interacciones aflatoxina-sorbente establecidas pueden ser hidrofóbicas (apolar-apolar o van der Waals), hidrofílicas (polar-polar, puente de hidrógeno, dipolo-dipolo o dipolo-dipolo inducido), iónicas (catiónicas o aniónicas), e incluso de alta especificidad antígeno-anticuerpo, todas de carácter reversible (Lucci et al., 2012). Esta metodología es una práctica rutinaria en muchos laboratorios para la preconcentración y limpieza de extractos de compuestos orgánicos (Ötles & Kartal, 2016). Las etapas habituales de esta metodología se ilustran en la **Figura 18**.

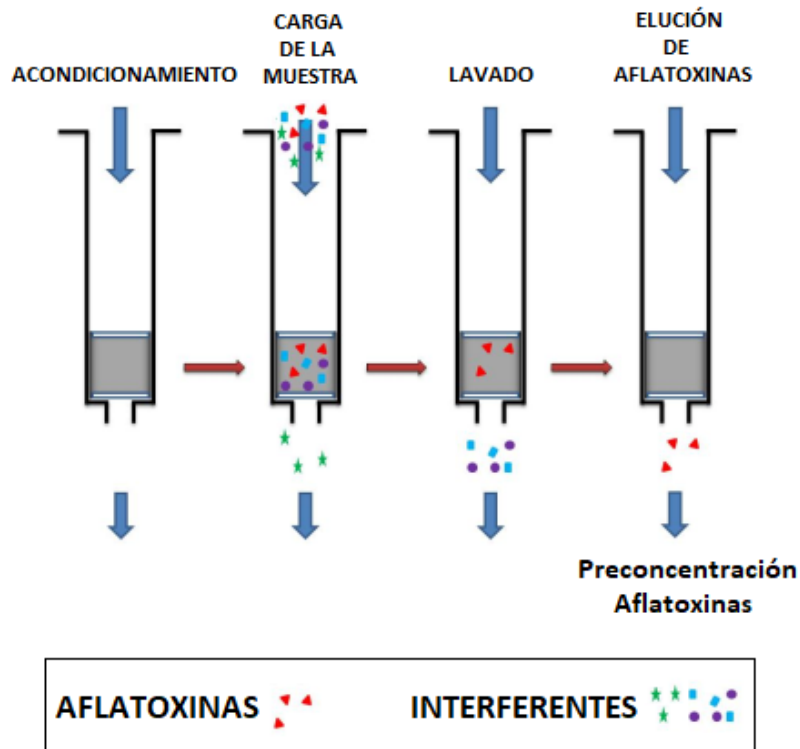


Figura 18. Esquema de las diferentes etapas que componen la extracción y/o purificación de las muestras mediante extracción en fase sólida (SPE) modificada de Lucci et al., 2012.

Los sorbentes más adecuados para retener las aflatoxinas deben ser de naturaleza ligeramente apolar. Por este motivo, los más empleados tradicionalmente han sido el gel de sílice, el florisil, el octadecilo (C-18), el octilo o el ciclohexilo. Sin embargo, estos materiales han dado paso al uso de diferentes tipos de polímeros orgánicos complejos como aquellos derivados del estireno-divinilbenceno, (Scott, 1993). A pesar de la naturaleza predominantemente apolar de las aflatoxinas, estas moléculas también contienen diferentes sustituyentes de naturaleza polar como grupos hidroxilo, cetónicos e incluso lactónicos que aportan un ligero carácter polar a la molécula. Por este motivo, la adición de grupos polares específicos a sorbentes de naturaleza no polar como el estireno-divinilbenceno permiten que el sorbente adquiera una polaridad mixta, favoreciendo la retención de las aflatoxinas (Poole, 2003), (Ridgway et al., 2008). Algunos de los grupos funcionales de carácter polar más comúnmente añadidos al sorbente son los grupos hidroxilo y las aminas primarias y secundarias (PSA) como la pirrolidona, entre otros. La modificación de los sorbentes apolares tradicionales también incluye la adición de grupos con cargas positivas o negativas. Aunque el objetivo inicial de estos grupos cargados es la retención directa de analitos con carga y las aflatoxinas no presentan carga en su estado basal, los sorbentes de polaridad mixta con grupos

adicionales de intercambio catiónico y aniónico también han demostrado una mayor capacidad de retención de las aflatoxinas con respecto a los sorbentes no cargados a partir de matrices alimentarias específicas. Esta mejora en la retención de las aflatoxinas está relacionada con la competencia de los interferentes de matriz cargados con las aflatoxinas para unirse al sorbente. Ante este fenómeno, la presencia de grupos con carga opuesta en el sorbente puede favorecer su interacción con la carga del interferente y mantenerlo retenido en esta parte del polímero, facilitando así la interacción y retención de las aflatoxinas con la estructura neutra del polímero. Algunos de los sustituyentes con cargas más utilizados en sorbentes para SPE de intercambio aniónico son los cationes del dietilaminopropilo, del trimetilaminopropilo o de la dimetilbutilamina, mientras que para la SPE de intercambio catiónico se suelen emplear los aniones propionilsulfonato y bencenosulfonato, entre otros (Płotka-Wasyłka et al., 2016).

Otros tipos de sorbentes que presentan una elevada capacidad de retención de las aflatoxinas son los basados en óxidos metálicos y nanomateriales. Así, el óxido de aluminio se ha mostrado capaz de extraer aflatoxinas a partir de disolventes como el agua, ACN y MeOH y de eliminar con gran eficacia los interferentes de naturaleza no polar (Sobolev & Dörner, 2002). Otro ejemplo son las nanopartículas superparamagnéticas como el Fe_3O_4 , que se emplean para realizar una extracción en fase sólida magnética de las aflatoxinas (MSPE). La principal ventaja que presentan es que se pueden aplicar directamente sobre el extracto y tras ello las aflatoxinas se separan del sorbente por decantación magnética, sin necesidad de acondicionamiento, lavados ni elución (McCullum et al., 2014). Los polímeros de impresión molecular (MIPs) se han aplicado para el aislamiento selectivo de aflatoxinas (Ridgway et al., 2008). Aunque el uso de nanopartículas y de MIPs ha demostrado buena efectividad para el aislamiento y purificación de aflatoxinas, su complejidad dificulta su viabilidad de uso para análisis de rutina.

La modalidad de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) permite la aplicación directa del sorbente sobre determinados alimentos sólidos, disminuyendo notablemente el volumen de disolvente al no ser necesaria una etapa previa de extracción (Blesa et al., 2003).

En los últimos años se ha desarrollado un notable interés en el desarrollo de sorbentes altamente selectivos que faciliten la retención exclusiva del analito, impidiendo

la retención de interferentes. Un tipo de sorbentes altamente selectivos son los inmunosorbentes (IAC).

El desarrollo de las IAC es un proceso complejo que comprende la síntesis del anticuerpo, su adecuada inmovilización sobre un soporte adecuado (suelen estar embebidos en un relleno inerte de gel de agarosa o sílica, entre otros materiales) y su empaquetamiento dentro de un recipiente de columna mediante algún tampón que evita la degradación del anticuerpo.

El mecanismo de acción de las IAC es muy similar al de la SPE tradicional. Las aflatoxinas, una vez retenidas, se eluyen con algún disolvente de naturaleza orgánica (ACN y MeOH son los más empleados). La capacidad eluyente de estos disolventes se basa en una alta afinidad por las aflatoxinas que rompe las interacciones reversibles establecidas entre Aflatoxina-Anticuerpo, o bien en su capacidad para desnaturalizar directamente el propio anticuerpo, causando la liberación del analito (Castegnaro et al., 2006).

Sin embargo, la fragilidad del anticuerpo requiere la evaluación previa de las condiciones adecuadas de operación de la IAC sin perjuicio de alterar la integridad estructural del anticuerpo durante el proceso de SPE, como por ejemplo, su estabilidad y vida promedio, su tolerancia a determinados disolventes y al contenido específico del extracto a cargar, la reversibilidad de la interacción establecida con las aflatoxinas o posibles efectos de reactividad cruzada que supongan la retención accidental de compuestos indeseados (Candlish & Stimson, 1993). Además, los interferentes de la matriz alimentaria también pueden dificultar la retención de las aflatoxinas por los anticuerpos o bien impedir su reconocimiento por el anticuerpo al conjugarse con ellas.

Uno de los factores limitantes a tener en cuenta durante el manejo de las IAC es el tipo de disolvente aplicado durante la carga de la muestra y el lavado del anticuerpo, puesto que los disolventes orgánicos tienen una elevada capacidad desnaturalizante. Por este motivo, la aplicación de las IAC es incompatible en principio con la presencia de disolventes orgánicos, lo que supone una importante limitación porque la extracción de aflatoxinas se realiza preferentemente con este tipo de disolventes. Por tanto, cualquier disolvente orgánico presente en el extracto a cargar deberá ser eliminado o diluido hasta un porcentaje tal que no afecte a la estabilidad ni a la capacidad de retención del anticuerpo. A su vez, se ha demostrado que algunos disolventes como el MeOH tienen

menor capacidad desnaturalizante que otros como el ACN, la acetona, el cloroformo o los disolventes no polares, por lo que se recomienda emplear este disolvente orgánico en lugar de los otros durante la extracción y carga. Por tanto, los disolventes más adecuados para la carga y el lavado de la IAC deben ser de naturaleza acuosa, tamponados y con presencia mínima de algún disolvente orgánico como MeOH para aumentar la eficacia del lavado. Otro aspecto que se debe controlar es el pH del extracto a cargar, el cual debe ser neutralizado previamente, así como la identificación y eliminación previa de cualquier componente específico con capacidad desnaturalizante del anticuerpo presentes en el alimento original. También se recomienda la dilución y el filtrado previo de los extractos a cargar (Scott et al., 1997).

La efectividad de IAC se ha puesto de manifiesto en el análisis de aflatoxinas B y G en una gran variedad de alimentos de diferente composición nutricional (Trucksess et al., 2006).

Aparte de las limitaciones metodológicas expuestas anteriormente, las principales desventajas del método IAC para la purificación de aflatoxinas en alimentos son su elevado coste, así como su limitación de uso para el análisis multi-micotoxina debido a su exclusividad de retención por aflatoxinas. Para compensar estas limitaciones, se han desarrollado nuevas IAC que contienen diferentes tipos de anticuerpo para la retención simultánea de aflatoxinas junto a otros tipos de micotoxinas como la ocratoxina A, el deoxinivalenol, las fumonisinas, zearalenona y toxinas T-2 y HT-2, lo cual abarata el coste y tiempo de análisis. La retención simultánea de diferentes micotoxinas mediante IAC ha sido aplicada con éxito sobre diferentes tipos de alimentos (cereales, frutos secos, cacao y aceite de oliva, entre otros). No obstante, el empleo de IAC multi-micotoxina supone el establecimiento de unas condiciones de compromiso que tengan en cuenta la naturaleza de todos los tipos de micotoxinas, lo que reduce la flexibilidad de las condiciones de carga, lavado y elución disponibles para obtener recuperaciones satisfactorias en micotoxinas con diferentes propiedades fisicoquímicas (Vaclavikova et al., 2013). Otra alternativa podría ser el acoplamiento de la técnica IAC en tándem con otras técnicas SPE que permitan la retención secuencial de las aflatoxinas (mediante IAC) junto con otras micotoxinas, si bien es cierto que no hay referencias del acoplamiento de las IAC con otras metodologías SPE. Con respecto a su elevado coste, algunos autores como Scott et al., 1997 han logrado la regeneración de los anticuerpos desnaturalizados tras la elución mediante lavados con tampón fosfato salino (PBS) pudiendo reutilizar las IAC hasta cien

veces, mientras que Toyoda et al., 1994 lograron evitar la desnaturalización de los anticuerpos empleando una mezcla DMSO:PBS (1:1) como eluyente, lo que permitió reutilizar la misma columna IAC hasta ocho veces, lo que supone un ahorro considerable.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se puede concluir que la metodología de purificación de aflatoxinas mediante IAC tiene un gran potencial, a pesar de su limitación de uso en metodologías de análisis multi-micotoxina y de su coste económico. La aplicación de los inmunsorbentes para el análisis de aflatoxinas ha crecido de forma exponencial, como se puede apreciar en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Metodologías analíticas aplicadas al análisis de aflatoxinas (individuales o en combinación con otras micotoxinas) a partir de cereales, semillas oleaginosas, frutos secos y productos derivados durante los últimos años.

Micotoxina	Alimento	Muestra Inicial	Preparación de la Muestra			Técnica Analítica	Ref.
			Extracción (v:v)	Purificación			
				Técnica	Elución		
AFB1	Arroz	25 g	MeOH:H ₂ O (7:3) + NaCl	Dilución 1/3 (PBS) + IAC	1) MeOH 2) H ₂ O	HPLC-FLD	(Savi et al., 2018)
AFs	Arroz	50 g	MeOH:H ₂ O (3:2) + NaCl	Dilución 1/3 (PBS) + IAC	1) MeOH 2) H ₂ O	HPLC-FLD	(Al-Zoreky & Saleh, 2019)
AFs + 73 Micotox.	Arroz, Maíz, Cacahuete	1 g	ACN:H ₂ O (1:1) HCOOH (1%) + QuEChERS	QuEChERS (Dispersivos)	-	UHPLC-MS/MS	(Manizan et al., 2018)
AFs	Arroz, Cassava	25 g	MeOH:H ₂ O (7:3)	SPE inversa (PuriToxSR)	-	HPLC-MS/MS	(Morrison et al., 2019)
AFs	Arroz, Pasta, Derivados de cereales	25 g	MeOH:H ₂ O (8:2) + NaCl	Dilución 1/7 (PBS) + IAC	MeOH	HPLC-FLD	(Korley Kortei et al., 2019)
AFB1, DON	Arroz, Trigo	2 g	ACN:H ₂ O:HAc (79:20:1)	Filtrado (PTFE)	-	LC-MS/MS	(Xia et al., 2020)
AFs + 12 Micotox.	Bebidas vegetales (arroz, avena, almendra, soja)	10 mL	ACN (5 mL)	Dilución 1/2 (H ₂ O) SPE (C-18)	MeOH	LC-MS/MS	(Juan et al., 2022)
AFs + 25 Micotox.	Bebidas vegetales (arroz, avena, almendra, soja)	5 mL	ACN (5 mL) + HCOOH (0.5%) + QuEChERS	Evaporación y Resuspensión directas	-	UHPLC-MS/MS	(Rodríguez-Cañás et al., 2024)
AFs	Maíz	5 g	MeOH:H ₂ O (7:3)	Dilución 1/3 + SPE (C-18)	MeOH	UHPLC-FLD	(Nabwire et al., 2020)

Tabla 6. Continuación.

Micotoxina	Alimento	Muestra Inicial	Preparación de la Muestra			Técnica Analítica	Ref.
			Extracción (v:v)	Purificación			
				Técnica	Elución		
AFs	Maíz, Cachuete, Semillas de Moringa	50 g	MeOH:H ₂ O (7:3) + NaCl (1%)	Dilución 1/4 (PBS) + IAC	1) MeOH 2) H ₂ O	HPLC-DAD	(Aristil et al., 2020)
AFs, OTA	Maíz, Piensos	25 g	ACN:H ₂ O (8:2) + NaCl (5 g)	Dilución 1/5 (PBS) + IAC	1) MeOH 2) H ₂ O (HAc 0.1%)	HPLC-FLD	(Abdallah et al., 2019)
AFs, FBs	Tortillas de maíz	25 g	MeOH:H ₂ O (8:2) + NaCl (2 g)	Dilución 1/8 (PBS) + IAC (Solo AFs)	MeOH	HPLC-FLD	(Wall-Martínez et al., 2019)
AFB1, STE	Maíz, Soja y Derivados	50 g	ACN:H ₂ O (21:4)	SPE inversa (Multisep AflaZON)	Sin elución (AFs no retenidas) Dilución 1/2 (HAc 1%)	LC-MS/MS	(Nomura et al., 2018)
AFB1, STE	Trigo y derivados	5 g	ACN:H ₂ O (95:5) + QuEChERS	QuEChERS (Dispersivos)	-	LC-MS/MS	(Y. Zhao et al., 2018)
AFs	Arroz, Avena, Trigo, Maíz	1 g	MeOH:H ₂ O (6:4)	Dilución 1/3 (PBS) + IAC	MeOH	UHPLC-MS/MS	(Lijalem et al., 2024)
AFs	Cerveza	25 mL	-	Desgasificación + IAC	MeOH	HPLC-FLD	(Rocha et al., 2023)
AFs	Arroz, Sorgo, Cacahuete, Almendra, Galletas de trigo	25 g	MeOH:H ₂ O (8:2) + NaCl (5 g)	Dilución 1/5 (PBS) + IAC	MeOH	HPLC-FLD	(Dhanshetty et al., 2021)
AFs	Arroz, cacahuete	5 g	ACN:H ₂ O (84:16)	Dilución 1/8 (PBS) + IAC	MeOH	HPLC-FLD	(W. Zhao et al., 2024)

12.2. Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) para el análisis de aflatoxinas

Una vez realizada la extracción de las aflatoxinas y la purificación de los extractos se lleva a cabo la medida de las aflatoxinas. La forma más habitual de analizar las aflatoxinas es mediante técnicas de separación acopladas a distintos detectores. A pesar de que se han desarrollado aplicaciones para la determinación de aflatoxinas empleando distintas técnicas de separación como electroforesis capilar (Li et al., 2012) (García-Ruiz & Marina, 2009), cromatografía en capa fina (Sherma, 2009) Trucksess & Pohland, 2002), cromatografía de gases (GC) (Zhang & Banerjee, 2020), la técnica de elección más empleada, sin lugar a dudas, es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV-Vis), espectrofotometría de fluorescencia molecular (FLD) y espectrometría de masas (MS) como sistemas de detección.

En la actualidad, la cromatografía líquida en sus variedades de alta resolución ("*High Performance Liquid Chromatography*", HPLC) y de ultra alta presión o ultra alto rendimiento ("*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*", UHPLC) se considera la técnica de referencia para la separación de aflatoxinas, debido a su idoneidad para la separación de compuestos de naturaleza polar, especialmente en la modalidad de fase reversa. Mientras que la HPLC suele emplear columnas con un tamaño de partícula entre 3-5 μm a una presión de 5500 psi, la UHPLC utiliza partículas con un menor tamaño de partícula ($< 2 \mu\text{m}$), para lo cual requiere de bombas especiales que puedan soportar las presiones que pueden generarse en el sistema (por ejemplo, 15000 psi). El empleo de UHPLC proporciona una mayor resolución y sensibilidad gracias a la obtención de picos cromatográficos más estrechos y de mayor altura y, además, la separación cromatográfica es más rápida, lo que convierte a esta última en la variante más eficaz para la separación cromatográfica de aflatoxinas. Tanto la técnica de HPLC como UHPLC tienen la suficiente capacidad de resolución para la separación simultánea tanto de aflatoxinas como de otros tipos de micotoxinas y metabolitos en una misma muestra (hasta 20-40 micotoxinas diferentes en un mismo análisis) (Varelis, 2009). La mayoría de los métodos emplean columnas de fase inversa. Las más utilizadas son las que contienen fases estacionarias con largas cadenas hidrocarbonadas compuestas por 18 átomos de carbono (C-18). La eficacia de separación de estas columnas también se ha visto aumentada por

la aplicación de fases móviles de naturaleza mixta (acuosas y orgánicas) aplicadas mediante gradientes previamente optimizados (Zhang & Banerjee, 2020).

Las aflatoxinas B y G presentan un máximo de absorbancia 360 nm, lo que ha posibilitado su detección y cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis. Sin embargo, el hecho de que todas las aflatoxinas absorban a la misma longitud de onda implica la necesidad de separarlas previamente mediante HPLC. Por otro lado, la espectroscopía de fluorescencia molecular (FLD) es una de las técnicas de detección de aflatoxinas más empleada en la actualidad para la detección simultánea de las aflatoxinas, como se muestra en la **Tabla 6**. Se trata de una técnica sensible y altamente selectiva que permite detectar y cuantificar las aflatoxinas gracias a su capacidad para emitir radiación a 425 nm (B1 y B2 mediante el grupo ciclopentanona) y a 450 nm (G1 y G2 mediante el grupo lactona) cuando son expuestas radiación UV (λ de excitación a 365 nm) (Carvajal, 2013). Al igual que en la espectroscopía UV-Vis, esta técnica requiere la separación previa de las aflatoxinas (Kok et al., 1986).

Sin embargo, una de las limitaciones más importantes de la técnica FLD es que la fluorescencia exhibida por las aflatoxinas puede ser fácilmente desactivada (quenching de fluorescencia) por algunos de los disolventes más comúnmente empleados en los procesos de extracción y como fases móviles de la cromatografía. Por ejemplo, el cloroformo, el diclorometano y el MeOH suprimen la fluorescencia de las aflatoxinas B1 y B2, mientras que las fases acuosas inhiben la fluorescencia de las aflatoxinas B1 y G1, lo que provoca una reducción significativa de la sensibilidad de la técnica. Además, la fluorescencia emitida por las aflatoxinas B1 y G1 es poco intensa, lo que disminuye su sensibilidad (Traag et al., 1987). La inhibición de la fluorescencia de aflatoxinas se ha intentado minimizar mediante procesos de derivatización. Entre los agentes químicos más efectivos para la derivatización de las aflatoxinas destacan el ácido trifluoroacético (TFA), el bromuro y el yoduro, capaces de hidroxilar o bien de añadir dos átomos del halógeno a las aflatoxinas, potenciando su fluorescencia (Reiter et al., 2009). Mientras que la derivatización con el TFA debe ser realizada previo a la separación cromatográfica (pre-columna), los halógenos se aplican tras la separación (post-columna), lo que facilita la automatización del proceso. También se ha demostrado igualmente efectiva la derivatización fotoquímica (post-columna), mediante irradiación UV (Garner et al., 1993, Chiavaro et al., 2001). La fluorescencia molecular ha sido ampliamente usada por sus ventajas sobre la espectrofotometría UV-Vis (mayor sensibilidad y selectividad con

capacidad para detectar aflatoxinas a niveles inferiores a 1 µg/L en una amplia variedad de alimentos). Pese a la desventaja operacional que supone la necesidad de derivatizar las aflatoxinas, en la actualidad la HPLC-FLD continúa siendo una alternativa de uso extendido para el análisis de aflatoxinas.

Sin embargo, los detectores basados en espectrometría de masas (MS y MS/MS) son en la actualidad los más empleados en HPLC para el análisis simultáneo de micotoxinas, posicionando el HPLC-MS/MS como el método de referencia para el análisis de micotoxinas en alimentos y piensos.

12.2.1. Detección mediante espectrometría de masas y espectrometría de masas en tándem.

La espectrometría de masas es una técnica que permite la identificación y cuantificación de los compuestos químicos presentes en una muestra midiendo la relación masa/carga y la abundancia de los iones en fase gaseosa. Por tanto, es aplicable a cualquier compuesto que sea ionizable. Aunque esta técnica permite el análisis directo de la muestra mediante infusión directa, la separación cromatográfica previo al análisis es la forma habitual de trabajo (Tittlemier et al., 2020).

La técnica HPLC-MS y especialmente la técnica HPLC-MS/MS posibilita el análisis simultáneo de aflatoxinas y otros tipos de micotoxinas en la misma muestra. Esta capacidad de análisis multi-micotoxina establece un gran potencial frente a técnicas analíticas como la HPLC-UV-Vis o la HPLC-FLD, cuya capacidad para la detección de diferentes micotoxinas se halla fuertemente limitada. En este sentido, el HPLC-MS/MS puede analizar un rango inicial de hasta 300 micotoxinas y metabolitos derivados en un solo análisis (Sulyok et al., 2020). La técnica MS se basa en la ionización, separación y detección de los iones generados a partir de cada analito presente en la muestra. Para ello, los analitos deben ser previamente ionizados y separados en base a su relación masa/carga (m/z) en condiciones de vacío y fase gaseosa para su detección específica. El ion de mayor abundancia se suele tomar como referencia para evaluar la abundancia del resto de iones (normalmente considerado como 100% abundante) (de Hoffmann & Stroobant, 2007). La MS basada en la detección de iones moleculares ha evolucionado significativamente con el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), que permite la fragmentación de los iones moleculares generados a partir de los analitos previamente

ionizados. Los fragmentos obtenidos tienen una relación m/z conocida, lo que aumenta notablemente la sensibilidad y la selectividad frente a la MS tradicional. La identificación final del analito se establece por correlación de las masas teóricas conocidas (masa molecular ionizada y masas de los fragmentos caracterizados previamente) con las masas identificadas analíticamente o con un patrón de fragmentación característico de la molécula (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

La instrumentación de un espectrómetro de masas está constituida por tres partes fundamentales: la fuente de iones, el analizador de masas y el detector. Todos los componentes del sistema de MS se mantienen a alta presión de vacío para facilitar el paso de los iones generados y evitar interacciones indeseadas con los gases ambientales. A continuación, se describe la función específica de cada componente del sistema MS y se detalla cuáles son las tecnologías más frecuentemente empleadas dentro de cada componente instrumental para el análisis específico de aflatoxinas en alimentos, de acuerdo con Cajka et al., 2009:

- ***Fuente de ionización.***

Teniendo en cuenta que la polaridad, la masa molecular, la estabilidad térmica y, en menor medida, la volatilidad del analito son factores determinantes para la elección del tipo de fuente empleada, la ionización por electrospray ("*Electrospray Ionization*", ESI) se considera como la fuente de ionización más adecuada y habitual para aflatoxinas, en detrimento de otras fuentes alternativas como la ionización química a presión atmosférica ("*atmospheric pressure chemical ionization*", APCI) o la fotoionización a presión atmosférica ("*atmospheric pressure photoionization*", APPI). La ESI, al contrario que la APCI y la APPI, es una fuente capaz de ionizar moléculas con un carácter más polar, termolábil, en un amplio rango de pesos moleculares (bajos e intermedios) y no requiere que la molécula sea volátil, lo que permite una mejor adaptación a las propiedades de las aflatoxinas que el resto de las fuentes.

En la **Tabla 7** se resumen y se comparan las propiedades requeridas en un analito para su ionización mediante cada tipo de fuente:

Tabla 7. Características óptimas del analito para la selección de la fuente de ionización más adecuada (ESI, APCI o APPI).

Características del Analito	Fuente de Ionización		
	ESI	APCI	APPI
Masa Molecular	Bajo - Intermedio	Intermedio	Intermedio
Volatilidad	No volátil	Ligeramente volátil	Ligeramente volátil
Termoestabilidad	Termolábil	Termoestable	Termoestable
Fase de Ionización	Líquida	Gaseosa	Gaseosa
Grupos Moleculares Ionizables	Varios	Uno	Uno
Polaridad	Intermedia - alta	Baja - intermedia	Baja - intermedia

- **Analizador de masas.**

Los analizadores de masas se dividen en dos categorías según el modo en que separan los iones para su registro: analizadores de barrido de masas ("*scanning*") en los que la separación de los iones ocurre mediante el cambio gradual de las condiciones de trabajo del campo eléctrico y magnético aplicado, e instrumentos sin barrido de masas ("*non-scanning*") que mantienen fijas las condiciones de operación aplicadas durante la separación de los iones. La elección de los analizadores más adecuados para la detección de las aflatoxinas se realiza en base a una serie de criterios basados en sus propiedades estructurales, así como los posibles interferentes de matriz remanentes en la muestra (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

Como se ha comentado anteriormente, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se basa en la combinación de varios analizadores para formar instrumentos híbridos capaces de fragmentar los iones moleculares de los analitos (ion precursor) para generar fragmentos de masa conocida (iones producto). La fragmentación de los analitos aumenta significativamente la sensibilidad, la selectividad y el poder de resolución de la técnica analítica. La mejora de la sensibilidad se produce debido a que, al ser menor el ruido de fondo, se consigue aumentar de manera significativa la relación señal/ruido (S/N) (Malachová et al., 2018). En la actualidad, los analizadores de MS/MS que se emplean de manera más frecuente para el análisis de aflatoxinas son el triple cuadrupolo (QqQ) y, en menor medida, el cuadrupolo- tiempo de vuelo (Q-TOF) y el cuadrupolo orbitrap (Q-Orbitrap), de acuerdo con las revisiones bibliográficas efectuadas por Zhang & Banerjee,

2020 y Renaud et al., 2019, entre otros autores. A continuación, se describen brevemente los analizadores empleados durante esta Tesis Doctoral para el análisis de aflatoxinas, la OTA y la STG:

- ✓ **Cuadrupolo simple:** Es el analizador más común para el análisis de aflatoxinas. Consiste en cuatro barras cilíndricas dispuestas de manera radial que aplican un campo eléctrico selectivo y cambiante para separar los iones. Este analizador tiene la capacidad de operar en dos modos distintos: 1) Modo de monitorización de ion único ("*Selected ion monitoring*", SIM), que solamente permite el paso de un ion con una m/z específica hacia el detector, descartando el paso del resto de iones, lo que mejora la sensibilidad renunciando a la información espectral, y 2) Modo de barrido completo ("*Full scan*", FS), que permite el paso de todos los iones presentes de una manera secuencial permitiendo el paso de una m/z cada vez, lo que disminuye la sensibilidad, pero aumenta la información espectral obtenida de la muestra analizada (Cajka et al., 2009, de Hoffmann & Stroobant, 2007). Este tipo de analizador presenta una sensibilidad relativamente alta y una baja resolución (proporciona información de la masa nominal).
- ✓ **Triple cuadrupolo (QqQ):** Este analizador consta de dos cuadrupolos separados entre sí por una celda de colisión. En la celda de colisión se produce la fragmentación del ion precursor para generar los iones producto. De esta manera, el primer cuadrupolo (Q1) separa el ion precursor seleccionado para su fragmentación posterior en la celda de colisión (Q2) (disociación inducida por colisión con un gas, CID), y un tercer cuadrupolo (Q3) que separa los iones producto generados a partir del ion precursor. Los modos de funcionamiento más habituales son: 1) Monitorización de reacción múltiple ("*Multiple Reaction Monitoring*", MRM). En este caso los iones precursores con una m/z única pasan a la celda de colisión. Los fragmentos iónicos se generan mediante la colisión con moléculas de nitrógeno. El Q3 se configura para una m/z única de fragmento iónico específico. Este método es muy sensible y se utiliza para realizar cuantificaciones; 2) Barrido completo de los iones producto ("Full scan", FS). En este caso el Q3 escanea secuencialmente permitiendo el paso por el detector de una m/z cada vez. Se genera un espectro del ion producto. Este modo de funcionamiento es menos sensible que MRM.

✓ **Tiempo de vuelo (TOF):** En el analizador TOF los iones se separan en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo de longitud conocida. El tiempo de vuelo (t) para cada masa es único y viene determinado por la energía (E) a la que un ion se acelera, la distancia (d) que tiene que viajar y la m/z . Los de menor m/z volarán a mayor velocidad y llegarán antes al detector que los iones más grandes. El uso de reflectrones o espejos ópticos reenfoca los iones que tienen la misma m/z sobre el detector, consiguiendo de este modo una elevada resolución. Dicha resolución permite obtener medidas de masa exacta de los iones detectados (Cajka et al., 2009, de Hoffmann & Stroobant, 2007). Los analizadores TOF presentan un poder de resolución alto en detrimento de una sensibilidad más baja con respecto a los analizadores de cuadrupolo, y también permiten analizar un rango superior de masas. El análisis con un cuadrupolo simple o con un triple cuadrupolo proporciona información de la masa nominal (poder de resolución bajo), mientras que los instrumentos de TOF pueden proporcionar información de la masa exacta (poder de resolución alto). Para realizar el análisis por tiempo de vuelo, se necesita realizar la calibración continua del sistema TOF y así asegurarse la mejor exactitud de masa posible. Las medidas suelen desviarse solo algunas partes por millón (ppm). Con una resolución de masas y una exactitud de masas suficiente, un espectrómetro de masas TOF puede confirmar positivamente la composición elemental.

✓ **Cuadrupolo - Tiempo de vuelo (Q-TOF):** Este analizador consiste en el acoplamiento de un cuadrupolo y un analizador TOF, que separa todos los iones producto derivados de la fragmentación del ion precursor (previamente separado por el primer cuadrupolo y fragmentado en la celda de colisión), dando lugar al espectro de iones producto con masa exacta lo cual permite identificar de manera inequívoca los compuestos presentes en la muestra (de Hoffmann & Stroobant, 2007). La elevada sensibilidad en modo de barrido de iones del Q-TOF, su elevado poder de resolución, y la posibilidad de obtener medidas de masa exacta de los iones detectados, los convierten en una herramienta de análisis ideal para la identificación de los compuestos, así como para la elucidación estructural. En cambio, estos analizadores poseen un menor rango de respuesta lineal y menor sensibilidad que el QqQ, por lo que su aplicación en el campo cuantitativo es limitada en comparación con la que ofrece un QqQ (Cajka et al., 2009).

Por todas las ventajas señaladas, la instrumentación MS/MS se ha convertido en la técnica de referencia para al análisis de micotoxinas. Sin embargo, su sensibilidad se halla

afectada por la presencia de posibles interferentes de la matriz alimentaria que coeluyen con las aflatoxinas. Estos interferentes pueden suprimir e incluso incrementar la señal del analito mediante lo que se conoce como "efecto matriz" de manera mucho más acusada que en el resto de las técnicas analíticas. Este fenómeno se debe a la presencia de componentes presentes en la matriz que coeluyen con las aflatoxinas de manera que compiten con éstas por ionizarse en la fuente ionización. Dicha competición provoca una disminución o un aumento de la eficiencia de formación de los iones de los analitos de manera que, si no se corrige, la cuantificación de los analitos está sujeta a un error.

El efecto matriz puede corregirse utilizando distintas estrategias, como la dilución de la muestra o mediante la optimización previa de etapas de purificación efectivas que eliminen los interferentes remanentes de matriz. Sin embargo, en la práctica la dilución de las muestras requiere de una elevada sensibilidad de detección de las aflatoxinas diluidas, mientras que el desarrollo de etapas adicionales de purificación es un proceso largo y laborioso (Stahnke et al., 2012). Por otro lado, las estrategias más utilizadas son la utilización de un calibrado en matriz y mediante el uso de patrones internos.

La preparación de un calibrado en matriz es laboriosa porque requiere de la preparación de un calibrado para cada tipo de muestra, mientras que la adición de un patrón interno permite corregir el efecto matriz, y las posibles pérdidas del analito producidas durante la extracción y/o la etapa de purificación. Además, la corrección analítica efectuada por el patrón interno permite la interpolación de señal de muestras problema en un calibrado estándar interno, que puede utilizarse para diferentes tipos de matrices alimentarias, evitando así el uso del calibrado en matriz (Rychlik & Asam, 2008). Aunque los patrones internos más eficaces para las aflatoxinas son las propias aflatoxinas en las que uno o más átomos se sustituyen por ^{13}C o deuterios, su elevado coste ha llevado a algunos autores a emplear como estándares internos otros compuestos de estructura y características análogas a las aflatoxinas (como la AFM1 para la corrección de las pérdidas de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, de acuerdo con Nonaka et al., 2009, entre otros). Sin embargo, el uso de un compuesto con estructura análoga requiere de una optimización previa para confirmar que el compuesto presenta un comportamiento físicoquímico semejante y, por tanto, una respuesta similar a las de las aflatoxinas a analizar. El compuesto empleado no debe estar presente de manera natural en el alimento de interés (Leong et al., 2011).

V. REFERENCIAS

V. REFERENCIAS

- Abdallah, M. F., Girgin, G., & Baydar, T. (2019). Mycotoxin detection in maize, commercial feed, and raw dairy milk samples from Assiut City, Egypt. *Veterinary Sciences*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/VETSCI6020057>
- Abdel-Wahhab, M. A., Aljawish, A., El-Nekeety, A. A., Abdel-Aziem, S. H., & Hassan, N. S. (2017). Chitosan nanoparticles plus quercetin suppress the oxidative stress, modulate DNA fragmentation and gene expression in the kidney of rats fed ochratoxin A-contaminated diet. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.002>
- Agbetiameh, D., Ortega-Beltran, A., Awuah, R. T., Atehnkeng, J., Cotty, P. J., & Bandyopadhyay, R. (2018). Prevalence of aflatoxin contamination in maize and groundnut in Ghana: Population structure, distribution, and toxigenicity of the causal agents. *Plant Disease*, 102(4), 764–772. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0749-RE>
- Ahmad, M., Ahmad, M. M., Hamid, R., Abdin, M. Z., & Javed, S. (2013). Use of response surface methodology to study the effect of media composition on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 29(1), 39–45. <https://doi.org/10.1007/s12550-012-0151-x>
- Altemöller, M., Podlech, J., & Fenske, D. (2006). Total synthesis of altenuene and isoaltenuene. *European Journal of Organic Chemistry*, 7, 1678–1684. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200500904>
- Al-Zoreky, N. S., & Saleh, F. A. (2019). Limited survey on aflatoxin contamination in rice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.010>
- Anklam, E., Berg, H., Mathiasson, L., Sharman, M., & Ulberth, F. (1998). Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review. *Food Additives & Contaminants. Food Additives & Contaminants*, 15(6), 729–750. <https://doi.org/10.1080/02652039809374703>

- Arcella, D., Gergelova, P., Innocenti, M. L., & Steinkellner, H. (2017). Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA Journal*, 15(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4972>
- Aristil, J., Venturini, G., Maddalena, G., Toffolatti, S. L., & Spada, A. (2020). Fungal contamination and aflatoxin content of maize, moringa and peanut foods from rural subsistence farms in South Haiti. *Journal of Stored Products Research*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.101550>
- Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España (AFHSE). (2015). *Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas*. <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
- Aupanun, S., Poapolathep, S., Giorgi, M., Imsilp, K., & Poapolathep, A. (2016). *An Overview of the Toxicology and Toxicokinetics of Fusarenon-X, a Type B Trichothecene Mycotoxin 4 Running head: Fusarenon-X, a Type B Trichothecene Mycotoxin*. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0008>
- Ayarragaray, J. E. F. (2014). Ergotism: A change of perspective. *Annals of Vascular Surgery*, 28(1), 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2013.02.005>
- Balan, B., Dhaulaniya, A. S., Kumar, M., Kumar, M., & Kumar, P. (2024). Aflatoxins in food: Prevalence, health effects, and emerging trends in its mitigation—An updated review. *Food Safety and Health*, 2(1), 39–71. <https://doi.org/10.1002/fsh3.12030>
- Ben Hassouna, K., Hamed, A. M., Salah-Abbès, J. Ben, Chaieb, K., Abbès, S., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2023). Mycotoxin Occurrence in Milk and Durum Wheat Samples from Tunisia Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Toxins*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/toxins15110633>
- Benkerroum, N. (2020). Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 423. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>

- Bennett, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 100, 3–5. <https://doi.org/10.1007/BF00769561>
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Berillo, D., & Ermukhambetova, A. (2024). The review of oral adsorbents and their properties. *Adsorption*. <https://doi.org/10.1007/s10450-024-00515-1>
- Bhat, P. V., Pandareesh, M. D., Khanum, F., & Tamatam, A. (2016). Cytotoxic effects of ochratoxin a in neuro-2a cells: Role of oxidative stress evidenced by N-acetylcysteine. *Frontiers in Microbiology*, 7(1142). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01142>
- Blesa, J., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Marín, R., & Mañes, J. (2003). Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1011(1–2), 49–54. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01102-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01102-6)
- Brandon, E. F. A., Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Versantvoort, C. H. M., Van Engelen, J. G. M., & Sips, A. J. A. M. (2006). Consumer product in vitro digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(2), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.10.002>
- Bryła, M., Wa'skiewicz, A., Ksieniewicz-Wo'zniak, E., Szymczyk, K., & Edrzejczak, R. J. (2018). Modified fusarium mycotoxins in cereals and their products—Metabolism, occurrence, and toxicity: An updated review. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040963>
- Büchi G, Foulkes DM, Kurono M, Mitchell GF, & Schneider RS. (1967). The total synthesis of racemic aflatoxin B1. . *Journal American Chemical Society*, 89(25), 6745–6753. <https://doi.org/10.1021/ja01001a062>
- Cajka, T., Hajslova, J., & Mastovska, K. (2009). Chapter 10: Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis. In S. Ötles (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments* (pp. 198–222).

- Calado, T., Venâncio, A., & Abrunhosa, L. (2014). Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1049–1061. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12095>
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Celano, R., Russo, M., & Rastrelli, L. (2013). Rapid analysis of aflatoxin M1 in milk using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(26), 8645–8652. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7277-3>
- Candlish, A. A. G., & Stimson, W. H. (1993). *Chromatography of Mycotoxins: Techniques and Applications* (V. Betina, Ed.; 1st ed., Vol. 54). Elsevier. <https://shop.elsevier.com/books/chromatography-of-mycotoxins/betina/978-0-444-81521-7>
- Carvajal, M. (2013). Aflatoxin B1 transformation in human adduct AFB1-ADN from foodstuff. *TIP*, 16(2), 109–120. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72082-5](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72082-5)
- Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinié, A., Sylla, A., & Pfohl-Leskowicz, A. (2006). Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(6), 480–487. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500264>
- Castells, M., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2008). Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.001>
- Cervini, C., Verheecke-Vaessen, C., Ferrara, M., García-Cela, E., Magistà, D., Medina, A., Gallo, A., Magan, N., & Perrone, G. (2021). Interacting climate change factors (CO2 and temperature cycles) effects on growth, secondary metabolite gene expression and phenotypic ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains on a grape-based matrix. *Fungal Biology*, 125(2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.001>

- Cheli, F., Giromini, C., & Baldi, A. (2015). Mycotoxin mechanisms of action and health impact: “In vitro” or “in vivo” tests, that is the question. *World Mycotoxin Journal*, 8(5), 573–589. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1864>
- Chen, X., F. Abdallah, M., Chen, X., & Rajkovic, A. (2023). Current Knowledge of Individual and Combined Toxicities of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 In Vitro. *Toxins*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/toxins15110653>
- Cheng, X., Vella, A., & Stasiewicz, M. J. (2019). Classification of aflatoxin contaminated single corn kernels by ultraviolet to near infrared spectroscopy. *Food Control*, 98, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.037>
- Choochuay, S., Phakam, J., Jala, P., Maneeboon, T., & Tansakul, N. (2018). Determination of aflatoxin B1 in feedstuffs without clean-up step by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4650764>
- Cole, R. J. (1986). Etiology of Turkey “X” disease in retrospect: A case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin Research*, 2(1), 3–7. <https://doi.org/10.1007/BF03191956>
- Cole, R. J., & Cox, R. H. (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-03073-6>
- Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos (CCCF). (2023). *Codex Alimentarius - Norma General para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos (CXS 193-1995) - Actualizada 2023*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/es/>
- Commission Directive 98/53/EC of 16 July 1998 Laying down the Sampling Methods and the Methods of Analysis for the Official Control of the Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs (1998). <http://data.europa.eu/eli/dir/1998/53/oj>
- Commission Regulation (EC) N° 401/2006 of 23 February 2006 Laying down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs (2006). <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/401/oj>

- Commission Regulation (EC) N° 466/2001 of 8 March 2001 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs (2001). <http://data.europa.eu/eli/reg/2001/466/oj>
- Commission Regulation (EC) N° 1525/98 of 16 July 1998 Amending Regulation (EC) N° 194/97 of 31 January 1997 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs, Pub. L. No. 1525/98 (1998). <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/1998/1525/oj>
- Commission Regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs, 5 (2006). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf
- Commission Regulation (EU) 2015/1940 of 28 October 2015 Amending Regulation (EC) N° 1881/2006 as Regards Maximum Levels of Ergot Sclerotia in Certain Unprocessed Cereals and the Provisions on Monitoring and Reporting, 10 (2015). <http://data.europa.eu/eli/reg/2015/1940/oj>
- Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on Maximum Levels for Certain Contaminants in Food and Repealing Regulation (EC) N° 1881/2006 (2023). <http://data.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>
- Dadzie, M. A., Oppong, A., Ofori, K., Eleblu, J. S., Ifie, E. B., Blay, E., Obeng –Bio, E., Appiah-Kubi, Z., & Warburton, M. L. (2019). Distribution of *Aspergillus flavus* and aflatoxin accumulation in stored maize grains across three agro-ecologies in Ghana. *Food Control*, 104, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.035>
- de Almeida, L., Williams, R., Soares, D. M., Nesbitt, H., Wright, G., & Erskine, W. (2019). Aflatoxin levels in maize and peanut and blood in women and children: The case of Timor-Leste. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49584-1>
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications* (3rd ed.). Wiley.
- De Saeger, S., & Van Egmond, H. (2012). Special issue: Masked mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 5(3), 203–206. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.x003>

- Dhanshetty, M., Elliott, C. T., & Banerjee, K. (2021). Decontamination of aflatoxin B1 in peanuts using various cooking methods. *Journal of Food Science and Technology*, 58(7), 2547–2554. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04761-3>
- Di Stefano, V., Pitonzo, R., & Avellone, G. (2014). Effect of Gamma Irradiation on Aflatoxins and Ochratoxin A Reduction in Almond Samples. *Journal of Food Research*, 3(4), 113. <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n4p113>
- Di Stefano, V., Pitonzo, R., Cicero, N., & D'Oca, M. C. (2014). Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(12), 2034–2039. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.968882>
- Díaz Nieto, C. H., Granero, A. M., Zon, M. A., & Fernández, H. (2018). Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.057>
- Ding, L., Han, M., Wang, X., & Guo, Y. (2023). Ochratoxin A: Overview of Prevention, Removal, and Detoxification Methods. *Toxins*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/toxins15090565>
- Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on Undesirable Substances in Animal Feed - Council Statement (2002). <http://data.europa.eu/eli/dir/2002/32/oj>
- Dixit, Y., Kanojiya, K., Bhingardev, N., Ahire, J. J., & Saroj, D. (2024). In Vitro Human Gastrointestinal Tract Simulation Systems: A Panoramic Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 16(2), 501–518. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10052-y>
- Do, T. H., Tran, S. C., Le, C. D., Nguyen, H. B. T., Le, P. T. T., Le, H. H. T., Le, T. D., & Thai-Nguyen, H. T. (2020). Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam. *Food Control*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107108>

- Dohnal, V., Wu, Q., & Kuča, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: Key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*, 88(9), 1635–1644. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1312-9>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2012a). Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 10(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2798>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2012b). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA Journal*, 10(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2605>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2013). Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA Journal*, 11(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3262>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2016). Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal*, 14(4). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2016.4425>
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., & Manyes, L. (2017). Alternaria Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1569748>
- Essigmann JM, D. P. S. D. W. G. B. H. (1980). Use of the isolated perfused rat liver to study carcinogen-DNA adduct formation from aflatoxin B1 and sterigmatocystin. *Cancer Research*, 40(11), 4085–4091.
- FAO. (2004). FAO, Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. In *FAO Food and Nutrition Paper no. 81, Food and Agriculture Organization, Rome* (Vol. 81). <https://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>

- Flajs, D., & Peraica, M. (2009). Toxicological properties of citrinin. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 60(4), 457–464. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1992>
- Forgacs, J. , and W. T. C. (1962). Mycotoxicoses . *Adv. Vet. Sci.*, 7, 273–382.
- Frisvad, J. C. (2018). A critical review of producers of small lactone mycotoxins: Patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 73–100. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294>
- Gachara, G. W., Nyamache, A. K., Harvey, J., Gnonlonfin, G. J. B., & Wainaina, J. (2018). Genetic diversity of *Aspergillus flavus* and occurrence of aflatoxin contamination in stored maize across three agro-ecological zones in Kenya. *Agriculture and Food Security*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40066-018-0202-4>
- Garcia, M., Blanco, J. L., & Suarez, G. (1994). Aflatoxins B1 and G1 solubility in standard solutions and stability during cold storage. *Mycotoxin Research*, 10, 97–100. <https://doi.org/10.1007/BF03192258>
- García-Ruiz, C., & Marina, M. L. (2009). Chapter 18: Capillary Electrophoresis in Food Analysis. In S. Ötles (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments* (pp. 403–420).
- Garner, R. C., Whattam, M. M., Taylor, P. J. L., & Stow, M. W. (1993). Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *Journal of Chromatography*, 648, 485–490. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80433-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80433-9)
- Garvey, G. S., & Keller, N. P. (2010). Fungal secondary metabolites and their fundamental roles in human mycoses. *Current Fungal Infection Reports*, 4(4), 256–265. <https://doi.org/10.1007/s12281-010-0032-8>
- Getachew, A., Chala, A., Hofgaard, I. S., Brurberg, M. B., Sulyok, M., & Tronsmo, A. M. (2018). Multimycotoxin and fungal analysis of maize grains from south and southwestern Ethiopia. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 11(1), 64–74. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1408698>

- Gil-Serna, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2020). Mycotoxins in functional beverages: A review. *Beverages*, 6(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/beverages6030052>
- González-Arias, C. A., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2013). Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: A review. *World Mycotoxin Journal*, 6(2), 167–184. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1521>
- Han, X., Huangfu, B., Xu, T., Xu, W., Asakiya, C., He, X., & Huang, K. (2022). Research Progress of Safety of Zearalenone: A Review. *Toxins*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/toxins14060386>
- Hanvi, D. M., Lawson-Evi, P., De Boevre, M., Goto, C. E., De Saeger, S., & Eklugadegbeku, K. (2019). Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo. *Mycotoxin Research*, 35(4), 321–327. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00351-1>
- Hariprasad, P., Vipin, A. V., Karuna, S., Raksha, R. K., & Venkateswaran, G. (2015). Natural aflatoxin uptake by sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and its persistence in jaggery. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(8), 6246–6253. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3851-2>
- Hassan, Z. U., Al-Thani, R. F., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2018). Detection of toxigenic mycobiota and mycotoxins in cereal feed market. *Food Control*, 84, 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.032>
- Hathout, A. S., Abel-Fattah, S. M., Abou-Sree, Y. H., & Fouzy, A. S. M. (2020). Incidence and exposure assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Egyptian wheat. *Toxicology Reports*, 7, 867–873. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.003>
- Hellany, H., Assaf, J. C., El-Badan, D., & Khalil, M. (2023). Quantification, Prevalence, and Pretreatment Methods of Mycotoxins in Groundnuts and Tree Nuts: An Update. *Processes*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/pr11123428>
- International Agency Research on Cancer (IARC). (2012). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In *IARC Monographs* (Vol. 100F, pp. 225–249).

- Iqbal, S. Z., Mehmood, Z., Asi, M. R., Shahid, M., Sehar, M., & Malik, N. (2018). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in nuts, dry fruits, and nuty products. *Journal of Food Safety*, 38(4). <https://doi.org/10.1111/jfs.12462>
- Jalili, M. (2015). A Review on Aflatoxins Reduction in Food. *Iranian Journal of Health, Safety & Environment*, 3(1), 445–459.
- Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z., & Li, P. (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2332–2381. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12734>
- Janzen, D. (1977). Why Fruits Rot, Seeds Mold, and Meat Spoils. *The American Naturalist*, 111(980), 691–713. <https://doi.org/10.1086/283200>
- Jastrzębski, M. K., Kaczor, A. A., & Wróbel, T. M. (2022). Methods of Lysergic Acid Synthesis—The Key Ergot Alkaloid. *Molecules*, 27(21). <https://doi.org/10.3390/molecules27217322>
- Je, W. P., & Kim, Y. B. (2006). Effect of pressure cooking on aflatoxin B1 in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2431–2435. <https://doi.org/10.1021/jf053007e>
- Jeong, S. E., Chung, S. H., & Hong, S. Y. (2019). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in meju and soybean paste produced in South Korea. *Applied Biological Chemistry*, 62(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0472-y>
- Ji, C., Fan, Y., & Zhao, L. (2016). Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition*, 2(3), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.07.003>
- Jouany, J. P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4), 342–362. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.009>
- Joubrane, K., Mnayer, D., El Khoury, A., El Khoury, A., & Awad, E. (2020). Co-occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A in lebanese stored wheat. *Journal of Food Protection*, 83(9), 154–1552. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-110>
- Juan, C., Mañes, J., Juan-García, A., & Moltó, J. C. (2022). Multimycotoxin Analysis in Oat, Rice, Almond and Soy Beverages by Liquid Chromatography-

- Tandem Mass Spectrometry. *Applied Sciences*, 12(8), 3942.
<https://doi.org/10.3390/app12083942>
- Jubeen, F., Sher, F., Hazafa, A., Zafar, F., Ameen, M., & Rasheed, T. (2020). Evaluation and detoxification of aflatoxins in ground and tree nuts using food grade organic acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101749>
- Kabak, B. (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 549–554.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>
- Kanik, T., & Kabak, B. (2019). Aflatoxins in almonds: Monitoring and exposure assessment. *Journal of Food Safety*, 39(4). <https://doi.org/10.1111/jfs.12646>
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32(4), 179–205.
<https://doi.org/10.1007/s12550-016-0257-7>
- Khaneghah, A. M., Martins, L. M., von Hertwig, A. M., Bertoldo, R., & Sant'Ana, A. S. (2018). Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 13–24.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.012>
- Khodaei, D., Javanmardi, F., & Khaneghah, A. M. (2021). The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: a three-year survey. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 39, pp. 36–42). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.012>
- Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A. C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., ... Edler, L. (2017). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its

- acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal*, 15(9).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
- Knutsen, H. K., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Nebbia, C. S., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A. C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., ... Alexander, J. (2018). Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *EFSA Journal*, 16(2).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5172>
- Kok, W., Van Neer, C. H., Traag, W. A., & Tuinstra, L. G. M. (1986). Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine. *Journal of Chromatography*, 367, 23–236. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)94838-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)94838-6)
- Kolawole, O., Meneely, J., Petchkongkaew, A., & Elliott, C. (2021). A review of mycotoxin biosynthetic pathways: associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. *Fungal Biology Reviews* , 37, 8–26.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.04.003>
- Korley Kortei, N., Akomeah Agyekum, A., Akuamoah, F., Baffour, V. K., & Wiisibie Alidu, H. (2019). Risk assessment and exposure to levels of naturally occurring aflatoxins in some packaged cereals and cereal based foods consumed in Accra, Ghana. *Toxicology Reports*, 6, 34–41.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.11.012>
- Kos, J., Janić Hajnal, E., Malachová, A., Steiner, D., Stranska, M., Krska, R., Poschmaier, B., & Sulyok, M. (2020). Mycotoxins in maize harvested in Republic of Serbia in the period 2012–2015. Part 1: Regulated mycotoxins and its derivatives. *Food Chemistry*, 312.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126034>
- Kujawski M, M. C. S. J. (2014). *Report on the 2014 Proficiency Test of the European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, for the Network of National*

- Reference Laboratories - Determination of Aflatoxin B1 in Copra (Coconut powder)*. <https://doi.org/10.2787/98787>
- Kujbida, P., Maia, P. P., de Araújo, A. N., Mendes, L. D., de Oliveira, M. L., Silva-Rocha, W. P., de Brito, G. Q., Chaves, G. M., & Martins, I. (2019). Risk assessment of the occurrence of aflatoxin and fungi in peanuts and cashew nuts. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000118135>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2170–2180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Kumari, A., & Tirkey, N. N. (2019). Recent trends in human and animal mycology. In Karuna Singh & Neelabh Srivastava (Eds.), *Recent Trends in Human and Animal Mycology* (pp. 203–211). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9435-5>
- Lahouar, A., Jedidi, I., Sanchis, V., & Saïd, S. (2018). Aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in sorghum grains marketed in Tunisia. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 11(2), 103–110. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1433239>
- Lavkor, I., Var, I., Saglam, S., Uckun, O., Tekin, A., & Savas, O. (2019). Presence of some mycotoxins in peanuts from harvest to storage. *Legume Research*, 42(6), 862–866. <https://doi.org/10.18805/LR-446>
- Lee, J., Her, J. Y., & Lee, K. G. (2015). Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food Chemistry*, 189, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.013>
- Leong, Y. H., Ismail, N., Latiff, A. A., Manaf, N. A., & Rosma, A. (2011). Determination of aflatoxins in commercial nuts and nut products using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin Journal*, 4(2), 119–127. <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1229>
- Li, N., Zhao, J., Zhang, R., Deng, L., Li, J., Gao, Y., & Liu, C. (2018). Effect of Tebuconazole Enantiomers and Environmental Factors on Fumonisin

- Accumulation and FUM Gene Expression in *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(50), 13107–13115. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04900>
- Lijalem, Y. G., Gab-Allah, M. A., Yu, H., Choi, K., & Kim, B. (2024). Development of isotope dilution-ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the accurate determination of aflatoxins in grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105896>
- Liverpool-Tasie, L. S. O., Turna, N. S., Ademola, O., Obadina, A., & Wu, F. (2019). The occurrence and co-occurrence of aflatoxin and fumonisin along the maize value chain in southwest Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.008>
- Loi, M., Paciolla, C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2020). Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00243>
- Lucci, P., Pacetti, D., Nunez, O., & G., N. (2012). Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. In L. de Azevedo Calderon (Ed.), *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/47736>
- Ma, R., Zhang, L., Liu, M., Su, Y. T., Xie, W. M., Zhang, N. Y., Dai, J. F., Wang, Y., Rajput, S. A., Qi, D. S., Karrow, N. A., & Sun, L. H. (2018). Individual and combined occurrence of mycotoxins in feed ingredients and complete feeds in china. *Toxins*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/toxins10030113>
- Mahato, D. K., Pandhi, S., Kamle, M., Gupta, A., Sharma, B., Panda, B. K., Srivastava, S., Kumar, M., Selvakumar, R., Pandey, A. K., Suthar, P., Arora, S., Kumar, A., Gamlath, S., Bharti, A., & Kumar, P. (2022). Trichothecenes in food and feed: Occurrence, impact on human health and their detection and management strategies. *Toxicon*, 208, 62–77. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.01.011>
- Majeed, S., De Boevre, M., De Saeger, S., Rauf, W., Tawab, A., Fazal-e-Habib, Rahman, M., & Iqbal, M. (2018). Multiple mycotoxins in rice: Occurrence and

- health risk assessment in children and adults of Punjab, Pakistan. *Toxins*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/toxins10020077>
- Majerus, P., Kapp, K., Zimmermann, C., & Weber, R. (2002). *Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU member states*.
- Malachová, A., Stránská, M., Václavíková, M., Elliott, C. T., Black, C., Meneely, J., Hajšlová, J., Ezekiel, C. N., Schuhmacher, R., & Krska, R. (2018). Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(3), 801–825. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0750-7>
- Manizan, A. L., Oplatowska-Stachowiak, M., Piro-Metayer, I., Campbell, K., Koffi-Nevry, R., Elliott, C., Akaki, D., Montet, D., & Brabet, C. (2018). Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*, 87, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.032>
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, 10(6), 214–233. <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., & Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- McCullum, C., Tchounwou, P., Ding, L. S., Liao, X., & Liu, Y. M. (2014). Extraction of aflatoxins from liquid foodstuff samples with polydopamine-coated superparamagnetic nanoparticles for HPLC-MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4261–4267. <https://doi.org/10.1021/jf501659m>
- Méndez-Albores, A., Arámbula-Villa, G., Loarca-Piña, M. G. F., Castaño-Tostado, E., & Moreno-Martínez, E. (2005). Safety and efficacy evaluation of aqueous

- citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.09.009>
- Méndez-Albores, J. A., Villa, G. A., Del Rio-García, J. C., & Martínez, E. M. (2004). Aflatoxin-detoxification achieved with Mexican traditional nixtamalization process (MTNP) is reversible. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1611–1614. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1853>
- Mézes, M., Balogh, K., & Tóth, K. (2010). Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins - A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58(1), 1–17. <https://doi.org/10.1556/AVet.58.2010.1.1>
- Miller, J. D. (2016). *Fungal Biology* (pp. 469–493). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6>
- Moerck*, K. E., Mcelfreshl, P., Wohlman, A., & Hilton, B. W. (1980). Aflatoxin Destruction in Corn Using Sodium Bisulfite, Sodium Hydroxide and Aqueous Ammonia. *Journal Of Food Protection*, 43(7), 571–574. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.7.571>
- Moretti, A., Susca, A., Mulé, G., Logrieco, A. F., & Proctor, R. H. (2013). Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.033>
- Morrison, D. M., Ledoux, D. R., Chester, L. F. B., & Samuels, C. A. N. (2019). Occurrence of aflatoxins in rice and in cassava (*Manihot esculenta*) products (meal, bread) produced in Guyana. *Mycotoxin Research*, 35(1), 75–81. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0332-3>
- Mousavi Khaneghah, A., Kamani, M. H., Fakhri, Y., Coppa, C. F. S. C., de Oliveira, C. A. F., & Sant’Ana, A. S. (2019). Changes in masked forms of deoxynivalenol and their co-occurrence with culmorin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis. *Food Chemistry*, 294, 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.034>
- Nabwire, W. R., Ombaka, J., Dick, C. P., Strickland, C., Tang, L., Xue, K. S., & Wang, J. S. (2020). Aflatoxin in household maize for human consumption in

- Kenya, East Africa. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 13(1), 45–51. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1690053>
- Nazareth, T. de M., Soriano Pérez, E., Luz, C., Meca, G., & Quiles, J. M. (2024). Comprehensive Review of Aflatoxin and Ochratoxin A Dynamics: Emergence, Toxicological Impact, and Advanced Control Strategies. *Foods*, 13(12), 1920. <https://doi.org/10.3390/foods13121920>
- Nguyen, V. T. T., König, S., Eggert, S., Endres, K., & Kins, S. (2022). The role of mycotoxins in neurodegenerative diseases: Current state of the art and future perspectives of research. *Biological Chemistry*, 403(1), 3–26. <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0214>
- Nguyen, X. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, V. H., Tran, K. N., Lindahl, J., Grace Randolph, D., Ha, T. M., & Lee, H. S. (2018). Assessment of aflatoxin B 1 in maize and awareness of aflatoxins in Son La, Vietnam. *Infection Ecology and Epidemiology*, 8(1). <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1553464>
- Niaz, K., Shah, S. Z. A., Khan, F., & Bule, M. (2020). Ochratoxin A–induced genotoxic and epigenetic mechanisms lead to Alzheimer disease: its modulation with strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(36), 44673–44700. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08991-y>
- Niyibituronsa, M., Onyango, A. N., Gaidashova, S., Imathiu, S. M., Uwizerwa, M., Wanjuki, I., Nganga, F., Muhutu, J. C., Birungi, J., Ghimire, S., Raes, K., De Boevre, M., De Saeger, S., & Harvey, J. (2018). Evaluation of mycotoxin content in soybean (*Glycine max* L.) grown in Rwanda. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 18(3), 13808–13824. <https://doi.org/10.18697/AJFAND.83.17710>
- Nomura, M., Aoyama, K., & Ishibashi, T. (2018). Sterigmatocystin and aflatoxin B1 contamination of corn, soybean meal, and formula feed in Japan. *Mycotoxin Research*, 34(1), 21–27. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0295-9>
- Nonaka, Y., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S., & Kataoka, H. (2009). Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry.

- Journal of Chromatography A*, 1216(20), 4416–4422.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.035>
- Obafemi, B. A., Adedara, I. A., & Rocha, J. B. T. (2023). Neurotoxicity of ochratoxin A: Molecular mechanisms and neurotherapeutic strategies. *Toxicology*, 497–498. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153630>
- O'Brien, J., & Wright, G. D. (2011). An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(4), 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.010>
- Onyedum, S. C., Adefolalu, F. S., Muhammad, H. L., Apeh, D. O., Agada, M. S., Imienwanrin, M. R., & Makun, H. A. (2020). Occurrence of major mycotoxins and their dietary exposure in North-Central Nigeria staples. *Scientific African*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00188>
- Ostry, V. (2008). Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 175–188. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x013>
- Ostry, V., Toman, J., Grosse, Y., & Malir, F. (2018). Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 135–148. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2243>
- Ötles, S., & Kartal, C. (2016). Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 15(1), 5–15. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.1>
- Owolabi, I. O., Karoonuthaisiri, N., Elliott, C. T., & Petchkongkaew, A. (2023). A 10-year analysis of RASFF notifications for mycotoxins in nuts. Trend in key mycotoxins and impacted countries. *Food Research International*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112915>
- Park, D. L. (2002). Effect of Processing on Aflatoxin. In *Mycotoxins and Food Safety. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 504, pp. 173–179). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0629-4_17
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A. M., Silva, C., Medina, S., & Câmara, J. S. (2019). QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements,

- applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1–28.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>
- Pfeiffer, E., Fleck, S. C., & Metzler, M. (2014). Catechol formation: A novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chemical Research in Toxicology*, 27(12), 2093–2099.
<https://doi.org/10.1021/tx500308k>
- Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Györi, Z., & Pusztahelyi, T. (2020). The Aspergilli and Their Mycotoxins: Metabolic Interactions With Plants and the Soil Biota. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02921>
- Pitt, J. I., & David Miller, J. (2017). A Concise History of Mycotoxin Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7021–7033.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04494>
- Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2016). Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 77, 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010>
- Pohland, A. E. (1993). Mycotoxins in review. *Food Additives and Contaminants*, 10(1), 17–28. <https://doi.org/10.1080/02652039309374126>
- Ponce Giomo, P., Hennig Neuenfeldt, N., De Campos Braga, P. P., Pavesi A. Bragotto, P., & De Oliveira Rocha, L. (2024). Assessment of mycotoxin contamination in cereal-based baby foods destined for infant consumption in Brazil. *Food Control*, 164(110561).
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110561>
- Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 362–373. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00605-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00605-8)
- Proctor, A. D., Ahmedna, M., Kumar, J. V., & Goktepe, I. (2004). Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants*, 21(8), 786–793.
<https://doi.org/10.1080/02652030410001713898>

- Quigley, A., Cummins, W., & Connolly, D. (2016). Dispersive liquid-liquid microextraction in the analysis of milk and dairy products: A review. *Journal of Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4040165>
- Qureshi, H., Hamid, S. S., Ali, S. S., Anwar, J., Siddiqui, A. A., & Khan, N. A. (2015). Cytotoxic effects of aflatoxin B1 on human brain microvascular endothelial cells of the blood-brain barrier. *Medical Mycology*, 53(4), 409–416. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv010>
- Rahayu, W. P., Herawati, D., Broto, W., Indrotristanto, N., Ambarwati, S., & Adhi, W. (2020). Risk estimation of hepatocellular carcinoma due to exposure to aflatoxins in maize from yogyakarta, Indonesia. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 7(1), 45–50. <https://doi.org/10.18502/JFQHC.7.1.2451>
- Rapid Alert System Feed and Food. (n.d.). *webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search*. Retrieved September 5, 2024, from <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>
- Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T., Phipps, R. K., Christensen, K. B., Jensen, P. O., Andersen, J. B., Koch, B., Larsen, T. O., Hentzer, M., Eberl, L., Hoiby, N., & Givskov, M. (2005). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*, 151(5), 1325–1340. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27715-0>
- Rebellato, A. P., dos Santos Caramês, E. T., Pallone, J. A. L., & de Oliveira Rocha, L. (2021). Mycotoxin bioaccessibility in baby food through in vitro digestion: an overview focusing on risk assessment. *Current Opinion in Food Science*, 41, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.010>
- Reiter, E., Zentek, J., & Razzazi, E. (2009). Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(4), 508–524. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800145>
- Ren, X., Zhang, Q., Zhang, W., Mao, J., & Li, P. (2020). Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. *Toxins*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/toxins12010024>

- Renaud, J. B., Miller, J. D., & Sumarah, M. W. (2019). Mycotoxin testing paradigm: Challenges and opportunities for the future. *Journal of AOAC International*, *102*(6), 1681–1688. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0046>
- Rezaeefar, A., Nemati, M., Farajzadeh, M. A., Afshar Mogaddam, M. R., & Lotfipour, F. (2022). Development of N and S doped carbon sorbent-based dispersive micro solid phase extraction method combined with dispersive liquid-liquid microextraction for selected mycotoxins from soymilk samples. *Microchemical Journal*, *173*. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107039>
- Ridgway, K., Sam P.D. Lalljie, S. P. D., & Roger M. Smith, R. M. (2008). Microextraction Methods in Food Analysis. In *Handbook of Food Analysis Instruments* (pp. 7–20). <https://doi.org/10.1201/9781420045673>
- Rocha, A. R., Cardoso, M. S., Souza Júnior, J. A., Gomes Júnior, E. A., Maciel, L. F., & Menezes-Filho, J. A. (2023). Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation. *Food Control*, *145*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109348>
- Rodríguez-Cañás, I., González-Jartín, J. M., Alfonso, A., Alvariño, R., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2024). Application of a multi-toxin detect method to analyze mycotoxins occurrence in plant-based beverages. *Food Chemistry*, *434*(137427). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137427>
- Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., & Buszewski, B. (2019). Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicon*, *162*, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>
- Rohlfs, M., Albert, M., Keller, N. P., & Kempken, F. (2007). Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biology Letters*, *3*(5), 523–525. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0338>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2016). Effect of dietary acids on the formation of aflatoxin B2a as a means to detoxify aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *33*(9), 1456–1467. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1217065>

- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Rustom, I. Y. S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, *59*(1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00096-9)
- Rychlik, M., & Asam, S. (2008). Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *390*(2), 617–628. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1717-x>
- Rychlik, M., Humpf, H. U., Marko, D., Dänicke, S., Mally, A., Berthiller, F., Klaffke, H., & Lorenz, N. (2014). Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research*, *30*(4), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0203-5>
- Safara, M., Zaini, F., Hashemi, S. J., Mahmoudi, M., Khosravi, A. R., & Shojai-Aliabadi, F. (2010). Aflatoxin Detoxification in Rice using Citric Acid. *Iranian J Publ Health*, *39*(2), 24–29.
- Santini, A., Meca, G., Uhlig, S., & Ritieni, A. (2012). Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: Occurrence in food-A review. *World Mycotoxin Journal*, *5*(1), 71–81. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1331>
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., & Sánchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *NeuroToxicology*, *27*(1), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.07.004>
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, *3*(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Savi, G. D., Piacentini, K. C., Rocha, L. O., Carnielli-Queiroz, L., Furtado, B. G., Scussel, R., Zanoni, E. T., Machado-de-Ávila, R. A., Corrêa, B., & Angioletto, E. (2018). Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from

- Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 270, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.004>
- Scharf, D. H., Brakhage, A. A., & Mukherjee, P. K. (2016). Gliotoxin - bane or boon? *Environmental Microbiology*, 18(4), 1096–1109. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13080>
- Schiff, P. L. (2006). TEACHERS' TOPICS Ergot and Its Alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 70(5). <https://doi.org/10.5688/aj700598>
- Schlüter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., Engel, K. H., Holzhauser, T., Knorr, D., & Eisenbrand, G. (2013). Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 920–927. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300039>
- Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Marko, D., Oswald, I. P., Piersma, A., ... Wallace, H. (2020). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>
- Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Wallace, H., Alexander, J., Dall'Asta, C., Mally, A., ... Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 18(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>
- Scott, P. (1996). Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food Additives Contaminants*, 13.
- Scott, P. M. (1993). Recent developments in methods of analysis for mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 12(9), 382–386. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(93\)87028-V](https://doi.org/10.1016/0165-9936(93)87028-V)
- Scott, P. M., Banting, F. G., & Trucksess, M. W. (1997). Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 80(5), 941–949. <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.5.941>

- Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, 4, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>
- Shi, H., Schwab, W., & Yu, P. (2019). Natural occurrence and co-contamination of twelve mycotoxins in industry-submitted cool-season cereal grains grown under a low heat unit climate condition. *Toxins*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/toxins11030160>
- Skendi, A., Papageorgiou, M., Irakli, M., & Katsantonis, D. (2020). Presence of mycotoxins, heavy metals and nitrate residues in organic commercial cereal-based foods sold in the Greek market. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 15(2), 109–119. <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01231-7>
- Spanjer, M. C., Scholten, J. M., Kastrup, S., Jörissen, U., Schatzki, T. F., & Toyofuku, N. (2006). Sample comminution for mycotoxin analysis: Dry milling or slurry mixing? *Food Additives and Contaminants*, 23(1), 73–83. <https://doi.org/10.1080/02652030500260439>
- Ssepuyya, G., Van Poucke, C., Ediage, E. N., Mulholland, C., Tritscher, A., Verger, P., Kenny, M., Bessy, C., & De Saeger, S. (2018). Mycotoxin contamination of sorghum and its contribution to human dietary exposure in four sub-Saharan countries. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35(7), 1384–1393. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1461253>
- Sserumaga, J. P., Ortega-Beltran, A., Wagacha, J. M., Mutegi, C. K., & Bandyopadhyay, R. (2020). Aflatoxin-producing fungi associated with pre-harvest maize contamination in Uganda. *International Journal of Food Microbiology*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108376>
- Sserumaga, J. P., Wagacha, J. M., Biruma, M., & Mutegi, C. K. (2021). Contamination of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Aspergillus* section *Flavi* communities and aflatoxin at the post-harvest stage. *Food Control*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108150>

- Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., & Alder, L. (2012). Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Analytical Chemistry*, *84*(3), 1474–1482. <https://doi.org/10.1021/ac202661j>
- Stiborová, M., Arlt, V. M., & Schmeiser, H. H. (2016). Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Archives of Toxicology*, *90*(11), 2595–2615. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1819-3>
- Suleiman, M., Omotayo, D., Atanu, F., Apeh, D., Jegede, R., & Fatima Sule, F. (2021). Assessment of Total Aflatoxin Contamination of Varieties of *Oryza sativa* and *Phaseolus vulgaris* in Anyigba Metropolis, Kogi State Nigeria. *Chemistry Research Journal*, *6*(2), 113–118.
- Sulyok, M., Stadler, D., Steiner, D., & Krska, R. (2020). Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *412*(11), 2607–2620. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02489-9>
- Tahir, N. I., Hussain, S., Javed, M., Rehman, H., Shahzady, T. G., Parveen, B., & Ali, K. G. (2018). Nature of aflatoxins: Their extraction, analysis, and control. *Journal of Food Safety*, *38*(6), 1–7. <https://doi.org/10.1111/jfs.12561>
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., & Yuan, Z. (2018). Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, *112*, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
- Taylor, S. L., King, J. W., Richard, J. L., & Greer, J. I. (1993). Analytical-scale supercritical fluid extraction of aflatoxin B1 from field-inoculated corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(6), 910–913. <https://doi.org/10.1021/jf00030a014>
- Tebele, S. M., Gbashi, S., Adebo, O., Changwa, R., Naidu, K., & Njobeh, P. B. (2020). Quantification of multi-mycotoxin in cereals (maize, maize porridge, sorghum and wheat) from Limpopo province of South Africa. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk*

- Assessment*, 37(11), 1922–1938.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1808715>
- Tian, F., & Chun, H. S. (2017). Natural Products for Preventing and Controlling Aflatoxin Contamination of Food. In *Aflatoxin-Control, Analysis, Detection and Health Risks* (pp. 13–44). InTech.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.68413>
- Tittlemier, S. A., Cramer, B., Dall’Asta, C., Iha, M. H., Lattanzio, V. M. T., Maragos, C., Solfrizzo, M., Stranska, M., Stroka, J., & Sumarah, M. (2020). Developments in mycotoxin analysis: An update for 2018-19. *World Mycotoxin Journal*, 13(1), 3–24. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2535>
- Toba Samuel, A., & Valentine, T. (2014). Effect of total aflatoxin on the growth characteristics and chlorophyll level of sesame (*Sesamum indicum* L.). *New York Science Journal*, 7(4). <http://www.sciencepub.net/newyork8>
- Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004). Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x>
- Toyoda, M., Saisho, K., Aoki, G., Kobayashi, A., Saito, Y., & Martinez, M. U. (1994). Short Communication Repeated Use of a Single Immunoaffinity Column for Sample Clean-up in the HPLC Determination of Aflatoxin M1 in Powdered Milk. *Int. Dairy Journal*, 4, 369–375. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)90032-9)
- Traag, W. A., van Trijp, J. M. P., Tuinstra, L. G. M. T., & Kok, W. T. (1987). Sample clean-up and post-column derivatization for the determination of aflatoxin B1 in feedstuffs by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 396(C), 389–394. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94080-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94080-4)
- Tran, V. N., Viktorová, J., & Ruml, T. (2020). Mycotoxins: Biotransformation and bioavailability assessment using caco-2 cell monolayer. *Toxins*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/toxins12100628>
- Trucksess, M. W., & Pohland, A. E. (2002). Methods and Method Evaluation for Mycotoxins. *Molecular Biotechnology*, 22, 287–292. <https://doi.org/10.1385/MB:22:3:287>

- Trucksess M, Weaver C, Oles C, D'Ovidio K, & Rader J. (2006). Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *JAOAC Int.*, 89(3), 624–630.
- Turksoy, S., & Kabak, B. (2020). Determination of aflatoxins and ochratoxin A in wheat from different regions of Turkey by HPLC with fluorescence detection. *Acta Alimentaria*, 49(1), 118–124. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.1.15>
- Udomkun, P., Mutegi, C., Wossen, T., Atehnkeng, J., Nabahunu, N. L., Njukwe, E., Vanlauwe, B., & Bandyopadhyay, R. (2018). Occurrence of aflatoxin in agricultural produce from local markets in Burundi and Eastern Democratic Republic of Congo. *Food Science and Nutrition*, 6(8), 2227–2238. <https://doi.org/10.1002/fsn3.787>
- URAGUCHI, K. , Y. M. ,. (1978). *Toxicology, Biochemistry and Pathology of Mycotoxins* (Y. Ueno (New York: John Wiley & Sons), Ed.).
- Vaclavikova, M., Macmahon, S., Zhang, K., & Begley, T. H. (2013). Application of single immunoaffinity clean-up for simultaneous determination of regulated mycotoxins in cereals and nuts. *Talanta*, 117, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.007>
- Varelis, P. (2009). Chapter 6: Advances in High Performance Liquid Chromatography and Its Application to the Analysis of Foods and Beverages. In *Handbook of Food Analysis Instruments* (Otles, Semih, pp. 105–115).
- Varga, J., Kocinfé, S., Péteri, Z., Vágvölgyi, C., & Tóth, B. (2010). Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. *Toxins*, 2(7), 1718–1750. <https://doi.org/10.3390/toxins2071718>
- Verheecke, C., Liboz, T., Anson, P., Zhu, Y., & Mathieu, F. (2015). Streptomyces–Aspergillus flavus interactions: impact on aflatoxin B accumulation. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(4), 572–576. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1003336>

- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van De Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>
- Veršilovskis, A., & de Saeger, S. (2010). Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(1), 136–147. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900345>
- Vidal, A., Ouhibi, S., Ghali, R., Hedhili, A., De Saeger, S., & De Boevre, M. (2019). The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>
- Vincent, D., Rafiqi, M., & Job, D. (2020). The Multiple Facets of Plant–Fungal Interactions Revealed Through Plant and Fungal Secretomics. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01626>
- Wall-Martínez, H. A., Ramírez-Martínez, A., Wesolek, N., Brabet, C., Durand, N., Rodríguez-Jimenes, G. C., García-Alvarado, M. A., Salgado-Cervantes, M. A., Robles-Olvera, V. J., & Roudot, A. C. (2019). Risk assessment of exposure to mycotoxins (aflatoxins and fumonisins) through corn tortilla intake in Veracruz City (Mexico). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 36(6), 929–939. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1588997>
- Wang, J., Sufar, E. K., Bernhoft, A., Seal, C., Rempelos, L., Hasanaliyeva, G., Zhao, B., Iversen, P. O., Baranski, M., Volakakis, N., & Leifert, C. (2024). Mycotoxin contamination in organic and conventional cereal grain and products: A systematic literature review and meta-analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(3). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13363>
- Wang, Y., Nie, J., Yan, Z., Li, Z., Cheng, Y., & Chang, W. (2018). Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in nuts and dried fruits from China. *Food Control*, 88, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.013>

- Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Hernandez Nopsa, J., Bockus, W. W., & Hallen-Adams, H. (2015). Management of Fusarium head blight of wheat and barley. *Crop Protection*, 73, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.025>
- Whitaker, T. B. (2006). Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 23(1), 50–61. <https://doi.org/10.1080/02652030500241587>
- Wielogorska, E., Mooney, M., Eskola, M., Ezekiel, C. N., Stranska, M., Krska, R., & Elliott, C. (2019). Occurrence and Human-Health Impacts of Mycotoxins in Somalia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(7), 2052–2060. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05141>
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions 1-3. *Am J Clin Nutr*, 80, 1106–1128. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>
- WOGAN, G. N., & PAGLIALUNG, S. (1974). Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M1 in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 12, 381–384. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(74\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0015-6264(74)90012-1)
- Xia, L., Routledge, M. N., Rasheed, H., Ismail, A., Dong, Y., Jiang, T., & Gong, Y. Y. (2020). Biomonitoring of Aflatoxin B1 and Deoxynivalenol in a Rural Pakistan Population Using Ultra-Sensitive LC-MS/MS Method. *Toxins*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/toxins12090591>
- Xu, B. J., Jia, X. Q., Gu, L. J., & Sung, C. K. (2006). Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 17(4), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.012>
- Yunes, N. B. S., Oliveira, R. C., Reis, T. A., Baquião, A. C., Rocha, L. O., & Correa, B. (2020). Effect of temperature on growth, gene expression, and aflatoxin production by *Aspergillus nomius* isolated from Brazil nuts. *Mycotoxin Research*, 36(2), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00380-w>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K. M., & Chandra Nayak, S. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182–207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>

- Zhang, K., & Banerjee, K. (2020). A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. *Toxins*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/toxins12090539>
- Zhao, W., Ma, X., Yan, H., Zhang, L., Shi, W., & Zhou, Y. (2024). Aspergillus flavus and aflatoxins control in long-term storage of food ingredients of Puerh tea, peanut and polished rice. *Food Chemistry*, 461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140805>
- Zhao, Y., Wang, Q., Huang, J., Chen, Z., Liu, S., Wang, X., & Wang, F. (2019). Mycotoxin contamination and presence of mycobiota in rice sold for human consumption in China. *Food Control*, 98, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.014>
- Zhao, Y., Wang, Q., Huang, J., Ma, L., Chen, Z., & Wang, F. (2018). Aflatoxin B1 and sterigmatocystin in wheat and wheat products from supermarkets in China. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 11(1), 9–14. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1388295>
- Zheng, H., Wei, S., Xu, Y., & Fan, M. (2015). Reduction of aflatoxin B1 in peanut meal by extrusion cooking. *LWT*, 64(2), 515–519. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.045>
- Zingales, V., Fernández-Franzón, M., & Ruiz, M. J. (2020a). Sterigmatocystin: Occurrence, toxicity and molecular mechanisms of action – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111802>
- Zingales, V., Fernández-Franzón, M., & Ruiz, M. J. (2020b). Sterigmatocystin-induced cytotoxicity via oxidative stress induction in human neuroblastoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110956>
- Zingales, V., Fernández-Franzón, M., & Ruiz, M. J. (2020c). The role of mitochondria in sterigmatocystin-induced apoptosis on SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111493>

VI. OBJETIVOS

VI. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar la exposición humana a micotoxinas de relevancia toxicológica mediante la aplicación de tres enfoques diferentes: 1) Exposición alimentaria; 2) Bioaccesibilidad; y 3) Neurotoxicidad. Los dos primeros enfoques se han centrado en el estudio de las aflatoxinas B y G debido a su elevada toxicidad y su carcinogenicidad, en comparación al resto de micotoxinas, mientras que el estudio de la neurotoxicidad se ha ampliado a otras micotoxinas, en concreto, la ocratoxina A (OTA) y la esterigmatocistina (STG), debido a su potencial neurotóxico y a la similitud estructural de la esterigmatocistina con las aflatoxinas.

Para lograr el objetivo principal se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo de metodologías analíticas basadas en extracción, purificación y posterior medida por HPLC/MS-MS para el análisis simultáneo de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos de origen vegetal, concretamente, en arroz de distintas variedades y en bebidas vegetales (arroz, avena, soja y almendra). En primer lugar, se optimizarán distintas metodologías de extracción y purificación que implican la aplicación de distintos disolventes y sorbentes SPE, incluidos los de inmunoafinidad, en función de las propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas y de la composición nutricional específica de cada alimento. En este sentido, el elevado contenido graso de las bebidas vegetales implica una dificultad adicional que supondrá su eliminación, previa a los procesos de purificación con SPE. En todos los casos se validarán las metodologías desarrolladas para asegurar que para las aflatoxinas analizadas se obtienen valores aceptables de recuperación y precisión a los niveles de contaminación ensayados en las muestras enriquecidas. Paralelamente, será necesaria la optimización de las condiciones de separación y análisis de las aflatoxinas extraídas y purificadas de las muestras mediante la técnica HPLC-MS/MS.
2. Evaluación de la bioaccesibilidad de las aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en los alimentos seleccionados (enriquecidos con las aflatoxinas) mediante la aplicación de un sistema de digestión gastrointestinal *in vitro*. Este procedimiento simula las tres etapas fundamentales de la digestión gastrointestinal (salivar, gástrica y duodenal) mediante la recreación artificial de los fluidos digestivos involucrados en cada etapa

digestiva, y su aplicación secuencial sobre el alimento en las condiciones de temperatura y pH adecuadas. Los extractos obtenidos se analizarán mediante HPLC-MS/MS, previa optimización de los procesos de purificación empleando SPE. Los extractos digestivos, una vez analizados mediante HPLC-MS/MS, nos permitirán conocer la bioaccesibilidad de cada aflatoxina, es decir, la fracción de la toxina original que ha sido extraída desde la matriz alimentaria hacia la fracción digestiva soluble susceptible de ser absorbida a nivel intestinal. Mientras que la digestión *in vitro* se puede aplicar de manera directa sobre las bebidas vegetales por tratarse de alimentos que se ingieren crudos, la bioaccesibilidad de las aflatoxinas en arroz requiere de la aplicación de un tratamiento de cocinado sobre este cereal previo a la digestión *in vitro*. Por este motivo, se aplicará un tratamiento de cocinado con agua a 100 °C durante 12-15 min. Asimismo, se evaluará el efecto del cocinado sobre la integridad de las aflatoxinas y se determinará además el contenido de aflatoxinas remanentes en el agua de cocción.

3. La evaluación de la neurotoxicidad de las aflatoxinas B y G, de la OTA y de la STG mediante la monitorización de su capacidad de plegamiento e interacción molecular sobre el péptido β amiloide 1-42 ($A\beta_{1-42}$) *in vitro*, y de su citotoxicidad sobre cultivos de la línea celular indiferenciada de neuroblastoma humano SH-SY5Y. De manera adicional, se evaluará la capacidad de dos polifenoles con gran potencial antioxidante (curcumina y cafeína) para contrarrestar los posibles efectos neurotóxicos que se puedan derivar de la exposición a estas micotoxinas.

VII. OBJECTIVES

VII. OBJECTIVES

The main objective of this doctoral thesis is to evaluate human exposure to mycotoxins of toxicological relevance through the application of three different approaches: 1) Dietary exposure; 2) Bioaccessibility; and 3) Neurotoxicity. The first two approaches focus on the study of aflatoxins B and G due to their exceptional toxicity and carcinogenicity compared to other mycotoxins. In contrast, the neurotoxicity study has been extended to other mycotoxins, specifically ochratoxin A (OTA) and sterigmatocystin (STG), due to the neurotoxic potential related to both mycotoxins and the structural similarity of sterigmatocystin to aflatoxins.

To achieve the main objective, the following specific objectives are proposed:

1. Development of analytical methodologies based on extraction, clean-up and subsequent analysis using HPLC-MS/MS for the simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in plant-based foods, specifically in rice of different varieties and in plant-based beverages (rice, oat, soy and almond). Firstly, different extraction and clean-up methodologies will be optimized; this involves the use of different solvents and SPE sorbents, including immunoaffinity ones, based on the physicochemical properties of the aflatoxins and the specific nutritional composition of each food. In this sense, the high fat content of plant-based beverages implies an additional challenge that involves their removal before the SPE step. The developed methodologies will be validated to ensure that all aflatoxins present acceptable recovery values and deviation between replicates at the contamination levels tested in the enriched samples. Simultaneously, it will be necessary to optimize the conditions for the analysis of aflatoxins, once extracted and purified from the samples, using HPLC-MS/MS.
2. Evaluation of the bioaccessibility of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) in selected foods (spiked with aflatoxins) by application of an *in vitro* gastrointestinal digestion model. This model simulates the three main stages of the gastrointestinal digestion (i.e. salivary, gastric and duodenal) by artificially simulating the digestive fluids involved in each digestive stage and their sequential application on the food under appropriate temperature and pH conditions. The extracts are purified by SPE and then analyzed by HPLC-MS/MS. Thus, analysis of these extracts will provide data about the

bioaccessibility of each aflatoxin, i.e., the fraction of the original toxin that has been extracted from the food matrix towards the soluble digestive fraction that is susceptible to being absorbed at the intestinal level. While *in vitro* digestion can be directly applied to plant-based beverages as they are consumed raw, the bioaccessibility of aflatoxins in rice requires the application of a cooking treatment before *in vitro* digestion. For this reason, a cooking treatment with water at 100 °C for 12-15 minutes will be applied. In addition, the effect of cooking on the integrity of the aflatoxins will be evaluated and the content of aflatoxins remaining in the cooking water will also be determined.

3. The evaluation of the neurotoxicity of aflatoxins B and G, OTA and STG by monitoring their ability to aggregate the amyloid β 1-42 ($A\beta_{1-42}$) peptide *in vitro*, and their cytotoxicity on the undifferentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line culture. Additionally, the capacity of two polyphenols with high antioxidant potential (curcumin and caffeine) to counteract the possible neurotoxic effects resulting from exposure to these mycotoxins will be also assessed.

VIII. PARTE

EXPERIMENTAL

VIII. PARTE EXPERIMENTAL

1. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A AFLATOXINAS PRESENTES EN ARROZ Y EN BEBIDAS VEGETALES.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por una amplia variedad de hongos que colonizan tanto los cultivos, como los alimentos una vez recolectados y durante su procesado y almacenamiento. Las micotoxinas también aparecen en los alimentos de origen animal por la ingesta de piensos contaminados por parte del ganado. La síntesis de micotoxinas por parte de los hongos se produce en respuesta a una compleja combinación de factores ambientales y microbianos aún no del todo conocidos. Esto, unido a los efectos potencialmente tóxicos de las micotoxinas, hace que su presencia constituya un problema para la seguridad alimentaria, humana y animal que se agudiza aún más si cabe en el caso de las aflatoxinas. Las aflatoxinas no solamente están consideradas entre las micotoxinas más tóxicas, sino que además provocan un amplio abanico de efectos nocivos en diferentes órganos y presentan una carcinogenicidad muy superior al resto de micotoxinas. Por ello se consideran agentes carcinogénicos de máximo nivel. Los factores anteriormente mencionados categorizan a las aflatoxinas como sustancias tóxicas de máximo riesgo y con una elevada prevalencia en la cadena alimentaria, lo que justifica la necesidad de prevenir, controlar y reducir su presencia a todos los niveles de producción y de exposición alimentaria.

Los alimentos de origen vegetal (cereales, semillas oleaginosas y frutos secos) constituyen una importante fuente de exposición a las aflatoxinas. Las causas se pueden resumir en: 1) la importante frecuencia de colonización de estos alimentos por hongos aflatoxigénicos, 2) la elevada estabilidad térmica de las aflatoxinas, que les permite resistir gran parte de los tratamientos de procesado alimentario, y 3) la presencia fundamental de estos alimentos como base de la dieta común a nivel global. Estas circunstancias han llevado a los organismos reguladores a un endurecimiento de las restricciones legales establecidas en torno a los niveles máximos de aflatoxinas permitidos en alimentos de origen vegetal y en ciertos alimentos de origen animal, si se comparan con el resto de las micotoxinas legisladas.

Sin embargo, existen muchos factores que dificultan la realización de un control efectivo de las micotoxinas en general y de las aflatoxinas en particular. Entre estos

factores caben destacar: la naturaleza heterogénea de las contaminaciones micotoxigénicas, los flujos comerciales entre países y continentes, la aparición de las aflatoxinas en cualquier eslabón de la cadena alimentaria y el desarrollo de nuevos alimentos derivados de cereales, semillas y frutos secos no suficientemente contemplados por la legislación existente. El control de la seguridad y calidad alimentaria en relación a las aflatoxinas implica además el desarrollo de metodologías analíticas que permitan reforzar la vigilancia sobre el consumo de alimentos de origen vegetal potencialmente susceptibles a contaminación por aflatoxinas, incluso cuando sus niveles de contaminación sean inferiores a los límites establecidos por ley, ya que cualquier nivel de exposición a este tipo de micotoxinas implica un riesgo para la salud humana dado su elevado carácter carcinogénico.

En este contexto, en el presente capítulo de la Tesis Doctoral, se describe una nueva metodología analítica para la extracción y purificación de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 a partir de distintas variedades de arroz para su posterior análisis por HPLC-MS/MS. Los resultados obtenidos se recogen en el primer trabajo titulado: “*Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS (Food Chemistry 395 (2022) 133611)*”. Entre todos los cereales, se seleccionó el arroz por ser el cereal más consumido en el mundo y por su elevada vulnerabilidad a la contaminación aflatoxigénica debido a las condiciones de humedad requeridas para su cultivo. El método analítico desarrollado implicó una optimización de la extracción de las aflatoxinas de las distintas variedades de arroz y la limpieza posterior de los extractos obtenidos con el fin de preconcentrar los analitos y disminuir la presencia de sustancias interferentes que pudieran afectar la medida por HPLC-MS/MS. Para la extracción se comparó la eficiencia de diferentes disolventes (agua, disoluciones de ACN y MeOH de composición acuosa al 20%), la adición de sales de particionamiento, los tiempos de extracción y la técnica de agitación empleada. Para la purificación de los extractos se optó por la técnica SPE empleando sorbentes de relleno polimérico e inmunosorbentes (IAC), estos últimos para la retención selectiva de las aflatoxinas. Una vez establecida la mayor eficiencia proporcionada por las IAC, se comprobó la capacidad desnaturalizante de cada tipo de disolvente empleado. Finalmente, también se evaluaron etapas adicionales para mejorar la limpieza de los extractos como filtros de diferente composición (fluoruro de polivinilideno (PVDF), Nylon, microfibra de vidrio (GMF/A)), centrifugación a diferentes velocidades y tiempos, así como la

resuspensión final de las muestras evaporadas en agua y en disoluciones acuosas al 10%, 20% y 30% de ACN o MeOH. El método desarrollado se validó en términos de recuperación y repetibilidad, y se aplicó a muestras de distintas variedades de arroz adquiridas en supermercados locales. De esta manera, se evaluó la presencia de aflatoxinas en un conjunto representativo de muestras de arroz comercializadas. Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de la AFB1 en al menos dos de las muestras analizadas a niveles cuantificables, pero siempre en concentraciones inferiores a los límites establecidos por la legislación vigente.

Sin embargo, la exposición real a las aflatoxinas no se corresponde con la cantidad de toxina ingerida en el arroz, sino con la fracción final de toxina que logra distribuirse por el organismo a través de la circulación sistémica, siendo esta fracción la responsable de su toxicidad. Por este motivo, la evaluación de la exposición a aflatoxinas no debe limitarse solamente a la determinación de la toxina en los alimentos, sino que también deben abordarse aquellos procesos fisiológicos que permiten la liberación de las aflatoxinas, una vez ingeridas, hacia el lumen intestinal para su absorción intestinal tras la digestión (aflatoxina bioaccesible). La bioaccesibilidad de las aflatoxinas depende de las propiedades de la toxina, de la composición del alimento y sus posibles interacciones con la toxina, así como de las condiciones mecánicas, fisicoquímicas y enzimáticas que se apliquen durante la digestión. El estudio de la bioaccesibilidad gastrointestinal de aflatoxinas mediante el empleo de modelos de digestión *in vitro* que simulan las condiciones estándar de la digestión es una herramienta de gran utilidad para evaluar su bioaccesibilidad a partir de cada tipo de alimento. De manera adicional, el arroz es un alimento que no puede ingerirse crudo, sino que requiere algún tipo de cocinado previo. Uno de los métodos de cocinado más frecuentes del arroz es su cocción en agua a una temperatura mínima de 100 °C. Aunque en principio las aflatoxinas son altamente termoestables, la presencia de agua puede reducir su estabilidad y favorecer su extracción parcial a partir del arroz, lo que podría contribuir a la detoxificación de las aflatoxinas previa a la ingestión y, por tanto, alterar su bioaccesibilidad.

Teniendo en cuenta todos estos factores, el segundo trabajo titulado: *Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of in vitro bioaccessibility from white and brown rice (Food Chemistry, 436 (2024) 137738)* evalúa, por un lado, el efecto de un tratamiento de cocinado por cocción sobre las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 presentes en arroz y, por otro, la bioaccesibilidad de estas aflatoxinas en el arroz cocinado

mediante la aplicación de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Ambos estudios se han realizado sobre arroz blanco y sobre arroz integral, y todos los extractos obtenidos fueron purificados y se analizaron mediante HPLC-MS/MS. Debido a la baja concentración de las aflatoxinas presentes en el arroz de forma natural, las dos variedades de arroz se fortificaron con cantidades conocidas de aflatoxinas. Para ello el arroz se dejó en contacto con las disoluciones de aflatoxinas de interés durante toda la noche (aproximadamente 12 h). El tratamiento de cocinado permitió obtener la fracción de aflatoxina original remanente en el arroz después del cocinado, y la fracción presente en el agua de cocción. Por otra parte, se aplicó el mismo tratamiento a disoluciones patrón de aflatoxinas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el agua a 100 °C extrae parcialmente las aflatoxinas, y que algunas de las aflatoxinas no fueron detectadas tras el cocinado (variable según el tipo de aflatoxina y de arroz), lo que demuestra el potencial de este tipo de tratamientos de cocinado para la detoxificación aflatoxigénica. De manera complementaria, la simulación digestiva *in vitro* permitió evaluar la bioaccesibilidad de cada aflatoxina tras la aplicación de cada etapa digestiva (salivar, gástrica y duodenal) sobre el arroz fortificado previamente cocinado, así como las pérdidas de aflatoxina original observadas entre etapas digestivas. Los resultados obtenidos demostraron una elevada bioaccesibilidad de las aflatoxinas, especialmente a partir del arroz blanco. Mientras que en el arroz blanco la liberación de las aflatoxinas fue progresiva a lo largo de las etapas digestivas, en el caso del arroz integral la etapa gástrica fue decisiva para la bioaccesibilidad de las aflatoxinas.

En la presente Tesis Doctoral se ha abordado además la determinación de aflatoxinas en bebidas vegetales. El interés en este tipo de muestras radica en el auge de estos nuevos alimentos. Por otra parte, su complejidad nutricional, derivada de la presencia de múltiples aditivos, dificulta el establecimiento de límites legales de aflatoxinas en este tipo de alimentos. Estas bebidas se obtienen a partir de una amplia variedad de materias primas como cereales (arroz, avena, trigo, maíz, etc.), semillas oleaginosas (fundamentalmente soja e incluso cacahuete), así como frutos secos (almendra, avellana, nuez, etc.), o de una combinación de diferentes materias primas, todas con elevada susceptibilidad a la contaminación por aflatoxinas. El proceso estándar de elaboración de estas bebidas consiste en la disgregación y remojo de la materia prima en agua para extraer sus componentes nutricionales seguido de una etapa de filtración, y el posterior enriquecimiento de la bebida con ingredientes adicionales como

aceites y grasas vegetales, azúcares, proteínas, minerales y aditivos de base química. La adición de estas sustancias tiene por objeto mejorar el sabor, la apariencia, así como la conservación de la bebida, e incluso enriquecerla con algún nutriente específico. Por tanto, la composición nutricional de estas bebidas es altamente variable en base a la materia prima de partida y al proceso específico de elaboración y enriquecimiento de esta.

Por tanto, en el tercer trabajo titulado: *Analysis and evaluation of in vitro bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in plant-based milks* (*Food Chemistry*, 460 (2024) 140538) se evaluó la presencia de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en diferentes tipos de bebidas vegetales (arroz, avena, soja y almendra) mediante HPLC-MS/MS. Para la extracción de las aflatoxinas y posterior purificación de los extractos se ensayaron distintos disolventes, diferentes tipos de sorbentes SPE (rellenos poliméricos e IAC), así como la extracción previa de las grasas. El método se validó en términos de recuperación y de precisión, y se aplicó al análisis de 20 muestras (5 muestras de cada tipo de bebida vegetal - arroz, avena, soja, almendra) adquiridas en supermercados locales. Se detectó la presencia de las aflatoxinas B1, B2 y G1 en una de las muestras de bebida de soja a niveles inferiores al límite de cuantificación, lo que confirma la exposición humana a aflatoxinas a través de bebidas vegetales. Paralelamente, se evaluó la bioaccesibilidad *in vitro* de las mismas aflatoxinas en cada tipo de bebida vegetal previamente fortificada con cantidades conocidas de aflatoxinas. Los resultados evidenciaron la influencia del tipo de aflatoxina y composición de la bebida vegetal sobre la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas.

Artículo 1: Determinación simultánea de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en arroces comerciales mediante el uso de columnas de inmunoafinidad y de HPLC-MS/MS.

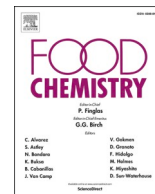
Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS.

Iván Romero-Sánchez, Lorena Ramírez-García, Emma Gracia-Lor, Yolanda Madrid-Albarrán

Food Chemistry 395 (2022) 133611 (Impact Factor 8.5)

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

CONGRESO DE LA XXXVIII REUNIÓN BIENAL DE LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA. *Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS.* Granada, España, junio de 2022. Tipo de comunicación: Póster.



Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS

Iván Romero-Sánchez, Lorena Ramírez-García, Emma Gracia-Lor^{*}, Yolanda Madrid-Albarrán

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Aflatoxins
Cereals
Rice
Immunoaffinity columns
HPLC-MS/MS
Bioanalytical Chemistry

Chemical compounds studied in this article:

Aflatoxin B1 (Pubchem CID:186907)
Aflatoxin B2 (Pubchem CID: 2724360)
Aflatoxin G1 (Pubchem CID: 14421)
Aflatoxin G2 (Pubchem CID: 2724362)

ABSTRACT

Rice is frequently contaminated with aflatoxins, that are highly toxic fungal substances and strongly involved on hepatic cancer. In this work, different extraction and clean-up methods were evaluated for the simultaneous extraction and clean-up of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from rice. Favourable results were obtained by using methanol – water (80:20, v/v) extraction followed by immunoaffinity columns for clean-up, with recoveries of 86–92%, standard deviations between 5 and 11%, LOD ranged between 0.09 and 0.32 µg/kg, and LOQ between 0.31 and 1.06 µg/kg. Method validation and sample analysis were performed by using HPLC-MS/MS. Nine rice samples from different origin, varieties and specific characteristics, acquired in Spanish supermarkets were analysed. In two basmati samples from the same batch aflatoxin B1 was detected at (1.62 ± 0.08) µg/kg and (0.77 ± 0.03) µg/kg, both lower than the levels established by European Regulation for aflatoxin B1 in cereals.

1. Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by several phytopathogenic fungi. This family of compounds, which are produced by different fungi, includes a wide variety of low molecular weight organic molecules, with a great variety of chemical structures, toxicokinetic properties and biosynthetic origins (Kolawole, Meneely, Petchkongkaew, & Elliott, 2021). Among the main fungal producers of mycotoxins, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria* genus are the most common ones. These fungi are ubiquitous in the environment, and they usually colonize most crops during their growth and postharvest storage (Carvajal, 2013). It is possible that the same fungal specie could produce different types of mycotoxins, or that different fungal species could produce the same mycotoxin (Arce-López, Lizarraga, Vettorazzi, & González-Peñas, 2020). Nevertheless, the fungal presence and mycotoxin synthesis depends on different environmental factors such as temperature and relative humidity, land and crop properties, and the presence of other microorganisms and insects, because fungus colonization of crops does not imply the synthesis of mycotoxins, except in case that the previous factors reach specific balances (Pulina et al., 2014).

Diet is the main route of human exposition to mycotoxins and less

frequent, inhalation and cutaneous contact with contaminated crops or surfaces with fungal mycotoxin producers (Waseem, Shah, Sajjad, Siddiqi, & Nafees, 2015). At present, up to four hundred different mycotoxins are known (Zhao, Chen, Shen, & Qu, 2017). Among them, attention focuses on those that produce relevant toxicities for animal and human health, as aflatoxins, fumonisins 1 and 2, zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, T-2 and HT-2 toxins, ocratoxin, patulin, citrinine and ergotic alkaloids (Spanish Agency for Consumption, n.d.).

Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 are among the most toxic mycotoxins (Benkerroum, 2020). They are produced by *Aspergillus flavus*, *parasiticus* and *nomius* species under tropical and semi-arid tropical conditions (Kumar, Mahato, Kamle, Mohanta, & Kang, 2017). They contaminate a wide variety of foodstuffs such as cereals, nuts, vegetables, and spices, among others. In addition, aflatoxins M1 and M2 are aflatoxins from animal origin which are produced by animal metabolism from B and G original aflatoxins, respectively and are common in animal products (dairy products, meat, and eggs), according to Rushing & Selim, 2019. Moreover, mycotoxin cross-linked contamination using tools, surfaces or places that have been previously in contact with contaminated crops or foodstuffs is also frequent. Aflatoxins thermal stability avoids their destruction during typical food processing and cooking thermal treatments (Carvajal, 2013).

^{*} Corresponding author.

E-mail address: emgracia@ucm.es (E. Gracia-Lor).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133611>

Received 2 February 2022; Received in revised form 13 June 2022; Accepted 28 June 2022

Available online 1 July 2022

0308-8146/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Aflatoxins have acquired a great relevance because of their high toxicity (toxicity order is Aflatoxin B1 > Aflatoxin G1 > Aflatoxin B2 > Aflatoxin G2), that includes a broad range of acute and chronic effects over animal and human health including carcinogenicity, teratogenicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, endocrine disorders, immunosuppression, metabolic disorders, allergic reactions, reproductive deficiencies, fetal alterations; and, finally, death (Benkerroum, 2020). Carcinogenic effect of aflatoxins (especially for aflatoxin B1) is so powerful that they were classified as Group I carcinogenic agents by International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). Implication of aflatoxins in cancer development is especially frequent at hepatic level because this organ is responsible for the metabolism and detoxification of mycotoxins, among other toxins (Rushing & Selim, 2019). This process is carried out by the hepatic enzymes of the Cytochrome P450 Complex, that metabolize the original aflatoxins B1, B2, G1 and G2 into less toxic substances that are more easily excreted from the organism. However, some generated intermediates are reactive oxygen species (ROS) with high oxidant capacity. These reactive species, apart from alter cellular redox balance, can be linked to proteins and deoxyguanosines from cellular DNA. This binding DNA-Adduct generates mutations in proliferative genes that alter cellular cycle, and, consequently, health hepatic cells turn into cancer cells (Marchese et al., 2018).

Cereals are among the most susceptible crops to aflatoxigenic fungi contamination. It is estimated that 25% of world cereal crops are contaminated by mycotoxins, and this fact is of special relevance for rice, as it is the second cereal more consumed worldwide (FAO, 2004). Rice demands large amounts of water for growing up, and this factor, in addition to warm temperatures and poor processing and storage conditions, makes this cereal especially susceptible to be colonized by aflatoxigenic fungi (Kumar et al., 2017). Although rice is processed by washing, peeling, drying and other specific physicochemical treatments before being commercialized, these treatments could not be effective enough to completely remove aflatoxins. Moreover, there are additional risks by under-processing in brown rice (this variety of rice is not peeled to keep the nutritional and digestive benefits of germ and bran that integrate external layers, according to Shen & Singh, 2021). Other risk factor could be the new agroecological techniques which avoid the use of pesticides. These agronomic trends could promote aflatoxigenic fungi colonization with a major risk of aflatoxin contamination over rice, in absence of methods for fungal control (Habschied et al., 2021).

The high risks of aflatoxins for animal and human health added to their prevalence on cereals have promoted the establishment of different legislation to limit aflatoxins content in cereals, among other susceptible foodstuff, for animal and human consumption. One of the most restrictive legislations is Commission Regulation (EC) No 1881/2006, that establishes a maximum limit of aflatoxin B1 at 2 µg/kg in processed cereals for human consumption, and a maximum limit of the sum of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 at 4 µg/kg. This Regulation affects to all cereals that are consumed in the European Union countries, regardless of the cultivation origin. However, European Community legislation has not established any preferent method for aflatoxins determination in foodstuffs yet. Traditional methods for aflatoxins extraction include simple extraction with different organic and polar solvent combinations, and extraction combined with Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) salts method. QuEChERS method is particularly effective for mycotoxins extraction (Perestrello et al., 2019). Nevertheless, this method usually sweeps along much matrix interferences, so a clean-up method to minimize matrix residues present after extraction is usually needed. Among the most typical techniques for cleaning up, are QuEChERS salts with solid phase extraction (SPE) cartridges (Krska, Welzig, Berthiller, Molinelli, & Mizaiakoff, 2005). However, typical SPE cartridges are not capable enough to retain only aflatoxins, because they have an insufficiently selective composition. This limitation, added with a poor clean-up capacity of QuEChERS sorbents depending on the food matrix, has increased interest in the use of immunoaffinity columns

(IAC) (Scott, Banting, & Trucksess, 1997). These columns contain specific antibodies that retain only aflatoxins B1, B2, G1 and G2 simultaneously, and allow a more exhaustive cleaning of the extracts, providing high aflatoxin recoveries, and these advantages make IAC method a promising alternative for aflatoxins clean-up (Şenyuva & Gilbert, 2010) (Krska et al., 2005).

The objective of this study is to analyse aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in rice samples from different varieties, origins, processing by different treatments and growing with organic and no organic techniques. For getting this purpose, a method for extraction, clean-up and simultaneously analysis of these aflatoxins in rice, by employing IACs and HPLC-MS/MS has been optimized. This work contributes to increase the global knowledge about mycotoxin contamination on basic foodstuffs from the common diet and to confirm if a representative selection of cereals commercialized in Spanish supermarkets complies with the restrictive limits established by European Regulation (i.e. 2 µg/kg for each aflatoxin). Studies about the presence of aflatoxins in cereals obtained using new organic culture techniques are scarce, so this study provides new data that might help to confirm if new crop techniques without pesticides could involve additional risks of aflatoxin presence in rice.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Ultrapure water was obtained by using a Milli-Q Millipore system (Bedford, MA, USA). Acetonitrile (ACN) LC-MS grade used for chromatography was purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA); ACN and methanol (MeOH) supergradient grade for extractions and formic acid (HCOOH) for HPLC-MS/MS were acquired from Scharlab (Barcelona, Spain). QuEChERS salt combinations selected for initial extraction assays (4 g magnesium sulphate (Mg₂SO₄), 1 g sodium chloride (NaCl), 1 g sodium citrate (Na₃C₆H₅O₇) and 0.5 g sodium hydrogen citrate hexahydrate (Na₂HC₆H₅O₇·6H₂O), were purchased from Scharlab (QUEXTENAK1 extraction kit reference). Solid phase extraction (SPE) cartridges Extrabond EBH (60 mg, 3 mL), Extrabond EB2 (200 mg, 6 mL) and Extrabond EAX (200 mg, 6 mL) were obtained from Scharlab; Oasis MCX (60 mg, 3 mL) and Oasis MAX (150 mg, 6 mL) cartridges were from Waters (Massachusetts, USA) and Afla-Clean IAC were supplied from LCtech GmbH (Obertaufkirchen, Germany). Filters of polyvinylidene fluoride (PVDF), and glass microfiber filters (GMF/A) with a 1.6 µm pore size, were provided by Scharlab. Buffer salts disodium hydrogenphosphate dodecahydrate (Na₂HPO₄·12H₂O), sodium dihydrogenphosphate monohydrate (NaH₂PO₄) and sodium chloride (NaCl) for PBS preparation were acquired from Panreac (Barcelona, Spain). Aflatoxins analytical solid standards were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA): (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19-trioxapentacyclo[10.7.0.0^{2,9}.0^{3,7}.0^{13,17}]-nonadeca-1,4,9,11,13(17)-pentaene-16,18-dione (Aflatoxin B1, ≥97.0%), (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19-trioxapentacyclo[10.7.0.0^{2,9}.0^{3,7}.0^{13,17}]-nonadeca-1,9,11,13(17)-tetraene-16,18-dione (Aflatoxin B2, ≥98%), 11-methoxy-6,8,16,20-tetraoxapentacyclo-[10.8.0.0^{2,9}.0^{3,7}.0^{13,18}]-jicosa-1,4,9,11,13(18)-pentaene-17,19-dione (Aflatoxin G1, ≥98%) and (3S,7R)-11-methoxy-6,8,16,20-tetraoxapentacyclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{3,7}.0^{13,18}]-jicosa-1,9,11,13(18)-tetraene-17,19-dione (Aflatoxin G2, ≥98%).

Individual stock standard solutions were prepared by dissolving 1 mg in ACN, up to a final concentration of 100 mg/L. The individual stock solutions were used for preparing a working solution containing a mixture of the four aflatoxins at 25 mg/L in ACN. All the standards were stored at -20 °C until their use to prevent their degradation.

Phosphate buffer saline work solution (1X PBS) was prepared by fivefold dilution with water of a solution containing Na₂HPO₄·12H₂O (140.06 mmol/L), NaH₂PO₄·1H₂O (70.01 mmol/L) and NaCl (727.24 mmol/L), with a final pH value of 7.2.

Table 1

Retention times, precursor and product ions, and collision energies selected for HPLC-MS/MS analysis.

Compound	Retention Time, min	Precursor Ion, m/z [$M + H$] ⁺	Quantification Transition		
			Product Ion I, m/z (CE, V)	Product Ion II, m/z (CE, V)	Product Ion III, m/z (CE, V)
Aflatoxin B1	5.49	313.1	285.1 (−25)	241.1 (−38)	213.1 (−46)
Aflatoxin B2	5.31	315.2	287.1 (−26)	259.0 (−30)	243.0 (−40)
Aflatoxin G1	5.26	329.0	243.1 (−29)	200.0 (−41)	311.1 (−23)
Aflatoxin G2	5.06	331.0	313.1 (−26)	245.0 (−30)	189.0 (−45)

2.2. Rice samples

Rice samples were obtained from several supermarkets of Madrid (Spain), in accordance with a previous selection that considers the current consumption trends of this cereal (variety, origin, culture technique and industrial processing). The following types of rice were selected: round rice (from Spain), brown round rice (Spain), organic round rice (Spain), organic long rice (EU), organic brown long rice (EU), basmati rice (Pakistan), Thai rice (Thailand) and organic brown basmati rice (India). All the samples were completely grinded and homogenized with a blender jar and were kept in darkness at room temperature until the analysis.

2.3. Instrumentation

Development and method optimization was carried out using a capillary Liquid Chromatograph coupled to diode array and mass spectrometer detectors (cHPLC-DAD/MS) Model 1100 Series, (Agilent Technologies, Madrid, Spain). This chromatographical system consists of a G1376A binary capillary pump, a G1379A degasser and an external stainless-steel loop with a volume injection of 10 μ L placed into a Rheodyne injection valve with six channels. Reversed-phase separation of aflatoxins was carried out on a SynergyTM Fusion C18 (150 mm \times 0.3 mm, ID 4 μ m, pore size 80 Å) analytical column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Volume sample for injection was 10 μ L and flow rate was set at 10 μ L/min. Mobile phase consisted of ultrapure water with HCOOH 0.05% (eluent A) and ACN (eluent B). The percentage of B changed as follows: 0 min, 30%; 3 min, 60%; 7.5 min, 60%; 11 min, 30%, and the last condition was kept during 4 min to rebalance the column.

A G1315B diode array detector (Agilent Technologies, Madrid, Spain) with 500 nL and 10 mm pathlength coupled to a single quadrupole mass spectrometer with an electrospray ionization source (Model 6120 Series, Agilent Technologies) were used. Positive ESI mode was chosen for instrument performance, capillary voltage was set at 3000 V and analyte ionization voltage, 150 eV. Nitrogen was employed as nebulizing gas at 35 psig with a drying flow of 12 L/min at 350 °C. For data acquisition and processing, Agilent ChemStation software for Windows (Agilent Technologies) was employed.

The wavelengths measured (360 nm for quantification and 375 nm for confirmation) were previously selected using a diode array G6860A UV/Vis spectrophotometer (Agilent Technologies), equipped with the HP Chemstation software.

Confirmatory analyses by HPLC-MS/MS were performed in a triple quadrupole mass spectrometer system (LC-MS-8030, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) equipped with a Nexera LC-30AD solvent delivery unit, a Prominence DGU-20A5 degasser, a Nexera SIL-30AC autosampler with temperature-controlled tray and a Prominence CTO-20AC column oven. Chromatographic separation was carried out using a SynergyTM Fusion C18 column (150 mm \times 3 mm, ID 4 μ m, pore size 80 Å) from Phenomenex, Torrance, CA, USA. The injection volume onto the column was 20 μ L, the flow rate was 0.3 mL/min and the elution gradient was the same than the used in cHPLC-DAD/MS system.

Analysis were done in positive electrospray ionization mode using the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with a dwell time of 100 msec for all the transitions. ESI ionization voltage was set at 4.5 kV,

detector voltage at 2.18 kV, and current interface was established at 2.1 μ A. Nitrogen was applied as nebulizing gas at 1.5 L/min and as drying gas at 15 L/min. Desolvation line temperature was established at 250 °C and heat block temperature at 400 °C. Argon was used for collision-induced dissociation (CID) at 230 kPa in the collision cell. LabSolutions LCMS software (Shimadzu) was employed for data acquisition and processing. Selected transitions and collision energies (CE) for aflatoxins are detailed on Table 1.

2.4. Optimization parameters for aflatoxins extraction and clean-up using QuEChERS and SPE cartridges

The optimization of extraction and clean-up was carried out only for aflatoxin B1, as the four aflatoxins have a very similar structure (Fig. 1) and therefore, they show a very similar physicochemical behaviour. Therefore, it is expected that the four aflatoxins will show a similar behaviour during the extraction and clean-up steps (Carvajal, 2013).

2.4.1. Optimization of extraction conditions

The effect of the composition of the extraction solvent, the presence of QuEChERS salts after the extraction, the extraction times and the extraction technique were tested. In all the experiments performed, 5 g of ground rice (Spain) in triplicate were taken and then, the samples were spiked with aflatoxin B1 at 100 μ g/L and incubated in darkness during 1 h. In the first assay, samples were extracted with different composition solvents: pure ACN, pure MeOH, ultrapure H₂O, ACN-ultrapure water (80:20, v/v), and MeOH-ultrapure water (80:20, v/v). The mixture ACN-ultrapure water (80:20, v/v) was the most effective for extraction, so it was selected to test the other extraction factors. In the second experiment, extractive QuEChERS addition was tested. In the third assay, samples were extracted by using different extraction techniques: magnetic stirrer (950 rpm) during 30 min and 1 h, and two different shaking techniques, magnetic stirrer at 950 rpm and orbital shaker at 950 U/min (both during 1 h). Finally, all the extracts were centrifugated at 5000 rpm during 15 min, 1 mL supernatant aliquot was evaporated to dryness by vacuum pressure, reconstituted in 1 mL of ultrapure water and transferred into glass vials for cHPLC-DAD/MS analysis.

2.4.2. Optimization of clean-up conditions

After the optimization of the extraction method, several clean-up steps were evaluated. For this purpose, firstly two filters were tested (PVDF and GMF/A) to evaluate if aflatoxin B1 was retained on them. For this assay an aqueous solution of aflatoxin B1 at 100 μ g/L was employed. Moreover, both filters were tested again using solution of MeOH at the same concentration to compare the loss with regard the solvent nature.

Five SPE cartridges were also tested: two of them were polymeric (Extrabond EBH and Extrabond EB2); another one was a mixed mode cationic exchange (MCX); and other two, mixed mode anionic exchange (MAX and EAX). 3 mL of a 100 μ g/L aflatoxin B1 aqueous solution were passed through the cartridges (evenly conditioned) and, after drying under vacuum, aflatoxin B1 was eluted with ACN. Finally, aflatoxin loss after reconstitution of the final evaporated extracts was also studied. For this assay, stock solutions of aflatoxin B1 at 100 μ g/L were evaporated at dryness under a gentle nitrogen stream and reconstituted with ultrapure water and ultrapure water with different ACN or MeOH organic

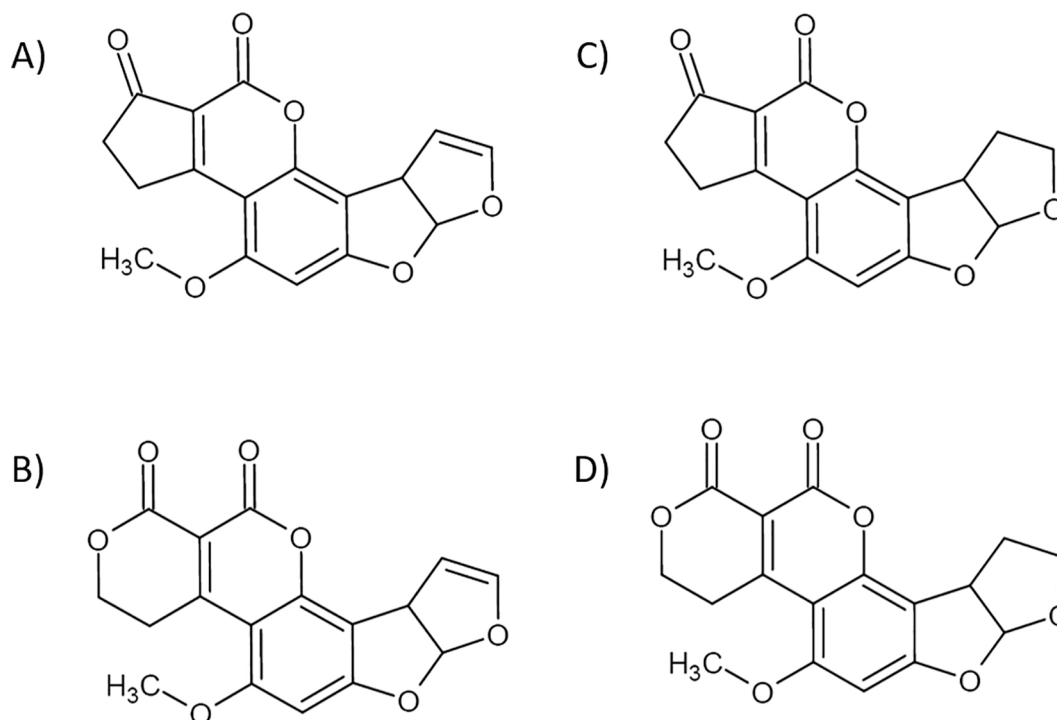


Fig. 1. Molecular structures of aflatoxin B1 (A), aflatoxin G1 (B), aflatoxin B2 (C) and aflatoxin G2 (D).

percentages: 10%, 20% and 30% of each type of organic solvent. Then, signals of reconstituted samples were compared with an aqueous stock solution, not evaporated, at the same concentration.

2.5. Optimization and determination of aflatoxins in rice by using immunoaffinity column (IAC) clean-up and HPLC-MS/MS

Different organic solvents for aflatoxins extraction prior to the IAC clean-up were tested: MeOH-ultrapure water (80:20, v/v), which is the recommended extraction mixture by the IAC manufacturer (LCtech IAC Data Sheets and Extraction Protocols, n.d.), and ACN-ultrapure water (80:20, v/v), which was the most effective mixture according to the extraction tests previously mentioned. Once determined the best extractant, the following protocol was applied to determine aflatoxins in rice. 20 g of grinded rice samples were spiked at 1.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and were kept during 1 h in darkness before the extraction. Then, 100 mL of MeOH-ultrapure water (80:20, v/v) were added and the extract was stirred at 950 rpm by magnetic stirring during 1 h in darkness. Then the solution was kept at rest during 5 min to induce rice sedimentation. Liquid supernatant was taken and centrifugated at 5000 rpm during 45 min. 7 mL aliquot from the supernatant was diluted in 43 mL PBS 1X and filtered through a PVDF syringe filter. IACs were conditioned with 3 mL PBS and then a 5 mL aliquot of the diluted filtered extract was charged onto the column. The solution was passed drop by drop by gravity. The columns were washed with 20 mL of ultrapure water by applying a slight vacuum pressure and completely dried under vacuum. Then, 2 mL of MeOH were charged onto the column and kept in contact with the matrix column during 10 min to induce antibodies denaturation. Finally, aflatoxins were eluted drop by drop from the cartridge, organic solvent was evaporated to dryness by nitrogen stream and extracts were reconstituted in 0.1 mL of ultrapure water for the analysis with HPLC-MS/MS.

2.6. Validation of IAC clean-up and HPLC-MS/MS methodology

Precision and accuracy were evaluated from recovery experiments of 20 g of blank rice samples spiked at 1.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ before loading the

sample in the IAC. For each aflatoxin, its area was compared to area of a blank rice extract that was spiked after passing through the IAC at the same concentration as follows:

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{Peak area of Spiked Sample}}{\text{Peak area of Purified Spiked Extract}} \times 100 \quad (1)$$

The HPLC-MS/MS method was evaluated in terms of linearity, detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ). Linear range was established in a matrix-matched calibration curve for each aflatoxin by least squares linear regression representation, that was made by using peak areas of samples with respect to the known analyte concentrations, and results were evaluated in terms of slope and squared correlation coefficient (R^2). Peak areas of real spiked samples were interpolated on matrix calibration line to get their real concentration. The LOD and LOQ were estimated considering the concentration of the lowest point of the matrix matched calibration curve of each aflatoxin giving a signal to noise (S/N) ratio of 3 and of 10, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of extractive and clean-up conditions

With the purpose of selecting the optimal extraction and clean-up conditions for aflatoxins from rice samples, the following factors were compared: 1) extractive efficiency of different solvents and mixtures, QuEChERS presence during the extraction and other extraction parameters; and 2) aflatoxin losses caused by different factors involved in the cleaning up of the extracts.

3.1.1. Effect of extractive solvents, QuEChERS and other extraction conditions on aflatoxin recovery

Firstly, several factors involved in aflatoxin extraction were evaluated to establish the best extraction conditions.

3.1.1.1. Extraction solvent

Extractive efficiency using the following miscible solvent combinations were evaluated: (a) ACN; (b) MeOH; (c) ultrapure water; (d) ACN-ultrapure water (80:20, v/v); (e) MeOH-ultrapure water (80:20, v/v).

Each solvent combination was added over the rice samples previously spiked with aflatoxin B1. Recoveries were calculated using equation (1) and they were as follows: 76% (d) > 69% (b) > 66% (a) > 48% (e) > 20% (c). Recoveries are low in general, with important differences between solvents, because the lowest recovery for ultrapure water is below 20% and the highest recovery for ACN-ultrapure water (80:20, v/v) is about 76%.

3.1.1.2. Presence of QuEChERS salts after aflatoxin extraction

Then, we tested if the addition of QuEChERS salts could improve aflatoxin B1 extraction in combination with the mixture ACN-ultrapure water (80:20, v/v). QuEChERS with magnesium sulphate, sodium chloride, sodium citrate and sodium hydrogen citrate sesquihydrate were selected because of the predominant use of magnesium sulphate and sodium chloride for aflatoxin extraction from cereals, according with studies cited in [Perestrello et al., 2019](#). However, in our study, the extractive efficiency of aflatoxin B1 from rice using QuEChERS was about 56%, around 20% lower compared with their absence using the same combination solvent, ACN-ultrapure water (80:20, v/v).

3.1.1.3. Other extraction parameters

Finally, extraction times (30 min versus 1 h) and extraction techniques (magnetic stirrer at 950 rpm versus orbital shaker at 950 U/min) were compared. In all conditions tested, recoveries over 100% were obtained. Therefore, we concluded that aflatoxins do not suffer losses under these extraction conditions.

3.1.2. Effect of different clean-up protocols on aflatoxin recovery.

Secondly, different factors involved in aflatoxin clean-up at different steps were evaluated.

3.1.2.1. Filters

A comparison between PVDF (0.22 µm pore size) and GMF/A (1.6 µm pore size) filters, that were selected because they were recommended by LCTech IAC manufacturer for aflatoxins clean-up ([LCTech IAC Data Sheets and Extraction Protocols, n.d.](#)) gave the following recoveries: 92% (PVDF) and 98% (GMF/A) using an aqueous aflatoxin solution and 100% recovery for both filters using an organic aflatoxin solution. Considering these results, both filters allow aflatoxin B1 recoveries above 90%. Although the best recovery using aqueous solutions were obtained for GMF/A filters, PVDF filter was selected because of its best suitability for handling small sample volumes; this filter is designed to filter small sample volumes by coupling to syringe, while GMF/A is specifically designed to filter large sample volumes by a vacuum system.

3.1.2.2. Solid phase extraction cartridges

Then, we tested the extraction efficiency of different SPE cartridges: Two polymeric cartridges which can be used for a wide range of target compounds with quite distinct polarities; two anion exchange cartridges, suitable for both anionic and nonpolar compounds; and a cation exchange cartridge, suitable for compounds with cationic groups and nonpolar compounds. For this purpose, 3 mL of a 100 µg/L aflatoxin B1 aqueous solution was charged onto each SPE cartridge and eluted with pure ACN, giving the following recoveries: EBH (79%) and EB2 (72%); MAX (99%) and EAX (69%); and MCX (84%). Generic nature of traditional tested SPE cartridges prevents an exclusive retention of aflatoxins, and this fact causes undesirable retention of matrix residues from the extract according to [Wells, 2013](#). To improve selectivity of the clean-up procedure, immunoaffinity columns (IAC) were evaluated. IAC retain only aflatoxins B1, B2, G1 and G2 and this exclusivity prevents undesirable interferences retention. IAC yielded recoveries of 86% for aflatoxin B1; 90% for aflatoxin B2; 87% for aflatoxin G1; and 92% for aflatoxin G2 in spiked rice samples (see section 2.6). These satisfactory results are in accordance with [Sugita-Konishi et al., 2006](#) and [Bradburn, Coker, & Blunden, 1995](#). So, IAC cartridges were selected for the clean-up of rice samples.

3.1.2.3. Evaporation and reconstitution of purified extracts

Evaluation of aflatoxin recoveries after the evaporation to dryness of the ACN extract and reconstitution yielded 100% recovery using pure water. However, recoveries got worse when the percentage of organic

solvent used for reconstitution increased: 64%, 57%, 61% (using water with 10%, 20% and 30% of ACN, respectively); and 80%, 73%, 61% (using water with 10%, 20%, and 30% of MeOH, respectively). On the other hand, we compared the area of a 100% aqueous standard solution versus an aqueous solution with 5% of ACN at the same concentration. In this case, the signal of a standard with 5% ACN was 18% less intense. Then, we decided to reconstitute the extracts in 100% water.

3.1.3. Effect of extractant composition over retention capacity of IAC

Once confirmed the highest extractive efficiency of ACN-ultrapure water (80:20, v/v) and the highest efficiency of IAC for the clean-up of rice extracts, the effect of different organic solvent present in extraction mixture over IAC retention was evaluated. For this purpose, two different extractive mixtures were compared: ACN-ultrapure water (80:20, v/v), the one with greatest extractive power in the extraction test (section 3.1.1.1), and MeOH-ultrapure water (80:20, v/v) (recommended by the manufacturer). Results are expressed as recovery percentages of spiked rice samples (by triplicate per condition) regarding blank rice extracts spiked at the same concentration after applying extraction and IAC method (equation (1)). Aflatoxin B1 recovery using ACN-ultrapure water was 65% and 86% recovery was obtained using MeOH-ultrapure water. Moreover, using ACN the standard deviation was 33.7%, in contrast to the deviation obtained when using MeOH (1.1%). Considering that both extraction mixtures were diluted at the same proportion with PBS buffer prior to loading in IAC, and that ACN is in principle tolerated by IAC antibodies according to the study of [Ibáñez-Vea, Martínez, González-Peñas, Lizarraga, & López de Cerain, 2011](#) (where IAC antibodies resisted extracts with until 39% of ACN content), these results might be due to two possibilities. First possibility could be attributed to a greater affinity of ACN than MeOH for aflatoxins, and this fact might complicate aflatoxin interaction with IAC antibody. This hypothesis concurs with the greatest extractive and elution capacity of ACN in preliminary assays and with ACN predominant use for aflatoxins extraction in other papers according to [Perestrello et al., 2019](#), [Qian et al., 2018](#), and [Zhao et al., 2017](#), among others. The second possibility consists of IAC antibody design from this manufacturer makes it more susceptible to be denatured in contact with ACN. This hypothesis is in accordance with [Scott et al., 1997](#), where a greater denaturing power of ACN over IAC antibodies was observed. In the same line, [Stroka, Petz, Joerissen, & Anklam, 1999](#) experimentally demonstrated the excessive denaturing power of ACN over IAC antibodies. They recommended ACN dilutions of at least 7% before charging the extract on IAC. By contrast, MeOH can be tolerated by antibodies even at dilutions of 30%, according with [Şenyuva & Gilbert, 2010](#), [Holcomb & Thompson, 1991](#), [Barmark et al., 1994](#), [Suárez-Bonnet et al., 2013](#), among others. Consequently, MeOH-ultrapure water (80:20, v/v) was employed as extractant before performed IAC clean-up.

3.2. Validation of IAC clean-up and HPLC-MS/MS methodology

LODs and LOQs were lower than the maximum limits established in cereals (i.e. 2 µg/kg and 4 µg/kg for individual and total aflatoxins), according to [Commission Regulation \(EC\) No 1881/2006](#). The lowest LOD and LOQ were found for aflatoxin G1 at 0.09 µg/kg and 0.31 µg/kg, and highest limits for aflatoxin G2 at 0.32 µg/kg and 1.06 µg/kg ([Table 2](#)). All aflatoxins showed satisfactory linearity in the range from 1 to 25 µg/L, that is equivalent to the range 0.71 µg/kg to 17.83 µg/kg in rice. For all the calibration curves, quadratic correlation coefficients above 0.999 were obtained ([Table 2](#)).

Recoveries were satisfactory for all the compounds (86% for Aflatoxin B1, 90% for Aflatoxin B2, 87% for Aflatoxin G1 and 92% for Aflatoxin G2), with standard deviations between 5 and 11% in all cases. These recoveries were obtained from spiked rice samples at 1.43 µg/kg, that was equal to 20 µg/L. These values are in accordance with [Commission Regulation \(EC\) No. 401/2006](#), that establishes minimal recoveries between 80–110% for > 10 µg/kg spiked samples; 70–110%

Table 2

Matrix-matched calibration parameters, LOD and LOQ for aflatoxins B1, B2, G1 and G2.

Compound	Molecular Ion (m/z) [$M + H$] ⁺	Transition Ion I (m/z)	Linear Range* ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	Calibration equation (Matrix Calibration)		
						$y = ax + b$		
						a	b	R^2
Aflatoxin B1	313.3	285.1	1–25	0.16	0.54	4128.7	15.139	0.9993
Aflatoxin B2	315.3	287.1	1–25	0.26	0.87	5081.9	−3495.4	0.9993
Aflatoxin G1	329.3	243.1	1–25	0.09	0.31	10.542	−5417.1	0.9995
Aflatoxin G2	331.3	313.1	1–25	0.32	1.06	3803.4	−3180.4	0.9994

*Linear range was tested by using $n = 4$ levels of concentration (1, 2, 10 and 25 $\mu\text{g/L}$) in matrix-matched calibration curves.

recoveries for spiked samples between 1–10 $\mu\text{g/kg}$; and 50–120% recoveries for < 1 $\mu\text{g/kg}$ spiked samples, in application to any method for aflatoxin extraction and purification from cereals. The validation parameters of this method (i.e. recoveries, LOD and LOQ) were compared with other methods for aflatoxins in cereals and other foodstuffs reported in literature (Supplementary Material Table A1).

3.3. Analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rice samples by using IAC clean-up and HPLC-MS/MS

The presence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 has been evaluated on a set of rice samples which include rice of different varieties (round, long, basmati or Thai), different culture origin (Spain, Italy, Pakistan, Thailand, or India), subjected to different processing treatments (husked rice and brown rice), and to different cultivation techniques (traditional and organic farming). Samples were acquired from different supermarkets located in Madrid (Spain) and sample selection was as representative as possible of current consumer trends. We analysed the presence of aflatoxins in these samples to confirm compliance with Commission Regulation (EC) No 1881/2006 applied to rice marketed within the EU. The samples were processed using IAC optimized method and analysed by HPLC-MS/MS technique. The results are present on Table 3.

Aflatoxins were only detected and quantified in samples 6 and 7. Sample 6 only contained aflatoxin B1 at $(1.62 \pm 0.08) \mu\text{g/kg}$. In order to evaluate if this contamination was punctual or spread over the whole batch, sample 7 was analysed (same variety, origin, commercial brand and batch as sample 6). Aflatoxin B1 was detected and quantified in sample 7 at $(0.77 \pm 0.03) \mu\text{g/kg}$. Signal peaks of aflatoxin B1 transitions on sample 6 are shown on Fig. 2.

Peak area ratios between the quantification transition (Q) and the two confirmation transitions (q_1 and q_2) from this sample were compared with the ion ratios from the same basmati rice previously spiked with aflatoxins at 17.86 $\mu\text{g/kg}$ (Fig. A1 in Supplementary Material). Experimental deviation between ion-ratios from both samples were within the tolerance range ($\pm 30\%$), according to Guidance Document on identification of mycotoxins in food and feed (European Commission, 2017).

The fact that two different food samples from the same batch were

contaminated in different proportion with aflatoxin B1 might be due to the heterogeneous nature of fungal contaminations over solid foodstuffs as cereals. Mycotoxigenic contaminations can occur at any step of rice cultivation, harvest, processed or storage until its commercialization, according to Leite, Freitas, Silva, Barbosa, & Ramos, 2021. Many factors can influence the proliferation of mycotoxins in food, such as the climatic conditions of the area of origin of the cereal crop (temperature, humidity, droughts and specific soil microbiome, among others); packing and storage conditions; cleaning methods and other processing treatments applied during the manufacturing processes (washing, peeling, pelleting and other heat treatments to change the properties of the rice, and presence or absence of physical treatments to remove mycotoxins, etc.) or cleaning conditions of warehouses (to avoid cross-linking contaminations). Moreover, some factors like ubiquitous fungal presence, random mixing of spiked and not spiked grains, in addition to poor control of temperature, humidity and cleaning conditions of grain storage places, contribute to spread of punctual mycotoxigenic fungal contaminations all over rice batch and between batches, according to Jolanta Wawrzyniak, 2021, and fungal colonization and proliferation over rice can produce (or not) fungal synthesis of aflatoxins, depending on ambient conditions. Nevertheless, none of the two Basmati rice samples exceeded the 2 $\mu\text{g/kg}$ limit for aflatoxin B1 established by Commission Regulation (EC) No 1881/2006 that is currently in force for cereals marketed in EU countries. However, compliance with legislation is not enough to ensure contaminated samples safety, since a minimal aflatoxin B1 intake of 1 ng/kg/person/day may be enough to increase liver cancer risk, according to the European Commission (Suárez-Bonnet et al., 2013).

Absence of aflatoxins is especially relevant for samples 3, 5 and 9 (brown rice) or samples 2, 4, 5 and 9 (organic farming). Brown rice are characterized by maintaining the outer layer of bran and germ during its processing because of nutritional and digestive benefits of these grain components. The bran can be especially vulnerable to mycotoxigenic fungus, according to Salim, Sukor, Ismail, & Selamat, 2021. This fact might involve an additional risk from brown rice to aflatoxin contamination, as Jettanajit & Nhujak, 2016 demonstrated, who found different mycotoxins on brown rice (but not aflatoxins), and Ruadrew, Craft, & Aidoo, 2013, who detected aflatoxins in brown rice. Regarding rice from

Table 3Range of aflatoxin contamination ($\mu\text{g/kg}$) in different types of rice samples.

N° Sample	Type of Rice	Origin	Concentration in $\mu\text{g/kg}$			
			Aflatoxin B1	Aflatoxin B2	Aflatoxin G1	Aflatoxin G2
1	Round rice	Spain (EU)	nd	nd	nd	nd
2	Organic round rice	Spain (EU)	nd	nd	nd	nd
3	Brown rice	Spain (EU)	nd	nd	nd	nd
4	Organic long rice	Italy (EU)	nd	nd	nd	nd
5	Organic long brown rice	Italy (EU)	nd	nd	nd	nd
6	Basmati rice (1)	Pakistan	1.62 ± 0.08	nd	nd	nd
7	Basmati rice (2)	Pakistan	0.77 ± 0.03	nd	nd	nd
8	Thai rice	Thailandia	nd	nd	nd	nd
9	Organic brown Basmati rice	India	nd	nd	nd	nd

nd: Aflatoxin below the LOD established limit.

(1)(2): Samples from the same batch.

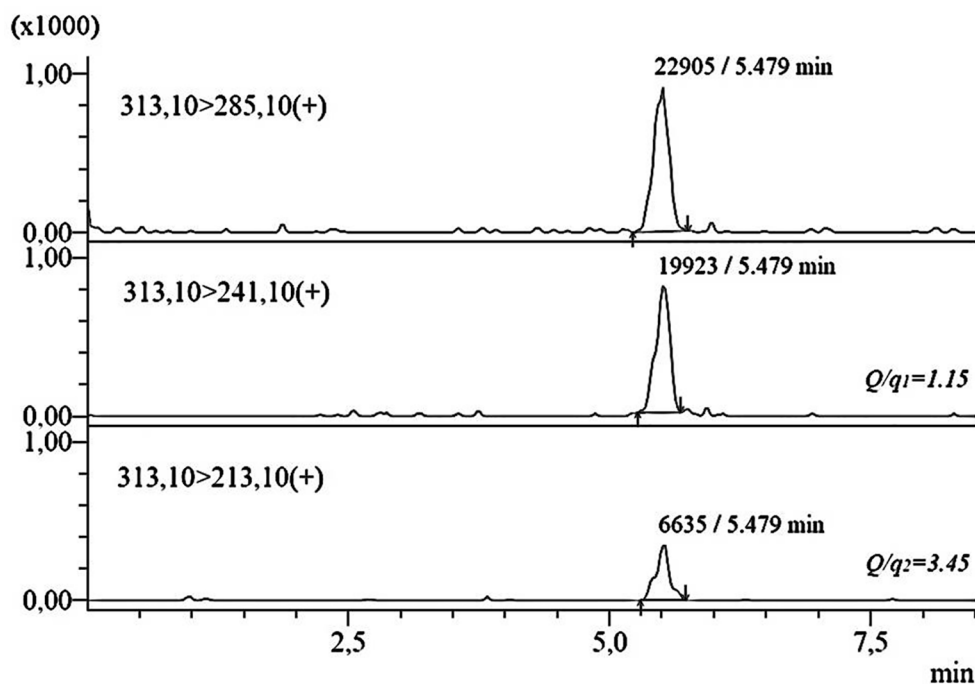


Fig. 2. Signal peaks detected and quantified for aflatoxin B1 transitions in the Basmati rice sample from Pakistan (sample N° 6). Quantification transition (Q), confirmation transitions (q1 and q2) and ratios between Q and q1 / q2 are shown.

organic farming, is important to keep in mind that pesticides and fungicides absence during culture growing improve mycotoxigenic fungal colonization, so more aflatoxin contamination risk is possible. However, emerging development of biological strategies as alternatives to chemical treatments for pest control in crops have counteracted these risks in organic crops, according to Pellán et al., 2021.

Results obtained from rice samples in the current work are not in agreement with previous works reported in the literature. Suárez-Bonet et al., 2013 carried out the determination of aflatoxins in rice samples grown in Spain, Mexico, Pakistan, France, and USA and marketed in Mexico. Most of the samples analysed were seriously contaminated with aflatoxins (up to 138 µg/kg for total aflatoxins). In the same line, Iqbal, Mustafa, Asi, & Jinap, 2014 detected high levels of aflatoxin B1 (from 4.9 to 8.8 µg/kg) and total aflatoxins (from 8.9 to 12.5 µg/kg) in basmati rice from Pakistan. Fredlund et al., 2009 reported aflatoxins contaminations in rice samples from different origin that were marketed in Sweden, that resulted on 71% of basmati and 21% of Thai rice samples contaminated with aflatoxin B1, some of them above the European Regulation. Similarly, Ruadrew et al., 2013 detected contaminations up to 14.7 µg/kg for total aflatoxins on brown oriental rice marketed on Scotland. Differences in aflatoxin contamination between this work and the contamination levels found in other previous studies could be related to the fact that aflatoxin appearance can occur in cereals stored after the official control tests have been carried out (i.e. cereals can be contaminated by fungal spores that are not detected, and, after passing mycotoxin controls, bad storage conditions can cause fungus proliferation and aflatoxin synthesis). On the contrary, in a study of one hundred rice samples marketed in different English regions (Fredlund et al., 2009) and in other work based on the analysis of rice and other cereals marketed in the northern of Spain (Ibáñez-Vea et al., 2011), aflatoxin levels were below the limits established by the European Regulations. Finally, it is important to highlight that aflatoxin B1 is usually the most prevalent over aflatoxins B2, G1 and G2 in cereals, although the four aflatoxins are synthesized from the same metabolic precursors by mycotoxigenic fungus (Kolawole et al., 2021). This fact is of special interest for consumer safety due to the more toxic nature of aflatoxin B1.

4. Conclusions

Optimization of extraction and clean-up methods for aflatoxins from foodstuffs depends on physicochemical properties of the analytes and food matrix. In this sense, food matrix composition is a limitation factor that requires the best method adaptation to get suitable recoveries of analytes in accordance with established limits by legislation. The method optimized in this work based on the use of IAC is a feasible and valid alternative for the simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in different types of rice.

Rice samples with different properties and origins have been analysed. The most consumed types of rice by the population have been selected. Only two samples were contaminated with aflatoxin B1 but without exceeding the established limits by European Regulations.

The different results found between studies on aflatoxin contaminations in rice along the last decades could make convenient further focusing on the specific patterns of aflatoxin contamination in rice, i.e., on rice varieties, origins and specific characteristics. In this sense, specific processing methods and emerging organic farming techniques could make necessary more studies for evaluating additional risks of aflatoxins (and other mycotoxins) contamination for rice and other cereals subjected to these methods.

CRediT authorship contribution statement

Iván Romero-Sánchez: Conceptualization, Resources, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Lorena Ramírez-García:** Resources, Investigation, Methodology, Validation. **Emma Gracia-Lor:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Yolanda Madrid-Albarrán:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was supported by the Community of Madrid/FEDER program [S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM] and by the Madrid Government (Comunidad de Madrid - Spain) under the Multiannual Agreement with Complutense University in the line Program to Stimulate Research for Young Doctors in the context of the V PRICIT (Regional Programme of Research and Technological Innovation [PR65/19-22432] and by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2020-

114714RB-I00).

I. Romero-Sánchez acknowledges the Complutense University of Madrid for his predoctoral grant [CT63/19-CT64/19] and to the Community of Madrid and European Social Fund for the financial support [PEJ-2019-AI/BIO-13561] through the Youth Employment Initiative (YEI).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133611>.

References

- Arce-López, B., Lizarraga, E., Vettorazzi, A., & González-Peñas, E. (2020). Human biomonitoring of mycotoxins in blood, plasma and serum in recent years: A review. *Toxins*, 12(3), 147. <https://doi.org/10.3390/toxins12030147>
- Barmark, A., Larsson, K., Anttonen, M., Eklund, E., Hald, B., Larsson, B., ... Sippola, E. (1994). Immunoaffinity Column Cleanup/Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins: An Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, 77(1), 46–53. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.1.46>
- Benkerroum, N. (2020). Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 423. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>
- Bradburn, N., Coker, R. D., & Blunden, G. (1995). A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B. *Food Chemistry*, 52, 179–185. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)P4201-P](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)P4201-P)
- Carvajal, M. (2013). Aflatoxin B1 transformation in human adduct AFB1-ADN from foodstuff. *TIP*, 16(2), 109–120. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72082-5](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72082-5)
- Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs., 12 (2006). http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxin_guidance_es.pdf.
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 5 (2006). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf.
- European Commission. (2017). Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. *SANTE/12089/2016*. https://ec.europa.eu/food/system/files/2017_05/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf.
- FAO. (2004). FAO, Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. In *FAO Food and Nutrition Paper no. 81, Food and Agriculture Organization, Rome* (Vol. 81). <https://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>.
- Fredlund, E., Thim, A. M., Gidlund, A., Brostedt, S., Nyberg, M., & Olsen, M. (2009). Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish retail market. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(4), 527–533. <https://doi.org/10.1080/02652030802562912>
- Habschied, K., Krstanović, V., Zđunić, Z., Babić, J., Mastanjević, K., & Šarić, G. K. (2021). Mycotoxins bioccontrol methods for healthier crops and stored products. *Journal of Fungi*, 7(5), 348–373. <https://doi.org/10.3390/jof7050348>
- Holcomb, M., & Thompson, H. C. (1991). Analysis of Aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in Rodent Feed by HPLC Using Postcolumn Derivatization and Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 137–140. <https://doi.org/10.1021/jf00001a026>
- IARC. (1993). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. In: International Agency for Research on Cancer, I. (Ed.). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. In *World Health Organisation, Lyon* (Vol. 56, Issue 489, p. 489). [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)80328-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)80328-5)
- Ibáñez-Vea, M., Martínez, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., & López de Cerain, A. (2011). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market. *Food Control*, 22(12), 1949–1955. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.008>
- Iqbal, S. Z., Mustafa, H. G., Asi, M. R., & Jinap, S. (2014). Variation in vitamin E level and aflatoxins contamination in different rice varieties. *Journal of Cereal Science*, 60(2), 352–355. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.05.012>
- Jettanajit, A., & Nhujak, T. (2016). Determination of Mycotoxins in Brown Rice Using QuEChERS Sample Preparation and UHPLC-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 54(5), 720–729. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv244>
- Wawrzyniak, J. (2021). Model of Fungal Development in Stored Barley Ecosystems as a Prognostic Auxiliary Tool for Postharvest Preservation Systems. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 298–309. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02575-x>
- Kolawole, O., Meneely, J., Petchkongkaew, A., & Elliott, C. (2021). A review of mycotoxin biosynthetic pathways: Associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. *Fungal Biology Reviews*, 37, 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.04.003>
- Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., & Mizaikoff, B. (2005). Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 345–353. <https://doi.org/10.1080/02652030500070192>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2170–2180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- LCtech IAC Data Sheets and Extraction Protocols. (n.d.). Retrieved September 23, 2021, from <http://www.lctech.de/en/downloads/iac-data-sheets-and-extraction-protocols.html>.
- Leite, M., Freitas, A., Silva, A. S., Barbosa, J., & Ramos, F. (2021). Maize food chain and mycotoxins: A review on occurrence studies. *Trends in Food Science and Technology*, 115, 307–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.045>
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, 10(6), 214–233. <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>
- Pellán, L., Dieye, C. A. T., Durand, N., Fontana, A., Strub, C., & Schorr-Galindo, S. (2021). Bioccontrol agents for the screening of weapons against mycotoxigenic fusarium. *Journal of Fungi*, 7(6), 446–475. <https://doi.org/10.3390/jof7060446>
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A. M., Silva, C., Medina, S., & Cámara, J. S. (2019). QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>
- Pulina, G., Battacone, G., Brambilla, G., Cheli, F., Danieli, P. P., Masoero, F., ... Ronchi, B. (2014). An update on the safety of foods of animal origin and feeds. *Italian Journal of Animal Science*, 13(4), 845–856. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3571>
- Qian, M., Yang, H., Li, Z., Liu, Y., Wang, J., Wu, H., ... Xu, J. (2018). Detection of 13 mycotoxins in feed using modified QuEChERS with dispersive magnetic materials and UHPLC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 41(3), 756–764. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700882>
- Ruadrew, S., Craft, J., & Aidoo, K. (2013). Occurrence of toxigenic Aspergillus spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.001>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Salim, S. A., Sukor, R., Ismail, M. N., & Selamat, J. (2021). Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) and LC-MS/MS Analysis for Multi-Mycotoxin in Rice Bran: Method Development. *Optimization and Validation. Toxins*, 13(4), 280–301. <https://doi.org/10.3390/toxins13040280>
- Scott, P. M., Banting, F. G., & Trucksess, M. W. (1997). Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *Journal of AOAC International*, 80(5), 941–949. <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.5.941>
- Şenyuva, H. Z., & Gilbert, J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(2), 115–132. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.042>
- Shen, M. H., & Singh, R. K. (2021). Detoxification of aflatoxins in foods by ultraviolet irradiation, hydrogen peroxide, and their combination - A review. *LWT*, 142, 110986–110992. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110986>
- Spanish Agency for Consumption, F. S. and N. (n.d.). *Micotoxins*. Retrieved September 28, 2021, from http://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subd_etalde/micotoxinas.htm.
- Stroka, J., Petz, M., Joerissen, U., & Anklam, E. A. (1999). Investigation of various extracts for the analysis of aflatoxin B1 in different food and feed matrices. *Food Additives and Contaminants*, 16(8), 331–338. <https://doi.org/10.1080/026520399283902>
- Suárez-Bonnet, E., Carvajal, M., Méndez-Ramírez, L., Castillo-Urueta, P., Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., & Melero-Vara, J. M. (2013). Aflatoxin (B1, B2, G1, and G2) contamination in rice of Mexico and Spain, from local sources or imported. *Journal of Food Science*, 78(11), 1822–1829. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12291>
- Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Nakajima, M., Fujita, K., Norizuki, H., Mochizuki, N., & Takatori, K. (2006). 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), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.10.036>

- Waseem, A., Shah, S. A., Sajjad, A., Siddiqi, A. R., & Nafees, M. (2015). Human exposure to mycotoxins: A retrospective review of leading toxins and metabolites in human biological matrices. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 36(6), 1196–1214.
- Wells, D. A. (2013). Solid-Phase Extraction with Cartridges. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier (pp. 4135–4141). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.04918-0>.
- Zhao, H., Chen, X., Shen, C., & Qu, B. (2017). Development and comparison of single-step solid phase extraction and QuEChERS clean-up for the analysis of 7 mycotoxins in fruits and vegetables during storage by UHPLC-MS/MS. spectrometry. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(2), 255–264. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1266096>

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF AFLATOXINS B1, B2, G1 AND G2 IN COMMERCIAL RICES USING IMMUNOAFFINITY COLUMN CLEAN-UP AND HPLC-MS/MS

Iván Romero-Sánchez, Lorena Ramírez-García, Emma Gracia-Lor* and Yolanda Madrid-Albarrán

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

* Corresponding author: emgracia@ucm.es

Table A1. Validation parameters and method conditions of the current method and other works focused on aflatoxin analysis on cereals and other foodstuffs.

Target analytes	Food Matrix	Methods conditions		Analytical Method	Validation Parameters			Reference
		Extraction Solvent	Clean-up method		Rec (%)	LOD	LOQ	
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2	Rice (Different varieties)	MeOH:H ₂ O (80%:20%)	IAC	HPLC-MS/MS	86, 90, 87, 92	0.09-0.32 ug/kg	0.31 - 1.06 ug/kg	Current method
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2	Brown rice	ACN:H ₂ O:HOAc (50%:50%:5%) with QuEChERS	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	89, 89, 87, 88	0.27 - 0.39 ug/L	0.82 - 1.2 ug/L	Jettanajit and Nhujak (2016)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2	Rodent feed	MeOH:H ₂ O (70%:30%)	IAC	HPLC-FD	85, 77, 85, 58	0,12 - 0,25 ug/L (MDL)		Holcomb and Thompson (1991)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2	Rice (Different varieties)	MeOH:H ₂ O (80%:20%) with NaCl	IAC	HPLC-FD	86 - 95	0,4 - 0,6 ug/kg	1,2 - 1,9 ug/kg	Suárez-Bonnet et al. (2013)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2	Various commodities	MeOH:H ₂ O (70%:30%)	IAC	LC-FD	73-125, 67-170, 76-108, 70-122	-	-	Barmark and Larsson (1994)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2, and others	Various commodities	Various extraction solvents	IAC	Various methods	Review	Review	Review	Şenyuva and Gilbert (2010)
Aflatoxin B1	Various commodities	Various extraction solvents with NaCl or sucrose	IAC	HPLC-FD	75-170	-	-	Stroka et al. (1999)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2, and others	Rice bran	MeOH:H ₂ O (80%:20%) with chloroform and NaCl	DLLME*	LC-MS/MS	75, 70, 81, 75	0,5 - 1 ng/g	1,5 - 3 ng/g	Salim et al. (2021)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2, and Vit. E	Rice (Different varieties)	ACN:H ₂ O (86%:14%) with NaCl	IAC	HPLC-FD	92-93, 91-94, 91-98, 86-94	0,04 - 0,07 ug/mL	0,12 - 0,21 ug/mL	Iqbal et al. (2014)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2, and others	Breakfast cereals	ACN:H ₂ O (70%:30%) with NaCl with KCl	IAC	HPLC-FD	101, 103, 97, 69	0,013 - 0,051 ug/kg	0,05 - 0,2 ug/kg	Ibáñez-Bea et al. (2011)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2, and others	Rice (Different varieties)	ACN:H ₂ O (84%:16%)	IAC	HPLC-FD	-	0,1 ug/kg	-	Fredlund et al. (2009)
Aflatoxins B1, B2, G1 and G2, and others	Vegetable Oil samples	ACN:H ₂ O (85%:15%) with QuEChERS	QuEChERS	HPLC-MS/MS	88-99, 83-100, 84-102, 84-105	0,04 - 0,05 ng/g	0,13 - 0,18 ng/g	Zhao et al. (2017)

*DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)

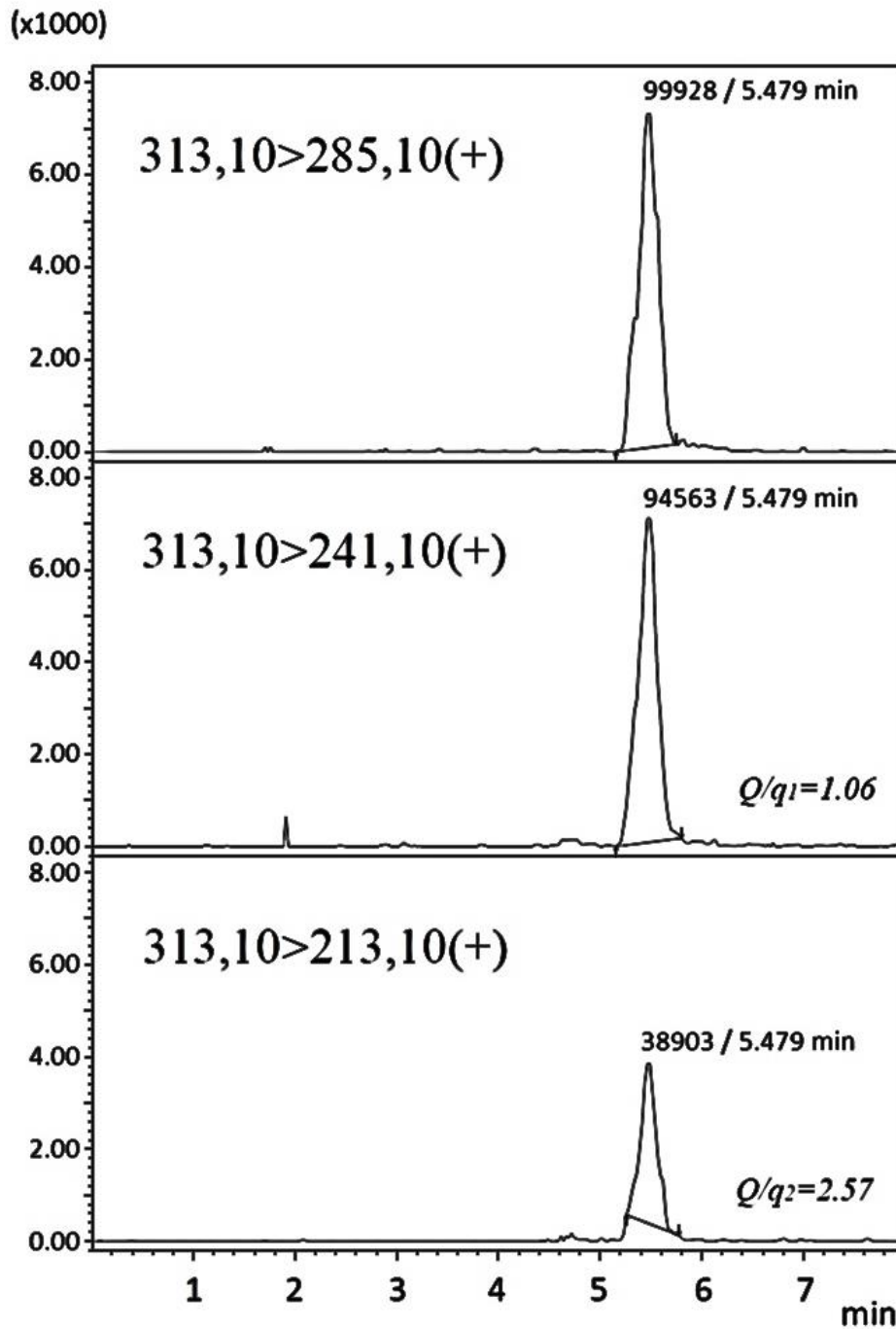


Figure A1. Signal peaks detected and quantified for aflatoxin B1 transitions in Basmati rice sample from Pakistan (sample N° 6). This rice sample was previously spiked at 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with aflatoxins B1, B2, G1 and G2. Quantification transition (Q), confirmation transitions (q_1 and q_2).

Artículo 2: Detoxificación de aflatoxinas mediante tratamiento de cocinado hidrotermal y evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro* a partir de arroz blanco e integral.

Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of in vitro bioaccessibility from white and brown rice.

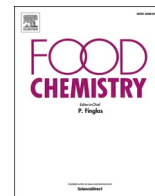
Iván Romero-Sánchez, Emma Gracia-Lor and Yolanda Madrid-Albarrán

Food Chemistry 436 (2024) 137738 (Impact Factor 8.5)

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

CONGRESO DE LA XXIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA. *In vitro digestion model for bioaccessibility determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from spiked rice.* Oviedo, España, julio de 2022. Tipo de comunicación: Póster.

1° INTERNATIONAL WORKSHOP OF THE SPANISH NETWORK ON MYCOTOXINS, TOXIGENIC FUNGI AND THEIR DECONTAMINATION PROCESSES. Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of in vitro bioaccessibility from white and brown rice. Valencia, España, junio de 2023. Tipo de comunicación: Oral



Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of *in vitro* bioaccessibility from white and brown rice

Iván Romero-Sánchez^{*}, Emma Gracia-Lor^{*}, Yolanda Madrid-Albarrán

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Aflatoxins
Rice
Cooking Treatment
In vitro Digestion
Bioaccessibility
HPLC-MS/MS

ABSTRACT

Aflatoxins pose a severe risk to the human health. In this study, the detoxifying capacity of a thermal cooking treatment applied to white and brown rice spiked with aflatoxins B1, B2, G1 and G2 as well as the aflatoxin bioaccessibility in cooked rice after applying an *in vitro* digestion model was evaluated. The cooking treatment (boiling with water at 100 °C for 12 min) evidenced an important extraction capacity of the boiling water over aflatoxins (25 %-56 %), that was higher for brown rice. Moreover, aflatoxins G1 and G2 were unstable with losses around 35 %. The highest bioaccessibility percentage was obtained for white rice (60 %-83 %) compared to brown rice (28 %-47 %), due to aflatoxin losses from brown rice after the gastric step. These results confirm the potential of this thermal cooking treatment to reduce aflatoxins in rice and suggest the influence of the nutritional composition of each rice on aflatoxin behaviour.

1. Introduction

Mycotoxins are toxic secondary metabolites which are produced by some filamentous fungi from *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* genus. The synthesis of these toxins is stimulated under certain environmental conditions such as high temperature and humidity, and other conditions as pH, oxygen content, microbial competition, and nutrients absence, among others (Omara et al., 2020).

Aflatoxins are some of the most studied mycotoxins because they are among the most toxic and exhibit a wide range of acute toxicities (immunosuppression, allergies, or hepatitis) and chronic toxicities (hormonal disorders, infertility, nephrotoxicity, teratogenicity, or carcinogenicity). Their influence on cancer development (with hepatic prevalence) is especially intense in the case of aflatoxin B1 (aflatoxin toxicity order is B1 >> G1 > B2 > G2), that has been classified as a Group I carcinogenic compound by the International Agency Research on Cancer (IARC, 1993).

The main routes of exposure to aflatoxins are ingestion, respiration, and uptake by skin, but ingestion is considered the most frequent and toxic for the organism because of the high presence of aflatoxigenic contaminations on all kinds of food (with special prevalence on vegetable foodstuffs), and the inefficiency of industrial rice processing systems for the total aflatoxin decontamination.

Numerous studies have reported aflatoxin presence in many types of

foods from vegetable origin and, to a lesser extent, from animal origin. In plant foods, aflatoxins B and G are frequent because of the ubiquitous presence of aflatoxigenic molds in the environment which stimulates crops colonization along their grown, harvest, transport, processing, and commercialization (Tirmenstein & Mangipudy, 2014). Moreover, unsuitable conditions of temperature, moisture, and cleaning on store-houses during processing and storage can promote cross-contamination between foodstuffs (Omara et al., 2020). Between vegetarian food, cereals are among the most susceptible to aflatoxigenic molds (Romero-Sánchez, Ramírez-García, Gracia-Lor, & Madrid-Albarrán, 2022). This fact is a matter of concern because cereals are the basis of common diet worldwide, and around 25 % of global grown cereals per year become contaminated by aflatoxins, being rice the second most consumed cereal in the world and one of the most susceptible to aflatoxin contamination (FAO & WHO, 2017). *Aspergillus flavus*, *parasiticus*, *fumigatus* and *candidus* are the most prevalent aflatoxigenic molds that colonize rice (Chandravarnan, Agyei, & Ali, 2022).

Limitations of cereal processing to detoxify aflatoxins is another critical point for oral exposure. In the case of rice, the most typical post-harvest treatments include pre-selection processes to remove contaminated grains, washing, peeling to remove external bran layer (except brown rice), drying, and polishing, with important structural and nutritional differences between white and brown rice (Mohd Esa & Ling, 2016). Typical rice processing techniques can be complemented with

^{*} Corresponding authors.

E-mail addresses: ivaromer@ucm.es (I. Romero-Sánchez), emgracia@ucm.es (E. Gracia-Lor).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137738>

Received 7 May 2023; Received in revised form 28 August 2023; Accepted 10 October 2023

Available online 14 October 2023

0308-8146/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

specific treatments to reduce aflatoxin levels. Thermal treatments are some of the most employed because they are simple and rapid, but their efficacy is limited because of the high thermal stability of aflatoxins, that can resist temperatures up to 237–306 °C, at solid state (Sani, Azizi, Salehi, & Rahimi, 2014). Nevertheless, factors as moisture or high pressure in combination with high temperatures reduce in a significant manner the presence of aflatoxins (Lee, Her, & Lee, 2015). Other physical treatments as ultraviolet light and gamma irradiation and chemical treatments with extreme pH, organic acids, alkaline and oxidant agents can reduce aflatoxin content in rice, but these treatments are usually restricted by the legislation as some chemical agents can compromise rice properties or food safety (chemical treatments are forbidden for organic rice). With regard biologic treatments, some microorganisms absorb and metabolize aflatoxins but their biodegradative mechanism is unknown and complex. In any case, none of the above-mentioned treatments is capable of decontaminate rice completely and they might alter the structure of aflatoxins resulting in masked aflatoxins with reversible structures that can return to the original rather than be eliminated after cooking or human digestion and metabolism (Chandravarnan et al., 2022). These undesirable factors, in addition to the appearance of new fungal contaminations after cereal processing, imply aflatoxin persistence on rice with the subsequent risk for consumers (Ruadrew, Craft, & Aidoo, 2013).

A critical point for aflatoxin decontamination is home cooking of rice, an usual step before rice consumption. Boiling rice in water is one of the most extended and easy cooking rice methods with a demonstrated detoxifying capacity, which is influenced by two factors, the moderate aflatoxin solubility in water, and humid heat from 100 °C (that is the minimal temperature required to boil water and cook the rice) up to 200 °C (when rice is cooked at high pressure or baked). The combination of these factors can cause several effects on aflatoxins such as the cleavage of links that maintain aflatoxins attached to the rice facilitating the release of free aflatoxins to the aqueous cooking phase (aflatoxin stability could be reduced in solution), according to Coomes, Crowther, Feuill, & Francis, 1966. Moreover, this treatment can promote structural alterations from the original aflatoxins to masked structures not detectable during an analysis. However, detoxifying efficiency of this cooking method is highly variable depending on temperature, water volume, time treatment and initial level of contamination (Rustom, 1997). Other heat treatments together with high pressure are effective for aflatoxin decontamination in rice, but these methods are less common, more complex and they usually need specific cooking tools (Je & Kim, 2006).

After cooking, the remaining aflatoxins are ingested and subjected to gastrointestinal digestion, a process that destabilize the structural integrity of food and promote nutrient release and hydrolysis for their subsequent intestinal absorption and distribution through the organism. This physiological process promotes aflatoxin extraction (original and masked) from contaminated food to digestive fluids with different chemical, enzymatic and pH compositions that are sequentially added (salivary, gastric, and duodenal) (González-Arias, Marín, Sanchis, & Ramos, 2013). Moreover, these digestive conditions test the original aflatoxin stability and promote masked aflatoxins reversion to their original structure (Massarolo et al., 2021). Therefore, the combination of the cooking treatment, digestive conditions, food composition, kind of aflatoxin and contamination levels are the main factors that may influence the final aflatoxin bioaccessibility, which is defined as the soluble fraction of aflatoxin that is extracted unmodified from the foodstuff to liquid digestive fluids, and thus susceptible to be absorbed by the cells from the intestinal epithelium (Versantvoort, Oomen, van de Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005).

The objective of this study is to evaluate the detoxifying capacity of a conventional cooking treatment of rice, consisting of a boiling treatment at 100 °C for 12 min in presence of water, and to apply an *in vitro* digestion assay to evaluate the bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 step-by-step from two types of rice (white and brown).

2. Materials and methods.

2.1. Chemicals and materials

Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and formic acid (HCOOH) LC-MS grade for chromatographical analysis were purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) and Scharlab (Barcelona, Spain). ACN and MeOH super gradient grade for extraction and elution, hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) employed for pH adjustment were acquired from Scharlab, and ultrapure water was obtained from a Milli-Q Millipore system (Bedford, MA, USA). Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (QuEChERS) salts combination for aflatoxins extraction after boiling treatment was composed of 4 g magnesium sulphate (Mg₂SO₄), 1 g sodium chloride (NaCl), 1 g sodium citrate (Na₃C₆H₅O₇) and 0.5 g sodium hydrogen citrate hexahydrate (Na₂H₂C₆H₅O₇·6H₂O) and was purchased from Scharlab (QUEXTENAK1 extraction kit reference, purity > 99 %). Solid-phase extraction (SPE) cartridges MAX (150 mg, 6 mL), MCX (150 mg, 6 mL) and HLB (60 mg, 3 mL) were purchased from Waters (Massachusetts, USA) and EB2 cartridges were acquired from Scharlab. All enzymes, organic substances and inorganic salts used for *in vitro* digestion essays (summarized in Table 1) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), except potassium phosphate (KH₂PO₄) and sodium chloride (NaCl), that were acquired from Panreac (Barcelona, Spain), potassium chloride (KCl) from Riedel-de Hën (Seelze, Germany) and sodium sulphate (Na₂SO₄) from Scharlab, all of them with a purity rate > 99 %.

Aflatoxins were acquired from Sigma Aldrich (St. Luis, Missouri, USA): (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19-trioxapentacyclo[10.7.0.0.2,9.0.3,7.0.13,17]-nonadeca-1,4,9,11,13(17)-pentaene-16,18-dione (Aflatoxin B1, ≥97.0 %), (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19-trioxapentacyclo[10.7.0.0.2,9.0.3,7.0.13,17]nonadeca-1,9,11,13(17)-tetraene-16,18-dione (Aflatoxin B2, ≥98 %), 11-methoxy-6,8,16,20-tetraoxapentacyclo-[10.8.0.0.2,9.0.3,7.0.13,18]icosa-1,4,9,11,13(18)-pentaene-17,19-dione (Aflatoxin G1, ≥98 %) and (3S,7R)-11-methoxy-6,8,16,20-tetraoxapentacyclo[10.8.0.0.2,9.0.3,7.0.13,18]icosa-1,9,11,13 (18)-tetraene-17,19-dione (Aflatoxin G2, ≥98 %). Stock solutions of each aflatoxin were prepared by dissolving the aflatoxin in ACN, giving a final concentration of at 100 mg/L. A stock working solution was prepared by mixing the four individual aflatoxin solutions in ACN at 25 mg/L. These solutions were maintained at –20 °C in darkness.

2.2. Rice samples

Two different rice samples (white and brown) were selected for this study, both grown in Valencia and marketed in Spanish supermarkets in Madrid (Spain). The samples were maintained at room temperature in darkness until the essays. These blank samples were spiked with the four aflatoxins prior to the essays, as it was not possible to acquire natural contaminated rice samples with the aflatoxins and due to the high dilution rates of the aflatoxins that were reached along the addition of digestive fluids to the samples.

2.3. Instrumentation

Sample analysis was performed by HPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS-QTOF. For the chromatographic separation, an Agilent 1200 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used, that it was equipped with a G1312A binary pump, a G1329A degasser, a G1329A automatic thermostatic injector and a G1316A thermostatic module column. A reversed-phase Synergy™ Fusion C18 Column (150 mm × 3 mm, ID 4 µm, pore size 80 Å) purchased from Phenomenex, Torrance, CA, USA, was employed. Sample injection volume onto the column was 5 µL and the flow rate was set at 0.5 mL/min at 40 °C. Mobile phase consisted of eluent A (ultrapure water with formic acid at 0.1 %) and eluent B (pure ACN with formic acid at 0.1 %). The percentage of eluent B changed linearly as follows: 0 min, 30 %; 7 min, 60 %; 8 min, 100 %; 12 min, 100 %.

Table 1Chemical and enzymatical composition of salivary, gastric, and duodenal juices applied during *in vitro* digestion procedure.

	Salivary Juice		Gastric Juice		Duodenal Juice	
	Component	Final Concentration (g/L)	Component	Final Concentration (g/L)	Component	Final Concentration (g/L)
Inorganic Salts	NaCl	1.82	NaCl	4.26	KCl	0.34
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.47	KCl	1.16	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.55
	Na ₂ SO ₄	4.57	KH ₂ PO ₄	0.41	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.24
	NaHCO ₃	0.64			NaHCO ₃	0.96
	KCl	1.62				
	KH ₂ PO ₄	2.00				
*Organic Compounds	Mucin	2.53	Mucin	4.38	Urea	0.32
	Urea	0.29			**Bile Salts	0.93
	Uric Acid	0.032				
*Enzymes	α-amylase	1.10	Pepsin	1.60	Pancreatin	0.90
					Trypsin	0.24
Final pH	6.8 ± 0.2		1.8 ± 0.2		8.2 ± 0.2	
Final Temp. (°C)	37		37		37	

* Organic compounds and enzymes were added to the juices just before the fluid application to the rice.

** Bile salts are composed by sodium cholate and sodium deoxycholate (1:1).

%; 13 min, 30 %; 17 min, 30 %.

For analytes detection and quantification, a triple quadrupole spectrometer MS/QQQ (LCMS-G6410B, Agilent, Santa Clara, CA, USA) with an electrospray ionization (ESI) source was used. Analysis were done in positive electrospray ionization mode by using the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode at the following conditions: ESI capillary voltage at 4000 V; fragmentor voltage at 152 V; nebulizer at 55 psi; drying gas with flow rate of 12 L/min at 300 °C; chamber current at 0.16 μA; dwell times of 100 ms were selected for the transitions of AFB1, AFB2 and AFG1, and 150 ms for AFG2. Selected transitions, collision energies (CE), and retention times for each compound are specified on [Table S1](#) from [Supplementary Material](#).

To identify possible secondary species produced from aflatoxins during cooking treatment, a quadrupole time of flight mass spectrometer MS/QTOF (G6530A Accurate Mass Q-TOF, Agilent, Santa Clara, CA, USA) with electrospray ionization source (ESI) at atmospheric pressure with JetStream technology was used. Source parameters were as follows: positive ESI mode with capillary voltage at 3500 V; fragmentor voltage at 150 V; nebulizer at 25 psi; drying gas with flow rate of 10 L/min at 325 °C; sheath gas with flow rate of 6 L/min at 250 °C. MS data were acquired over an *m/z* range of 100–1200, acquisition rate of 2 spectra/s and time acquisition of 500 ms/spectrum.

Agilent MassHunter Workstation Software was employed for data acquisition and qualitative analysis (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

2.4. Boiling treatment of rice samples

20 g of each rice (white or brown) were spiked at two concentration levels (5 μg/kg and 10 μg/kg) with a mixture of the four aflatoxins, samples were then dried under a gentle nitrogen stream for 1 h and incubated overnight at room temperature in darkness. Spiked rice samples were added to 150 mL of pure water previously heated at 100 °C ± 5 °C, and the mixture was incubated at this temperature for 12 min and shake with glass rod every minute. After the treatment, the boiled rice and boiling water were separated for the analysis of each component separately. The aqueous extract was centrifugated at 11000 rpm for 10 min and diluted with ultrapure water at a final volume of 100 mL (the initial water volume was approximately reduced to half during the cooking treatment). Then, an aliquot of 10 mL of the extract was taken, diluted at 1:2 rate with ultrapure water and loaded onto a MAX SPE cartridge (previously conditioned with 6 mL MeOH and 6 mL water) under vacuum. The cartridge was washed with 20 mL of water, dried

with an air stream applied with a syringe and afterwards aflatoxins were eluted with 6 mL ACN. The elution solvent was evaporated to dryness with a nitrogen stream. Simultaneously, the aflatoxins present in the boiled rice were extracted with 120 mL of ACN using a magnetic stirring at 1000 rpm for 30 min. Then, a QuEChERS salts mixture was added to the extract to remove the aqueous residues and the extract was incubated in magnetic stirring about 5 min. Next, the extract was left to stand for other 5 min to promote rice and salts sedimentation. The organic supernatant was taken and centrifugated at 11000 rpm for 10 min, and a 12 mL aliquot from the supernatant was taken and evaporated to dryness under a nitrogen stream. Finally, the dry extracts obtained from cooking water and rice were reconstituted with 100 μL of ultrapure water for HPLC-MS/MS analysis.

2.5. Aflatoxins thermal treatment

To confirm whether the boiling treatment applied to the rice in [section 2.4](#). (i.e., 100 °C for 12 min) could transform pure aflatoxins in the absence of rice, 150 mL of ultrapure water was spiked with each aflatoxin stock solution by separate and with the mixture of the four aflatoxins at an initial concentration of 67 μg/L. The five spiked solutions were boiled at 100 °C for 12 min and the remaining volume after cooking was cooled and diluted to a final volume of 100 mL (the initial water volume was approximately reduced to half during the cooking treatment). An aliquot of this volume at final concentration of 100 μg/L was analyzed by HPLC-MS/QQQ and HPLC-MS/QTOF.

2.6. *In vitro* digestion model

In vitro digestion model is an assay that simulates the physiological conditions that take place during human gastrointestinal digestion. For this purpose, solutions with different chemical and enzymatical composition were prepared to simulate the original properties of the salivary, gastric, and duodenal fluids, and were added sequentially on the foodstuff. In each step, the mixture was homogenized and incubated at different times. The salivary, gastric, and duodenal steps were selected because they are considered the most representative and decisive steps involved in human digestion. In this work, the digestive model applied by [Versantvoort et al., 2005](#) was taken as a reference with specific modifications to adapt the model to rice.

For this essay, white and brown rice samples were previously cooked as described in [section 2.4](#) (boiling at 100 °C for 12 min, 1 g rice / 7.5 mL water). Next, the boiling water was removed and a portion of boiled rice

equivalent to 2.5 g of dry weight rice was taken and spiked with 10 µg/kg and 20 µg/kg of a working solution containing a mixture of the four aflatoxins dissolved in ACN. The spiked rice samples were dried under a nitrogen stream for 30 min to completely dry the organic solvent and incubated overnight at 4 °C in darkness to promote the maximum interaction and conjugation rate between the analytes and the cooked rice. Next, an *in vitro* digestion model was applied to each rice sample (summarized on [Figure S1](#) from [Supplementary Material](#)) with a sequential addition of each artificial digestive fluid previously prepared (the composition of the digestive fluids is detailed in [Table 1](#)). The digestive incubations were performed with a MaxQ 4000 orbital shaker (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) with agitation at 200 rpm at 37 °C in darkness for all the digestive steps. Firstly, 5 mL of the salivary fluid was applied to the cooked rice, homogenized by vortex the pH adjusted at 6.8 and the mixture was incubated during 15 min. Next, 12 mL of the gastric fluid was added to each sample, the mixture was vortexed, the pH extract adjusted at 1.8 and incubated for 2 h. Finally, 17 mL of the duodenal fluid was added to the mixture, vortexed, the pH was adjusted again at 8.2 and the final extract (*quimo*) was incubated for 2 h.

2.7. Digestive extracts clean-up

To determine the bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 extracts the salivary, gastric, and duodenal steps were taken and centrifuged at 11000 rpm for 10 min. The supernatants were frozen quickly at -80 °C for 30 min to promote a thermal shock that denatured the digestive enzymes. Aliquots of different volume were taken from each digestive step (2 mL from salivary, 3.4 mL from gastric and 6.8 mL from duodenal extracts), the final pH was adjusted to 7, all the extracts were diluted at 1:5 with water and loaded onto a MAX SPE cartridge (previously conditioned with 6 mL MeOH and 6 mL water). Cartridges were washed with 20 mL of water, dried with an air stream applied with a syringe, analytes were eluted with 6 mL of ACN drop by drop, the elution solvent was evaporated to dryness with nitrogen stream and the extracts were reconstituted with 100 µL of water for HPLC-MS/MS analysis.

2.8. Analytical performance

The linear range and recoveries for each aflatoxin were tested with a matrix-matched calibration curve by least squares linear regression representation, that was prepared with not spiked rice samples (blank) subjected to each essay, and then each type of extract (the cooking water and the digestive steps) and the cooked rice were spiked at different concentration levels before the clean-up. The calibration curve was prepared in this way to correct the aflatoxin losses caused exclusively by clean-up methods and matrix effect. R² was obtained from these calibration curves, LOD and LOQ were calculated from the lowest point of the matrix-matched calibration curves for a signal-to-noise (S/N) ratios of 3 and 10, respectively. To obtain the final aflatoxin recoveries after the essays, rice samples were spiked by triplicate at two concentration levels (5 µg/kg and 10 µg/kg for the cooking treatment, 10 µg/kg, and 20 µg/kg for the *in vitro* digestion) before the treatments, and the peak areas of the final purified extracts were interpolated on the calibration curve to obtain the final experimental aflatoxin (AF) quantity. The calculation of the recovery and bioaccessibility percentages for each aflatoxin are estimated as follows:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Experimental AF quantity after treatment}}{\text{Theoretical AF quantity expected without losses}} \times 100$$

Clean-up recoveries were estimated from the areas of the blank extracts that were spiked after each treatment regarding the blank extracts spiked after the clean-up, as follows:

$$\% \text{ Clean-Up Recovery} = \frac{\text{AF Area Extract (spiked after treatment)}}{\text{AF Area Extract (spiked after Clean-Up)}} \times 100$$

Finally, precision was evaluated in terms of standard deviation of the replicates at both spiked levels. Statistical analysis of the results was performed by using Statgraphics Centurion software, version 19, running under Windows 10. A p-value < 0.05 indicated statistical significance.

3. Results and discussion

In this work, the behavior of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 has been evaluated in spiked white and brown rice in response to a boiling treatment at 100 °C for 12 min in presence of water, on the one hand, and an *in vitro* digestion simulation, on the other hand. Each process was studied independently to confirm its individual effect over aflatoxins in spiked rice. White and brown rice have been selected due to the structural and nutritional differences between both types of rice, based on the fact that the outer bran layer (the part most exposed to aflatoxin contamination) is removed from white rice but remains in brown rice during rice processing, to test if this fact can affect the behavior of aflatoxins.

3.1. Rice cooking treatment

White and brown rice samples previously spiked with aflatoxin B1, B2, G1 and G2 at two levels (5 µg/kg and 10 µg/kg) and then were cooked with boiling water (100 °C) for 12 min. Some specific cooking conditions as the time duration and the volume of water used were previously optimized in order to achieve a proper cooking of the rices without losing the cooking water. The final aqueous boiling extract and cooked rice were analyzed separately to quantify the presence of aflatoxins in each phase, and to determine the potential analyte losses due to the treatment (calculated as the difference between the initial aflatoxin quantity and the final aflatoxin quantity in both phases). As the results obtained were similar regardless the spiking levels for all aflatoxins, the highest spiking level results were represented in [Fig. 1](#). The percentage of aflatoxins present in the boiling extract and in the cooked rice after the treatment at both 5 µg/kg and 10 µg/kg spiking levels are shown on [Figure S2](#) in the [Supplementary Material](#).

For an adequate interpretation of the results obtained after the boiling treatment, two statistical analyses were performed. Firstly, a multifactorial analysis of variance (ANOVA) was applied (see [Fig. 2A](#)). ANOVA establishes the individual contribution of each factor involved in the cooking treatment (i.e., type of rice, type of aflatoxin, spiking level, recovery phase and losses), and the possible significant interactions between the factors (with p-values < 0.05 at 95 % confidence level). According to this analysis, only the factor that involves the recovery phase (i.e. aflatoxins recovered in the boiling extract and the cooked rice) and losses of aflatoxins were statistically significant. [Fig. 2A](#) also shows the statistical differences between the components from this factor, specifically between the aflatoxins that are lost and those recovered in the boiling extract and cooked rice, but not between the aflatoxins recovered in the boiling extract and those recovered in the cooked rice (homogeneous groups). These differences were confirmed with a Fisher Least significant difference (LSD) test ([Figure S3](#) in the [Supplementary Material](#)) that demonstrated an asymmetric distribution between the aflatoxin recovered and the aflatoxins lost after the cooking treatment. By contrast, the rest of individual factors (i.e. type of rice, type of aflatoxin and spiking level) were not statistically significant (p-values > 0.05). However, multifactorial ANOVA showed significant interactions of the factor that involves the recovery phases and losses with the other two factors (type of rice and type of aflatoxin), but not between the type of rice and the type of aflatoxin factors. That is, aflatoxin distribution in the boiling extract, cooked rice and losses during the boiling

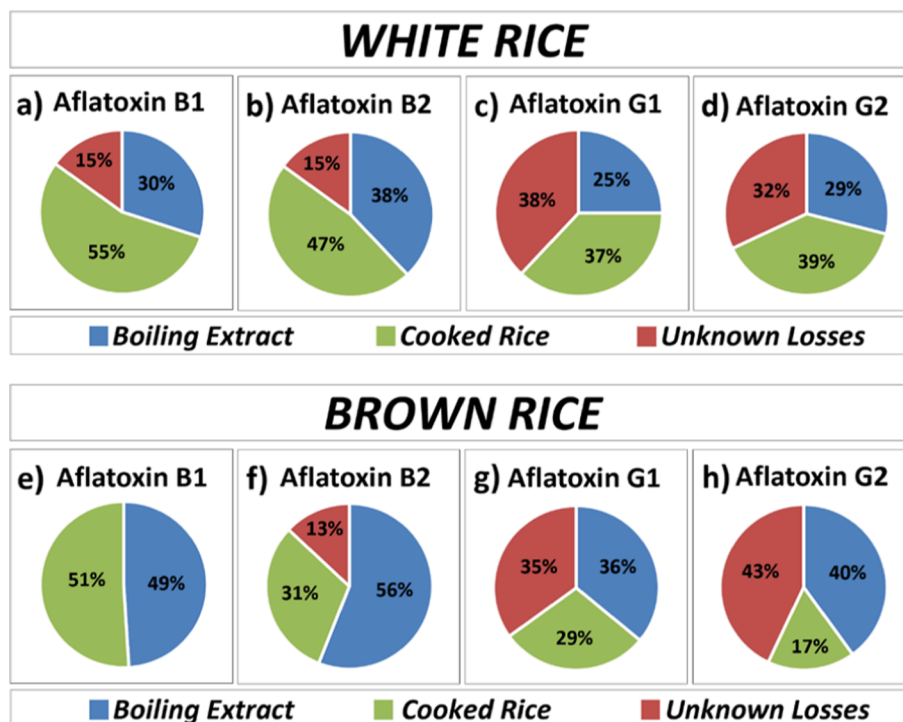


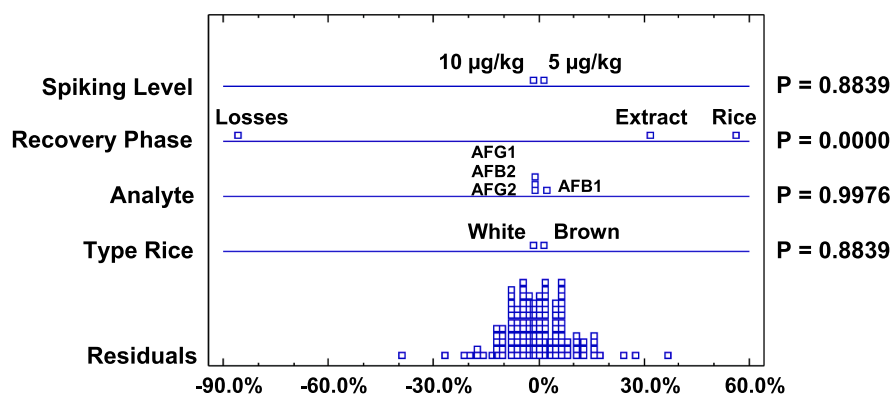
Fig. 1. Graphical representation of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 percentages present in the boiling extract (blue), cooked rice (green), and losses (red), after the cooking treatment at 100 °C for 12 min applied to white rice (a, b, c, d) and brown rice (e, f, g, h), previously spiked with each aflatoxin at 10 µg/kg.

treatment is dependent on the aflatoxin and the rice type. The interactions between the above factors are in agreement with recoveries from Fig. 1, because aflatoxin losses values are really variable depending on the type of aflatoxin in both white and brown rice (losses of 15%–0% for AFB1 and 15%–13% for AFB2 in contrast with 38%–35% for AFG1 and 32%–43% for AFG2), and aflatoxin recovery values between the boiling extract and the cooked rice show an inverse trend depending on the type of rice, with a lower presence of aflatoxins in the boiling extract for the white rice (30%, 38%, 25% and 29% for aflatoxins B1, B2, G1 and G2, respectively) that is reverted towards a major presence in the boiling extract for brown rice (49%, 56%, 36% and 40% for aflatoxins B1, B2, G1 and G2), to the detriment of those recovered in the cooked rice (especially in the case of AFB2, AFG1 and AFG2).

To complete the statistical analysis, a principal component analysis (PCA) was applied to the average recoveries of each aflatoxin at 10 µg/kg in both types of rice, to interpret the variability of these results for each recovery phase (the boiling extract and the cooked rice) and aflatoxin losses after the cooking treatment. For this purpose, lineal combinations up to three variables were made to obtain two final statistical components whose combination could explain about 100% of the variability of the results, 62% through component 1 (higher weight), and the remaining 38%, through component 2 (lower weight). This analysis is graphically represented as a 2D bigraphic dispersion diagram on Fig. 2B. Firstly, PCA analysis showed that the variability of aflatoxin loss had the higher influence over component 1 (being the phenomenon with the greatest influence on aflatoxin behavior variability during cooking treatment); by contrast, the variability of the recovery in the boiling extract and the cooked rice had similar influence over the two components from the model. With respect to the analytes observed in the diagram in Fig. 2B, AFG1 and AFG2 had a major trend to be lost in both types of rice, in contrast with AFB1 and AFB2, that were more influenced by the recovery in the cooked white rice or in the boiling extract in the case of AFB2 in brown rice (this trend could be also observed to a lesser degree for AFG1 and AFG2). The only exception is was AFB1 from brown rice, which was similarly influenced by the recoveries in the boiling extract and in the cooked rice.

The results detailed above confirm a moderate extractive capacity of the water at high temperature (100 °C), capable to extract 30% (AFB1), 38% (AFB2), 25% (AFG1) and 29% (AFG2) of aflatoxins present in the white rice, a trend that increases even more in the brown rice with extractions of 49% (AFB1), 56% (AFB2), 36% (AFG1) and 40% (AFG2) to the cooking water. This extractive power is related to a moderate polarity of aflatoxins (Tahir et al., 2018). More specifically, the average water solubility at 25 °C is about 16.14 mg/L for AFB1, 24.9 mg/L for AFB2, 3.2×10^3 mg/L for AFG1 and 3.3×10^3 mg/L for AFG2, as reported by the United States Environmental Protection Agency (EPA) (2012). However, other authors confirmed solubilities up to 50–90 mg/L in water for AFB1 (Garcia, Blanco, & Suarez, 1994). In our previous study (Romero-Sánchez et al., 2022), up to 20% of AFB1 was extracted from white rice at room temperature and this percentage can increase up to 40% for AFB1 detoxification in other cereals, as Hwang & Lee, 2006 demonstrated with wheat seeds soaked several times at room temperature. Moreover, if the aqueous extraction of aflatoxin occurs at high temperature, the thermal energy can break specific interactions between the aflatoxins and rice, improving their extraction towards the aqueous phase. Many studies have probed the effectiveness of the thermal treatments in the presence of water to reduce aflatoxin content between 25% and 88% (Santos et al., 2022), which is an excessively wide range of effectiveness considering the high aflatoxin toxicity, that is consistent with the sum of aflatoxin extractions and losses from rice after the cooking treatment of our study. According to our results, the cooking treatment applied has higher detoxifying capacity than other similar cooking treatments as those carried out by Sani et al., 2014, that removed 18% and 25% of total aflatoxins naturally present in rice after two different treatments, the first by humid thermal cooking for 10 min, and the second by steam cooking for 30 min, both treatments with temperatures above 100 °C. By contrast, other works achieved a higher reduction between 84% and 88% for AFB1 from spiked basmati rice applying different water volumes (Hussain & Luttfullah, 2009), or da Silva, Massarolo, Kupski, & Furlong, 2019, who reduced aflatoxin B1, B2, G1 and G2 content from spiked white rice and brown rice between 76% and 95%, by thermal cooking treatments with water, the first by

A) Multifactorial ANOVA - Boiling Treatment



B) 2D Bigraphic PCA - Boiling Treatment

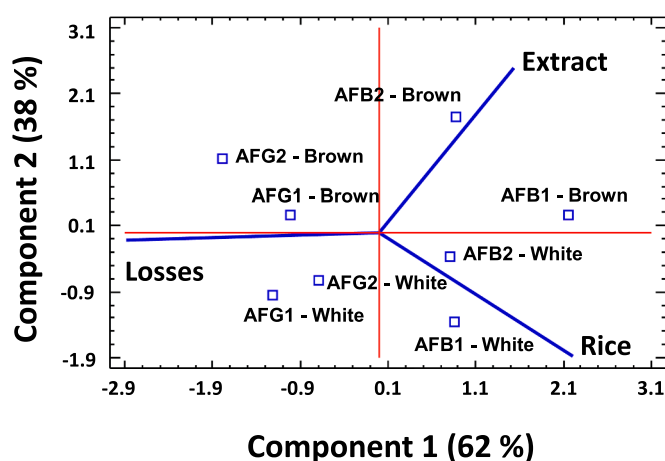


Fig. 2. Statistical analysis performed to interpret aflatoxin percentage recoveries from rice cooking treatment: **A)** Multifactorial ANOVA plot for type rice (white and brown), analyte (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2), recovery phase (boiling extract, cooked rice, and losses) and spiking level (5 µg/kg and 10 µg/kg) as factors evaluated, residuals and p-values obtained. **B)** 2D bigraphic of dispersion diagram and component weights obtained through a PCA applied to white and brown rice samples spiked with AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 at 10 µg/kg.

microwave cooking for 8–15 min, and the second by baking at 180 °C for 15–25 min. However, these studies did not analyze the boiling water, only the cooked rice. The differences between the studies suggest that the effectiveness of the cooking treatments for detoxifying aflatoxins can be influenced by factors such as temperature, cooking time, type of contamination (naturally present or artificially spiked), rice spiking level, water volume employed or water phase (liquid water boiling, steam cooking, i.e.) (Rustom, 1997).

Extractive differences in boiling water between white and brown rice could be related to the nature and the stability of the interactions established between each toxin and the main nutritional components presents on the rice surface (according with the manufacturer, brown rice contains 2.6 g of dietary fiber per 100 g of total weight whereas white rice lacks dietary fiber). A possible hypothesis to explain this trend is that, whereas white rice is mainly composed by starch, a relatively polar polysaccharide with high branching level according to Trucksess, Abbas, Weaver, & Shier, 2011, brown rice maintains the outer bran layer of fiber, composed by cellulose (main component), hemicellulose and lignin, forming an insoluble and less branched structure than starch on the rice surface that is in contact with the aflatoxins (artificially spiked) (Mohd Esa & Ling, 2016). Considering that aflatoxins released from the

spiked rice to the cooking water increases in brown rice and, eventually, no losses were detected for AFB1 in this type of rice (compared with a loss of AFB1 of 15 % in white rice), two different hypotheses could be plausible. Firstly, that interactions between the aflatoxins and the surface components of brown rice (bran layer) were weaker and easier to break than those established with starch in white rice. Another hypothesis to explain the higher retention of the aflatoxins in white rice could be due to the starch (the main rice component), initially insoluble in water, which significantly increases its polarity by hydration at high temperatures, provoking the gelatinization of starch, with a partial loss of the integrity of the grain that promotes an increase of the capacity of the starch to adsorb aflatoxins and their migration to the inner parts of the rice endosperm (similarly to other toxins and nutrients as vitamins and salts). This phenomenon could hinder aflatoxin diffusion to the cooking water, according to Chandravarman et al., 2022 and Trucksess et al., 2011. Nevertheless, although some components of the superficial layer of rice bran as cellulose could suffer the same effect, their greater structural rigidity and their aqueous insolubility considerably reduce their hydration capacity, decreasing the loss of the integrity of the brown grain during the cooking treatment. This limits the interactions between the gelatinized starch in the inner layers of brown rice and

aflatoxins due to the presence of the bran layer (Ghasemi, Tsianou, & Alexandridis, 2017). These differences were not in accordance with da Silva et al., 2019, who obtained similar aflatoxin reductions between white and brown rice, although different conditions in the thermal treatment were applied. This clearly demonstrates that the cooking conditions are decisive for the recovery of aflatoxins.

3.1.1. Evaluation of the thermal treatment on the analytes

To confirm if the cooking treatment conditions can influence aflatoxin losses apart from the aflatoxin-rice interactions influence, the cooking treatment was carried out without rice, i.e. aflatoxins were added to water, then it was boiled at 100 °C during 12 min (to exclude the rice-analyte interaction factor). Analysis by HPLC-MS/MS/MS showed the following recoveries for each aflatoxin (without significant differences when the aflatoxins were spiked individually and when a mixed of the four aflatoxins was used): 102 ± 6 % for AFB1, 101 % ± 3 % for AFB2, 67 % ± 1 % for AFG1 and 65 % ± 3 % for AFG2. These results demonstrated that the cooking treatment in water did not have any effect over AFB1 and AFB2 integrity, whereas this treatment provoked losses of 33 % for AFG1 and 35 % for AFG2. These results are consistent with AFG1 and AFG2 losses after cooking treatment of both types of rice. Analysis was also carried out by HPLC-MS/TOF leading to the same recoveries. No additional peaks were observed in the chromatogram after the cooking treatment (Fig. 3).

Thus, the absence of new fragments allowed us to confirm that the cooking treatment did not have any effect on the formation of new species due to aflatoxins G degradation. Total recovery of AFB1 confirmed the high thermostability of this structure according with other works as Raters & Matissek, 2008, that demonstrated that AFB1 was stable after thermal treatments at 150 °C–180 °C for 30 min with dry heat, or Sadiya, Dykes, & Deng, 2016, who reported that AFB1 break down was only possible at 200 °C. According to our study, AFB2 is also thermostable in our treatment conditions. This might be explained by its high similarity with AFB1, in contrast to other works as Diaz, Cepeda, & Martos, 2012, that found that AFB2 was more unstable than AFB1 because of the additional unsaturated bound between 8 and 9 carbons. On the other hand, similar losses for AFG1 and AFG2 are in accordance with their losses in white and brown rice. This confirms that the cooking treatment is capable to break down these toxins regardless of the interactions established between these toxins and rice. Moreover, a partial evaporation of aflatoxins G1 and G2 can be discarded as the cause of the unknown losses because aflatoxins vapor pressure is low, and aflatoxins G have vapor pressures up to 15 times lower than aflatoxins B, according with the United States Environmental Protection Agency (EPA) (2012). Then, aflatoxins G have less structural stability than aflatoxins B under the tested conditions. The instability of aflatoxins G has been reported in aqueous solvents in other works as Garcia et al., 1994 and Diaz et al., 2012, among others. The lack of stability of aflatoxins G regarding aflatoxins B could be caused by the high oxidation and degradation trend that suffer their additional six-membered lactone ring (Elizalde-Gonzalez, Mattusch, & Wennrich, 1998). Moreover, this substituent is also especially reactive to nucleophilic attack by water in the presence of energy (Coomes et al., 1966), and then, high temperature in combination with water might cause the hydrolysis and opening of the lactone ring, in turn causing a general destabilization of the molecule resulting in countless random degradation fragments, in accordance with Raters & Matissek, 2008, Song et al., 2022 and Kabak, Dobson, & Var, 2006.

Finally, additional aflatoxin losses after the cooking treatment could be explained based on unspecific interactions between the analytes and polysaccharides which are present on the rice surface (Chandravarnan et al., 2022). Depending on the nature of these interactions, initial stability of aflatoxins could be reduced differently according to the nutritional composition of each rice, as Raters & Matissek, 2008 experimentally demonstrated.

3.2. In vitro digestion method

In this essay, white and brown rice samples (previously cooked as detailed in section 2.5) were spiked with aflatoxins B1, B2, G1 and G2 at 10 µg/kg and 20 µg/kg, and then were subjected to an *in vitro* digestion process by the sequential addition of the salivary, gastric, and duodenal fluids. Then, the soluble fraction from each digestive step was separated, purified, and analyzed for bioaccessibility determination. For discussion, bioaccessibility values at the highest aflatoxin spiking level will be used (represented as percentages in Fig. 4), because of their higher reproducibility between replicates, so they were considered as the most representative of the trend. The bioaccessibility percentages at both spiking levels for both type of rice are represented in Figure S4 in the Supplementary Material.

The results were processed by multifactorial ANOVA to evaluate the individual significant contribution of each factor involved in the treatment (i.e. rice, analyte, digestive step, and spiking level), the statistical differences between the factors and among groups for each factor (Fig. 5A). Multifactorial ANOVA treatment confirmed that all the factors involved on *in vitro* digestion are statistically significant (p -values < 0.05) on the bioaccessibility of the aflatoxin, and statistically significant differences were observed between the following factors: rice - analyte; rice - digestive step; analyte - digestive step; and digestive step - spiking level. Finally, significant differences were found among all the groups comprising each significant factor, except between AFB1 and AFG1 from analyte factor (only homogeneous groups). Differences between groups from each significant factor were confirmed by a Fisher LSD test (Figure S5 from Supplementary Material).

The behavior observed in the ANOVA test confirmed the differences observed in Fig. 4 between white and brown rice (especially on the gastric and duodenal steps, with higher recovery values for the white rice); analytes (with different recoveries for each aflatoxin but similar between aflatoxins type 1); digestive steps (different recovery values between the steps). Differences between the spiking levels were also observed in Figure S4 in the Supplementary Material (especially between both spiking levels in white rice at duodenal step, confirming the election of higher spiking level for discussion, in addition to the higher deviation between replicates from the lower spiking level).

Simultaneously, a PCA was applied to the average of each aflatoxin at the highest spiking level tested (20 µg/kg) in both types of rice, through the extraction of two final components whose combination explained about 99 % variability, 65 % by component 1 of majority weight, and 33 % by component 2 of minority weight (graphically represented on Fig. 5B). This statistical analysis showed that the gastric and duodenal steps had higher influence over the component 1, whereas the salivary step influenced mainly the component 2. Therefore, the gastric and duodenal steps had the highest influence on the variability of the digestion treatment results. Regarding the behavior of the analytes, bigraphic of dispersion diagram from Fig. 5B showed a decisive influence of the gastric and duodenal steps on the bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from white rice (slightly higher for type 2 aflatoxins). By contrast, the salivary step showed a higher influence over aflatoxins B2 and G2 from brown rice, whereas all the digestive steps had a similar influence on the bioaccessibility of aflatoxins B1 and G1 from brown rice.

In general, aflatoxins have higher final bioaccessibility from white rice (60 %–83 % after the duodenal step) than from brown rice (28 %–47 % after the duodenal step). Moreover, type 2 aflatoxins showed higher bioaccessibility than type 1 aflatoxins in all digestive steps from both types of rice. These results are consistent with the work of da Silva et al., 2019, that obtained bioaccessibility values around 59 % for aflatoxins from white rice and around 34 % from brown rice, in both cases after cooking the rice. However, they observed important differences for bioaccessibility among aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in both types of rice, whereas our study confirmed a more uniform behavior. Differences between both studies could be determined by the specific conditions of

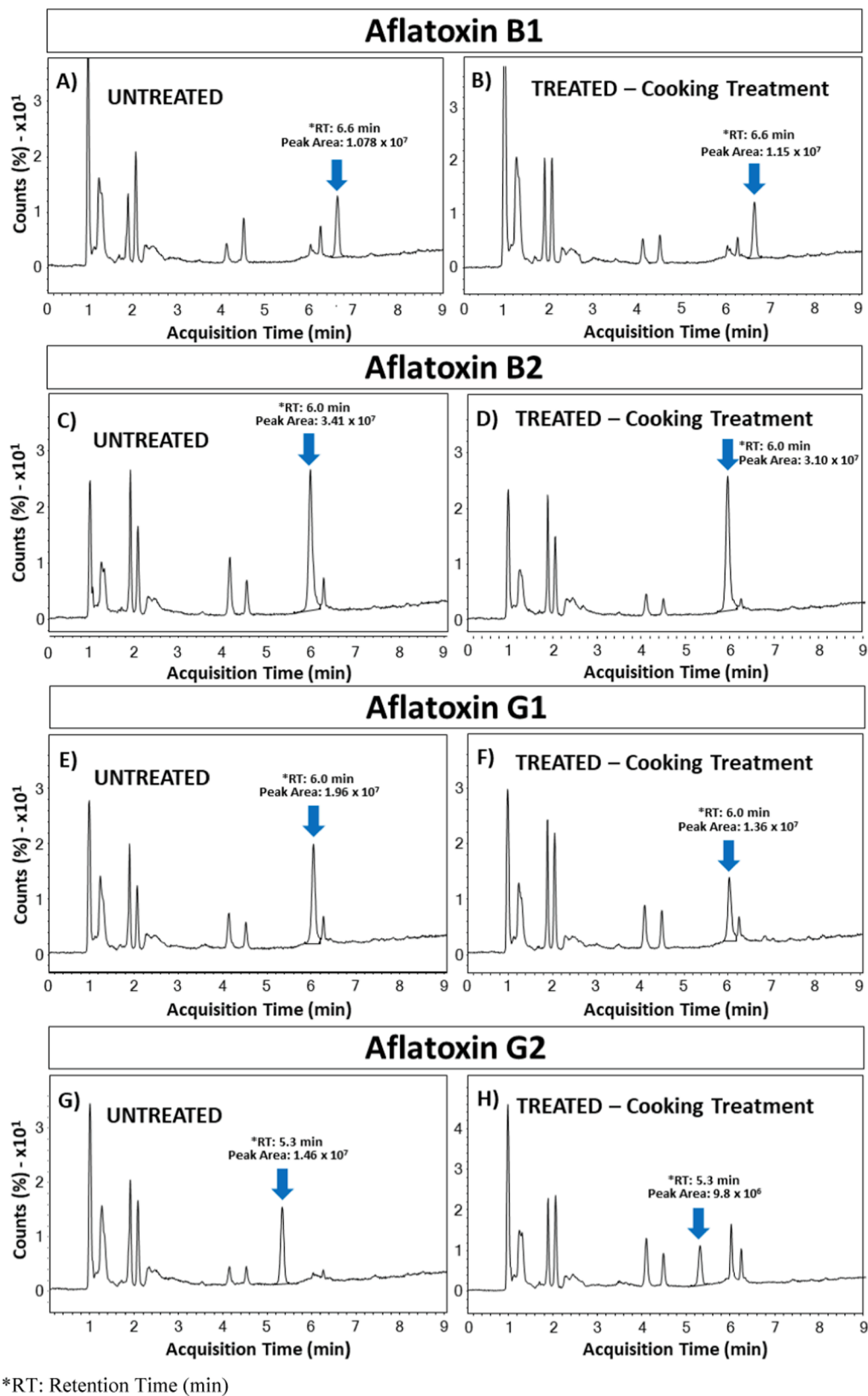


Fig. 3. Total Ion Chromatograms obtained by HPLC-QTOF analysis from individual aflatoxins B1, B2, G1 and G2 untreated (A, C, E, G), compared with those subjected to the boiling treatment (B, D, F, H). *RT: Retention Time (min).

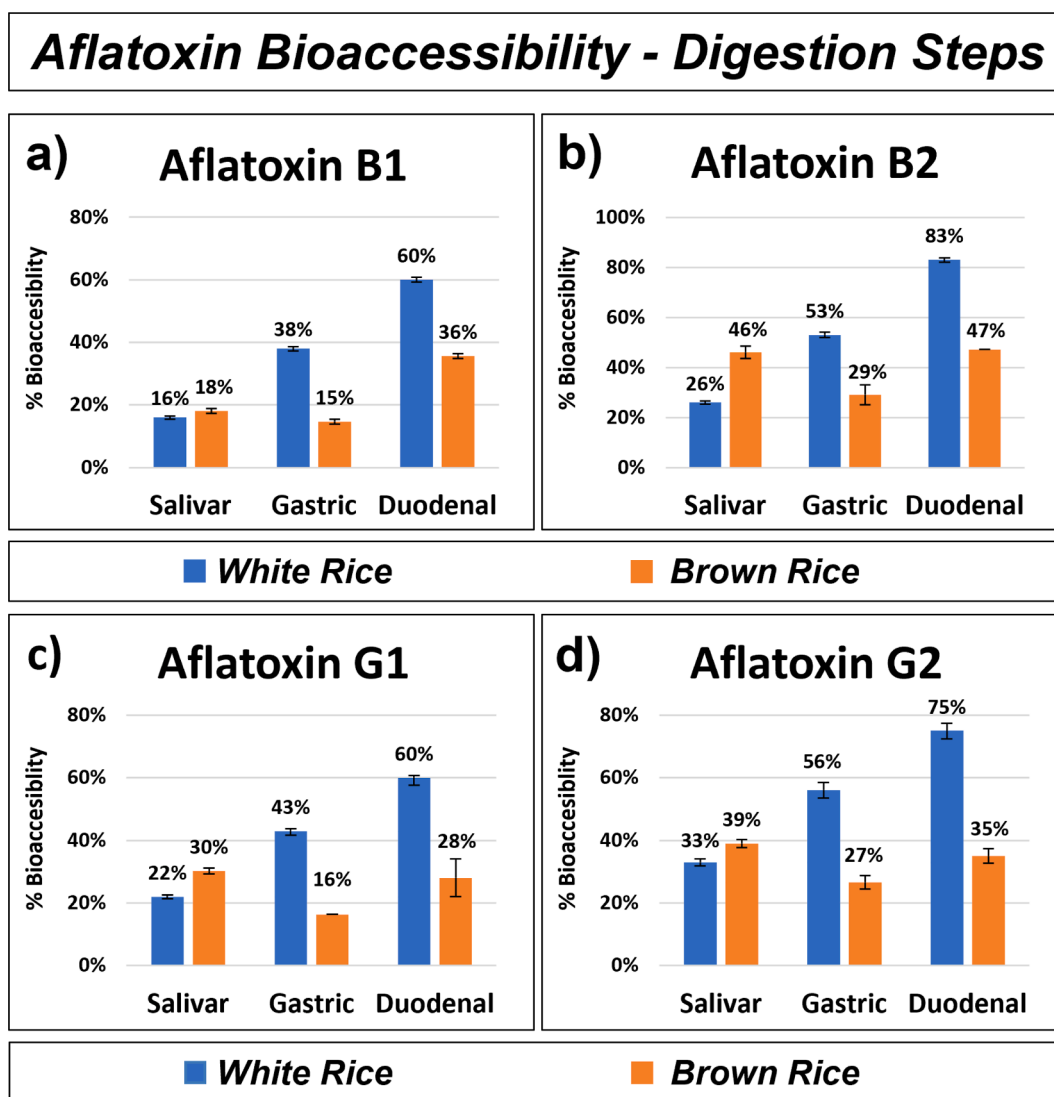


Fig. 4. Graphical representation of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 bioaccessibility percentages obtained in the salivary, gastric, and duodenal extracts after *in vitro* digestion applied to white rice (blue) and brown rice (orange), previously spiked with each aflatoxin at 20 µg/kg.

the cooking treatment previously applied to the rice (that influence the nature and strength of the interactions between the aflatoxins and rice), and the differences between the digestive conditions of the model applied in each work (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011). In our opinion, our study represents a more comprehensive approach because individual bioaccessibility for each digestion step (salivary, gastric, and duodenal) has been evaluated to establish the individual contribution of each step to the global process.

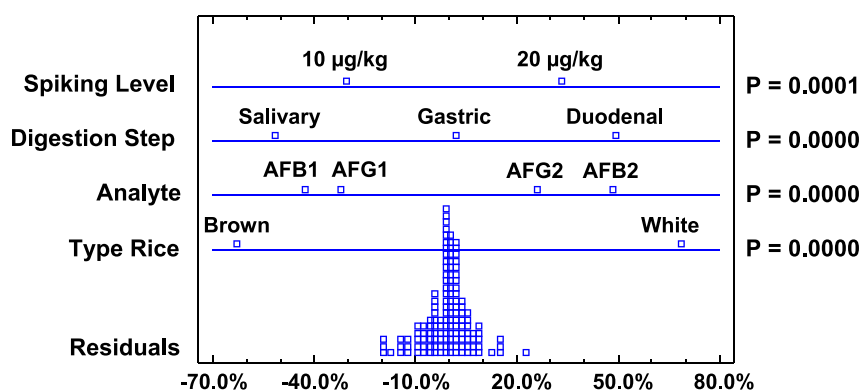
Other studies that evaluated the bioaccessibility of aflatoxins from other foodstuffs showed a disparity of results according to the composition of the food, the level and type of contamination (naturally present or spiked). For instance, Llorens, Pietrzak-Fiećko, Moltó, Mañes, & Juan, 2022 obtained intestinal recoveries about 83 % and 76 % for aflatoxins from wheat bread and wheat bread supplemented with pumpkin, in contrast with maximal intestinal recoveries of 6 %–15 % for AFB1 from wheat bread supplemented with red beets performed by the same authors in a similar study (Llorens Castelló, Juan-García, Cortés, Mañes Vinuesa, & Juan García, 2022). Saladino et al., 2018 reached gastric recoveries above 54 %–56 % that decreased until 26 %–36 % after the duodenal step for AFB1 and AFB2 from loaf bread. In all these previous studies foodstuffs were spiked. However, Kabak, Brandon, Var, Blokland, & Sips, 2009 found similar recoveries of 86 % and 94 % for AFB1 between two different composition foods, pistachio (naturally

contaminated) and prepared pasta infant formula (artificially spiked), meanwhile Versantvoort et al., 2005 obtained above 90 % for AFB1 from peanut slurry.

Other important factor on aflatoxin bioaccessibility is the cooking treatment applied before the digestion. In this sense, Massarolo et al. (2021) demonstrated that a cooking process by extrusion of maize flour caused the conjugation between aflatoxins and food matrix, and this cooking treatment altered the final aflatoxin bioaccessibility from this foodstuff. These authors also demonstrated bioaccessibility differences in maize flour depending on the cooking treatment applied, extrusion (Massarolo et al., 2021) or boiling treatment (Massarolo et al., 2020), and between wheat flour varieties (Massarolo et al., 2020).

If we take into account the individual bioaccessibility of each digestive step, a progressive trend for aflatoxins extraction from white rice (i.e. the increase of bioaccessibility is similar among the salivary, gastric, and duodenal steps) was observed (Fig. 4). In contrast, brown rice displayed a more irregular trend for bioaccessibility step-by-step, that was slightly higher on the salivary step, but these salivary bio-accessible aflatoxin levels were reduced on gastric step, and duodenal step could only recover them partially. Gastric bioaccessibility reduction could be related to the extremely acid pH (1.8) of this digestive fluid, because aflatoxins are unstable under acidic conditions according to Kabak et al., 2006 and Rushing & Selim, 2018. So, the gastric pH could

A) Multifactorial ANOVA – *In Vitro* Digestion



B) 2D Bigraphic PCA – *In Vitro* Digestion

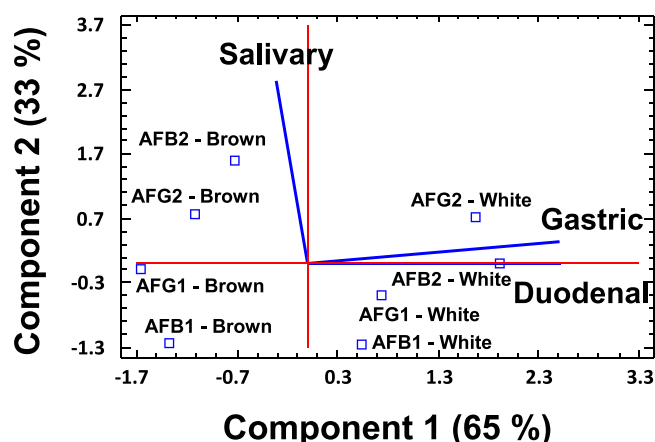


Fig. 5. Statistical analysis performed to interpret aflatoxin bioaccessibility percentages obtained from *in vitro* digestion model: A) Multifactor ANOVA plot for type rice (white and brown), analyte (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2), digestion step (salivary, gastric, and duodenal), and spiking level (10 µg/kg and 20 µg/kg) as factors evaluated and p-values obtained. B) 2D bigraphic of dispersion diagram and component weights obtained through a PCA analysis applied to white and brown samples spiked with aflatoxin B1, B2, G1 and G2 at 20 µg/kg.

promote a partial degradation of aflatoxins or even unknown interactions between aflatoxins and pepsin or mucin from gastric fluid.

The major susceptibility of aflatoxins from brown rice to the gastric conditions has not been elucidated in this work, but the specific composition of brown rice seems to be closely related to this phenomenon (2.6 % fiber on dry weigh for brown rice against to the absence of fiber for white rice, according with the manufacturer). A possible explanation is that starch from white rice could be more available because of the cooking treatment. Then, it might be released in a major extension to the soluble fraction of gastric fluid (also facilitated by salivary amylase), exerting a protective effect for aflatoxins (that could be easily adsorbed by this polysaccharide) or even a pH buffering effect (Copeland, Blazek, Salman, & Tang, 2009). By contrast, brown rice maintains its structural integrity to a greater extent after cooking, and this circumstance, in addition to a less digestibility of cellulose and hemicellulose (there are no enzymes capable to hydrolyze these polysaccharides), might increase the exposure of aflatoxins to the gastric fluid regarding white rice (Ghasemi et al., 2017).

3.3. Method validation

Regarding validation parameters, the linear ranges of the matrix-

matched calibration curve obtained from blank rice extracts spiked after the treatments (cooking method and *in vitro* digestion) were between 0.25 µg/kg–20 µg/kg, respectively with quadratic correlation coefficients above 0.99. LOD and LOQ values did not exceed 0.06 µg/kg and 0.20 µg/kg for any aflatoxin in the cooking treatment, neither 0.60 µg/kg and 2.02 µg/kg in the *in vitro* digestion treatment. Aflatoxin recoveries for the blank extracts spiked after cooking and *in vitro* digestion methods respect to blank extracts spiked after clean-up methods were above 90 % in the cooking extracts and above 80 % in the cooked rice from white and brown rice, and those spiked after *in vitro* digestion method were above 81 % in the salivary extracts, above 84 % in the gastric, and above 85 % in the duodenal extracts from both types of rice.

4. Conclusions

The boiling treatment applied in this study is a simple and fast cooking treatment to partially reduce aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spiked rice samples, provided that the cooking water, that showed an important extraction capacity over aflatoxins, was discarded before ingestion. Moreover, the detoxifying effect is more effective in brown rice and for aflatoxins G1 and G2. On the other hand, aflatoxin bioaccessibility trends vary depending on the type of rice, with a higher

extraction from white rice compared to brown rice. In addition, the interactions between aflatoxins and brown rice seem to be weaker than in white rice, favouring aflatoxin exposure to the gastric digestion from brown rice.

Finally, the present work allows us to improve the current knowledge about the influence of basic cooking processes and gastrointestinal digestion on human exposure to aflatoxins from a basic foodstuff as rice.

Chemical compounds analysed in this article:

Aflatoxin B1 (Pubchem CID: 186907); Aflatoxin B2 (Pubchem CID: 2724360); Aflatoxin G1 (Pubchem CID: 14421); Aflatoxin G2 (Pubchem CID: 2724362)

CRediT authorship contribution statement

Iván Romero-Sánchez: Conceptualization, Resources, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Emma Gracia-Lor:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Yolanda Madrid-Albarrán:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This work was supported by the Community of Madrid/FEDER program [S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM], by the Madrid Government (Community of Madrid - Spain) under the Multiannual Agreement with Complutense University in the line Program to Stimulate Research for Young Doctors in the context of the V PRICIT (Regional Program of Research and Technological Innovation [PR65/19-22432] and by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2020-114714RB-I00).

I. Romero-Sánchez acknowledges the Complutense University of Madrid for his predoctoral grant [CT63/19-CT64/19].

Authors are grateful to the Analysis Service Unit facilities of ICTAN for the analysis of Chromatography and Mass Spectrometry.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137738>.

References

Chandravarnan, P., Agyei, D., & Ali, A. (2022). Green and sustainable technologies for the decontamination of fungi and mycotoxins in rice: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 124, 278–295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.020>

Coomes, T. J., Crowther, P. C., Feuill, A. J., & Francis, B. J. (1966). Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. *Nature*, 209(5021), 406–407. <https://doi.org/10.1038/209406a0>

Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>

da Silva, M. N., Massarolo, K. C., Kupski, L., & Furlong, E. B. (2019). Hydrothermal treatment of rice: Reduction of aflatoxins and bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 85, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.12.009>

Diaz, G. J., Cepeda, S. M., & Martos, P. A. (2012). Stability of aflatoxins in solution. *Journal of AOAC International*, 95(4), 1084–1088. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11.017>

Elizalde-Gonzalez, M. P., Mattusch, J., & Wennrich, R. (1998). Stability and determination of aflatoxins by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 828, 439–444.

FAO, & WHO. (2017). *Evaluation of certain contaminants in food*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254893/9789241210027-eng.pdf>.

García, M., Blanco, J. L., & Suarez, G. (1994). Aflatoxins B1 and G1 solubility in standard solutions and stability during cold storage. *Mycotoxin Research*, 10, 97–100. <https://doi.org/10.1007/BF03192258>

Ghasemi, M., Tsiannou, M., & Alexandridis, P. (2017). Assessment of solvents for cellulose dissolution. *Bioresource Technology*, 228, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.049>

González-Arias, C. A., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2013). Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: A review. *World Mycotoxin Journal*, 6(2), 167–184. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1521>

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>

Hussain, A., & Lutfulah, G. (2009). Reduction of aflatoxin-beta/sub 1/ and ochratoxin-A levels in polished basmati rice (oryza sativa linn.) by different cooking methods. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 31(6), 911–915. <https://inis.iaea.org/search/singlerecord.aspx?recordsFor=SingleRecord&RN=41029356>

Hwang, J.-H., & Lee, K.-G. (2006). Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. *Food Chemistry*, 98(1), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.038>

IARC (1993). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. In: International Agency for Research on Cancer, I. (Ed.). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. In *World Health Organisation, Lyon* (Vol. 56, Issue 489, p. 489). Doi: 10.1016/0003-2670(94)80328-5.

Je, W. P., & Kim, Y. B. (2006). Effect of pressure cooking on aflatoxin B1 in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2431–2435. <https://doi.org/10.1021/jf053007e>

Kabak, B., Brandon, E. F. A., Var, I., Blokland, M., & Sips, A. J. A. M. (2009). Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 44(5), 472–480. <https://doi.org/10.1080/03601230902935154>

Kabak, B., Dobson, A. D. W., & Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 593–619. <https://doi.org/10.1080/10408390500436185>

Lee, J., Her, J. Y., & Lee, K. G. (2015). Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food Chemistry*, 189, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.013>

Llorens Castelló, P., Juan-García, A., Cortés, J. C. M., Mañes Vinuesa, J., & Juan García, C. (2022). Application of an In Vitro Digestion Model for Wheat and Red Beetroot Bread to Assess the Bioaccessibility of Aflatoxin B1, Ochratoxin A and Zearalenone and Betalains. *Toxins*, 14(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins14080540>

Llorens, P., Pietrzak-Fiecko, R., Moltó, J. C., Mañes, J., & Juan, C. (2022). Development of an extraction method of aflatoxins and ochratoxin A from oral, gastric and intestinal phases of digested bread by in vitro model. *Toxins*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/toxins14010038>

Massarolo, K. C., Ferreira, C. F. J., Collazzo, C. C., Bianchini, A., Kupski, L., & Badiale-Furlong, E. (2020). Resistant starch and hydrothermal treatment of cornmeal: Factors in aflatoxins and fumonisin B1 reduction and bioaccessibility. *Food Control*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107274>

Massarolo, K. C., Mendoza, J. R., Verma, T., Kupski, L., Badiale-Furlong, E., & Bianchini, A. (2021). Fate of aflatoxins in cornmeal during single-screw extrusion: A bioaccessibility approach. *LWT*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110734>

Mohd Esa, N., & Ling, T. B. (2016). By-products of rice processing: An overview of health benefits and applications. *Rice Research: Open Access*, 4(1). <https://doi.org/10.4172/jrr.1000107>

Omara, T., Nassazi, W., Omute, T., Awath, A., Laker, F., Kalukusu, R., ... Adupa, E. (2020). Aflatoxins in Uganda: An encyclopedic review of the etiology, epidemiology, detection, quantification, exposure assessment, reduction, and control. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4723612>

Raters, M., & Matissek, R. (2008). Thermal stability of aflatoxin B 1 and ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, 24(3), 130–134. <https://doi.org/10.1007/BF03032339>

Romero-Sánchez, I., Ramírez-García, L., Gracia-Lor, E., & Madrid-Albarrán, Y. (2022). Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 395 (133611), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133611>

Ruadrew, S., Craft, J., & Aidoo, K. (2013). Occurrence of toxigenic Aspergillus spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.001>

Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2018). Adduction to arginine detoxifies aflatoxin B1 by eliminating genotoxicity and altering in vitro toxicokinetic profiles. *Oncotarget*, 9(4), 4559–4570. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23382>

Rustum, I. Y. S. (1997). Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00096-9)

Sadia, A., Dykes, L., & Deng, Y. (2016). Transformation of adsorbed aflatoxin B1 on smectite at elevated temperatures. *Clays and Clay Minerals*, 64(3), 220–229. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2016.0640306>

- Saladino, F., Posarelli, E., Luz, C., Luciano, F. B., Rodríguez-Estrada, M. T., Mañes, J., & Meca, G. (2018). Influence of probiotic microorganisms on aflatoxins B1 and B2 bioaccessibility evaluated with a simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.010>
- Sani, A. M., Azizi, E. G., Salehi, E. A., & Rahimi, K. (2014). Reduction of aflatoxin in rice by different cooking methods. *Toxicology and Industrial Health*, 30(6), 546–550. <https://doi.org/10.1177/0748233712462466>
- Santos, A. R., Carreiró, F., Freitas, A., Barros, S., Brites, C., Ramos, F., & Sanches Silva, A. (2022). Mycotoxins contamination in rice: analytical methods, Occurrence and Detoxification Strategies. *Toxins*, 14(9), 647–694. <https://doi.org/10.3390/toxins14090647>
- Song, C., Yang, J., Wang, Y., Ding, G., Guo, L., & Qin, J. (2022). Mechanisms and transformed products of aflatoxin B1 degradation under multiple treatments: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2121910>
- Tahir, N. I., Hussain, S., Javed, M., Rehman, H., Shahzady, T. G., Parveen, B., & Ali, K. G. (2018). Nature of aflatoxins: Their extraction, analysis, and control. *Journal of Food Safety*, 38(6), 1–7. <https://doi.org/10.1111/jfs.12561>
- Tirmenstein, M. A., & Mangipudy, R. (2014). Aflatoxin. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (pp. 104–106). Elsevier. Doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00224-4.
- Trucksess, M. W., Abbas, H. K., Weaver, C. M., & Shier, W. T. (2011). Distribution of aflatoxins in shelling and milling fractions of naturally contaminated rice. *Food Additives and Contaminants - Part A*, 28(8), 1076–1082. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.576441>
- United States Environmental Protection Agency (EPA) (2012). *US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Jun 12, 2013.* <https://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.html>.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>

SUPPLEMENTARY MATERIAL

AFLATOXIN DETOXIFICATION BY THERMAL COOKING

TREATMENT AND EVALUATION OF *IN VITRO*

BIOACCESSIBILITY FROM WHITE AND BROWN RICE

Iván Romero-Sánchez*, Emma Gracia-Lor* and Yolanda Madrid-Albarrán

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

* Corresponding author: ivaromer@ucm.es

* Corresponding author: emgracia@ucm.es

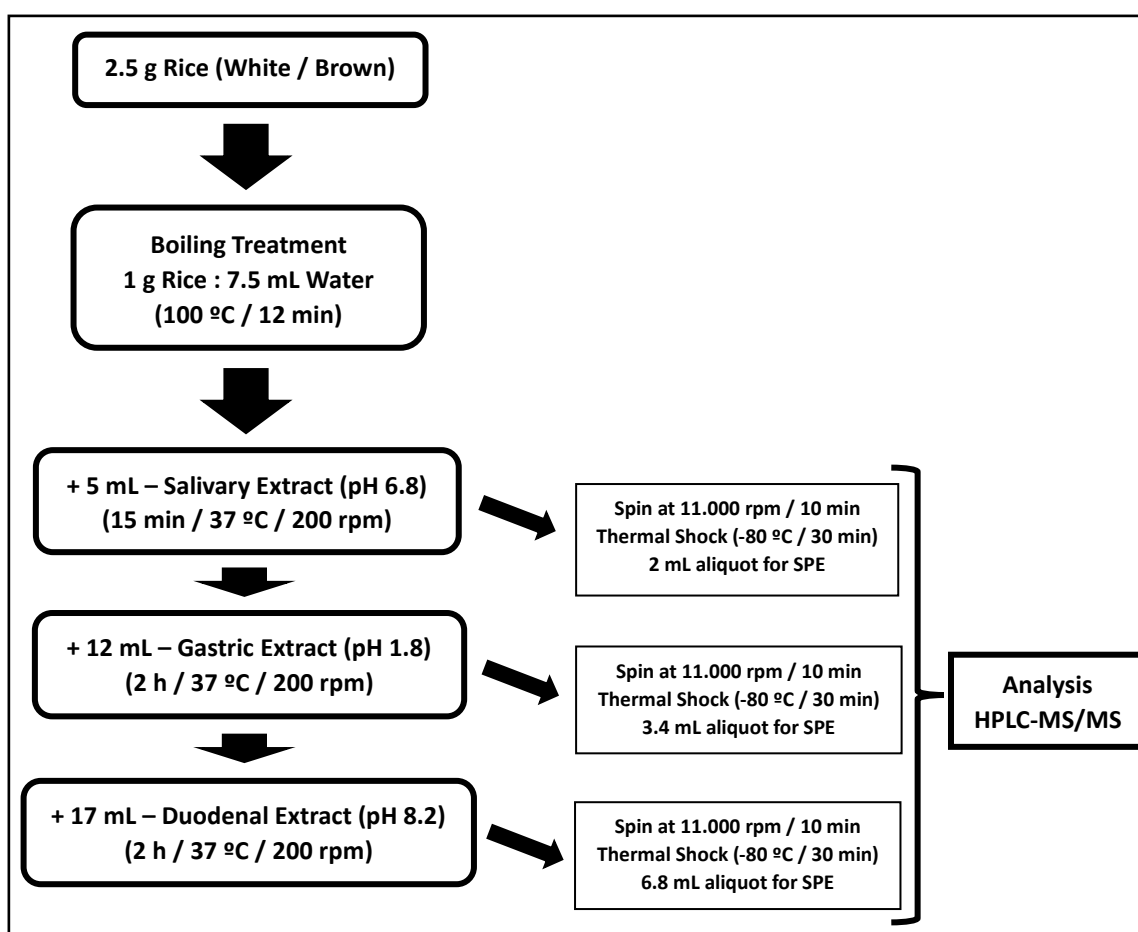


Figure S1. Schematic diagram that summarizes the *in vitro* digestion steps, and the pre- and post-treatments that are applied to rice and digestive extracts.

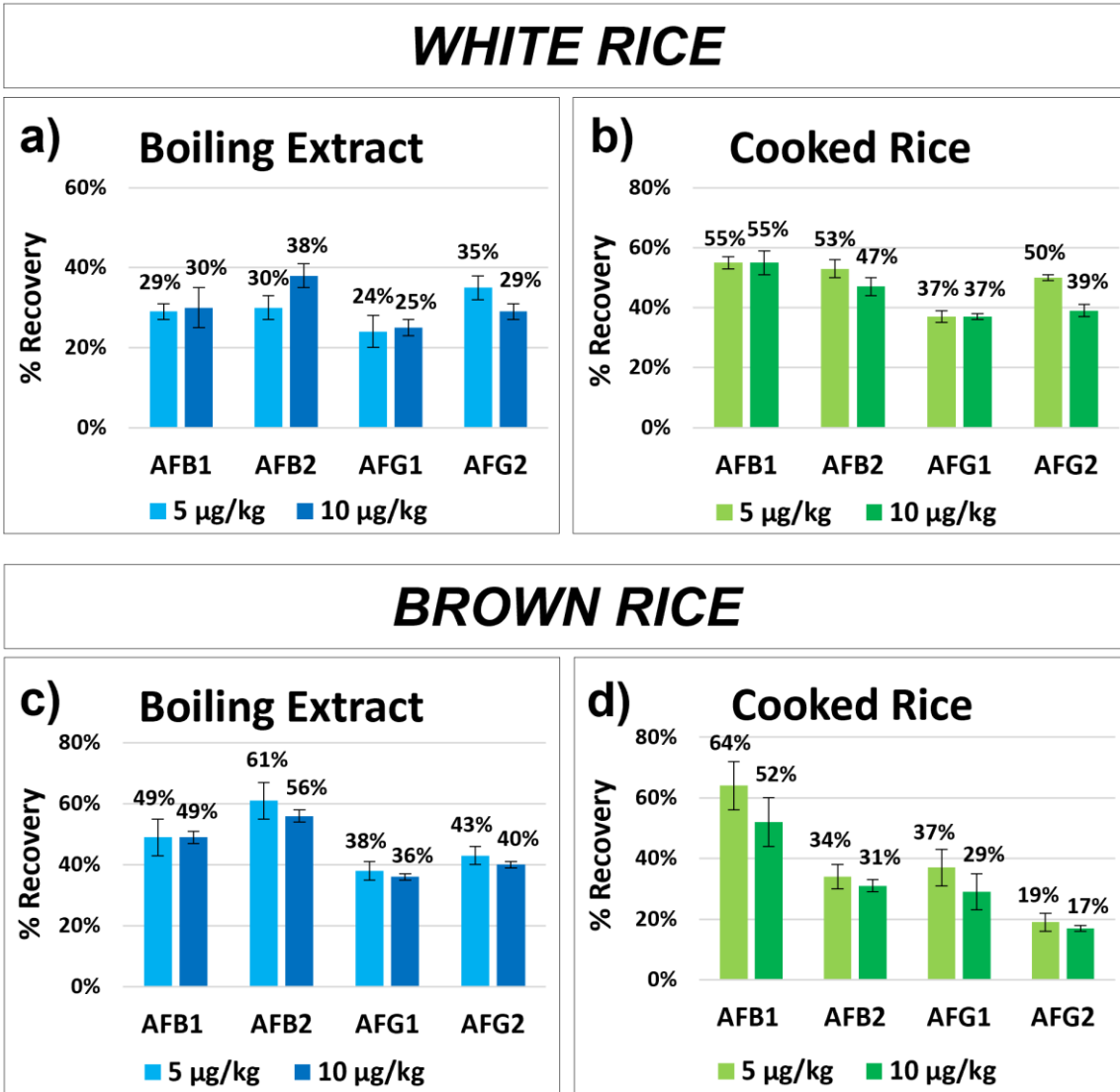


Figure S2. Graphical representation of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 recoveries obtained in boiling water and cooked rice from white rice (a, b) and brown rice (c, d) spiked with each aflatoxin at two initial levels (5 µg/kg and 10 µg/kg) and subjected to boiling treatment at 100 °C with water for 12 minutes.

Fisher LSD Test (95 %) – Boiling Treatment

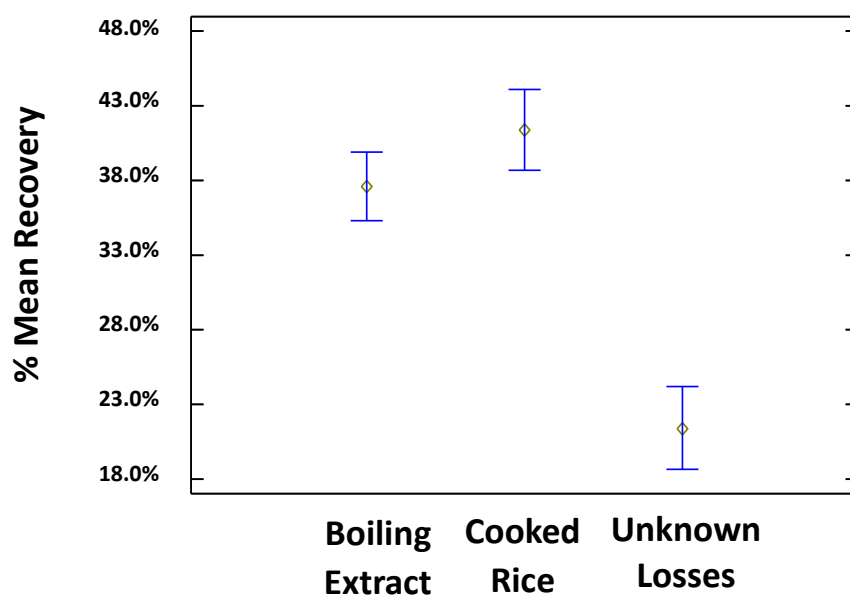
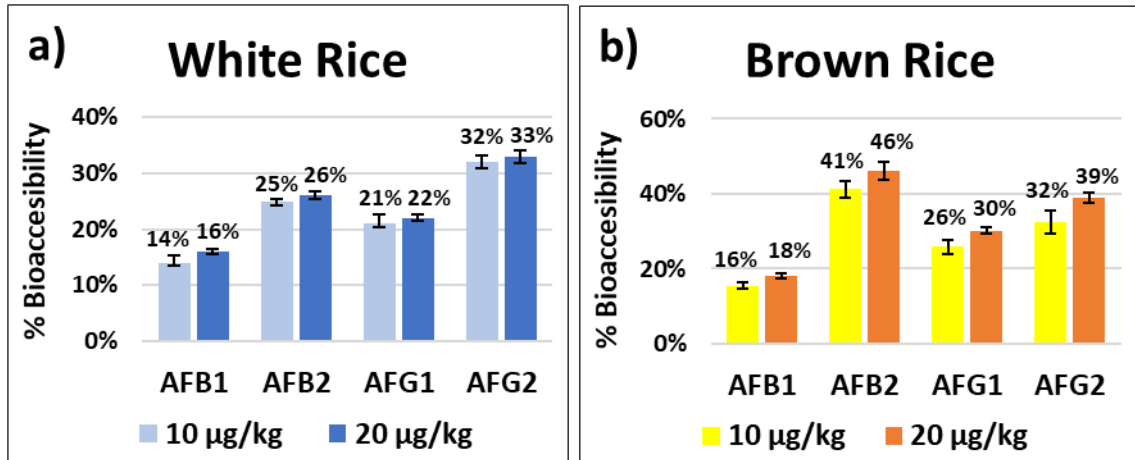
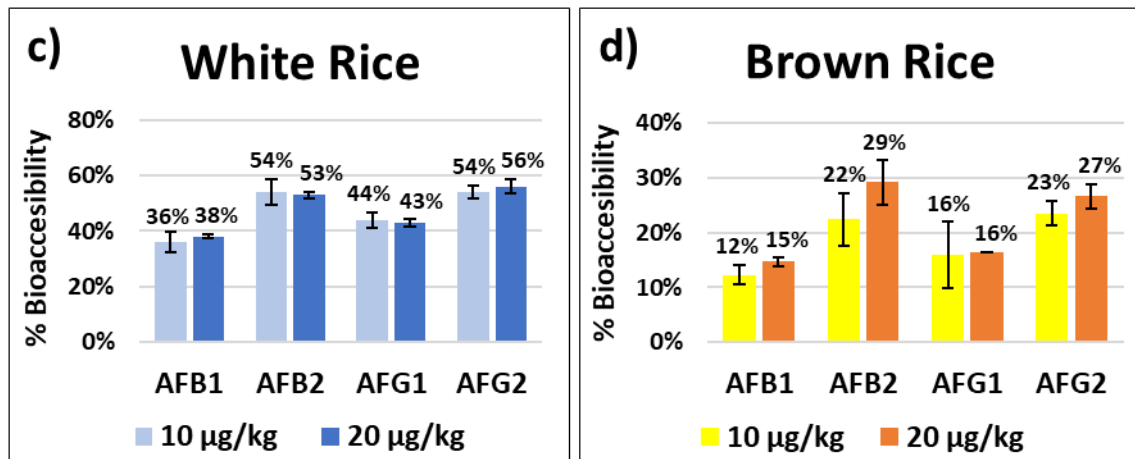


Figure S3. Graphical results of Fisher LSD test (95%) that compare the variability of aflatoxin mean recovery percentages between the boiling extract, cooked rice and unknown losses due to the boiling treatment.

Aflatoxin Bioaccessibility – Salivar Step



Aflatoxin Bioaccessibility – Gastric Step



Aflatoxin Bioaccessibility – Duodenal Step

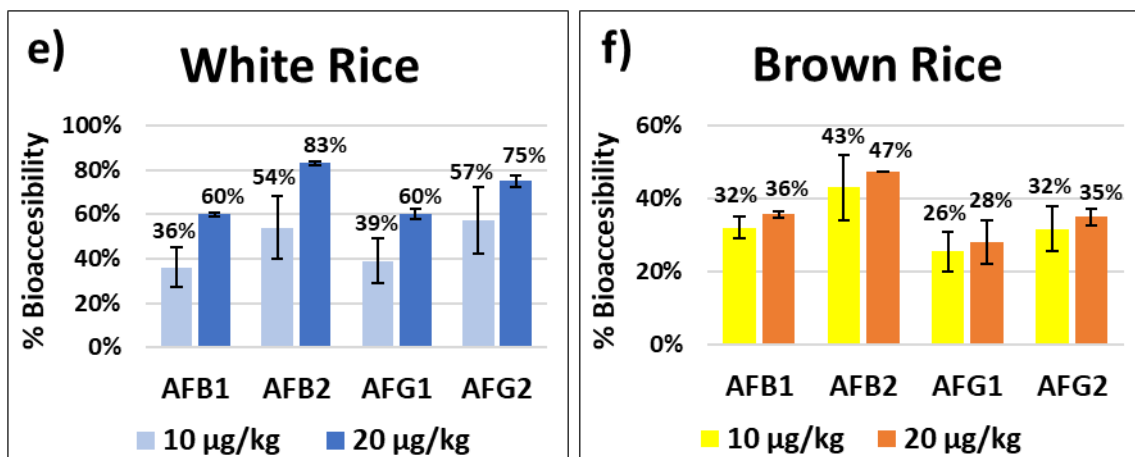


Figure S4. Graphical representation of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 bioaccessibility obtained on salivar, gastric and duodenal digestion steps from white rice (a, c, e) and brown rice (b, d, f) previously spiked at 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

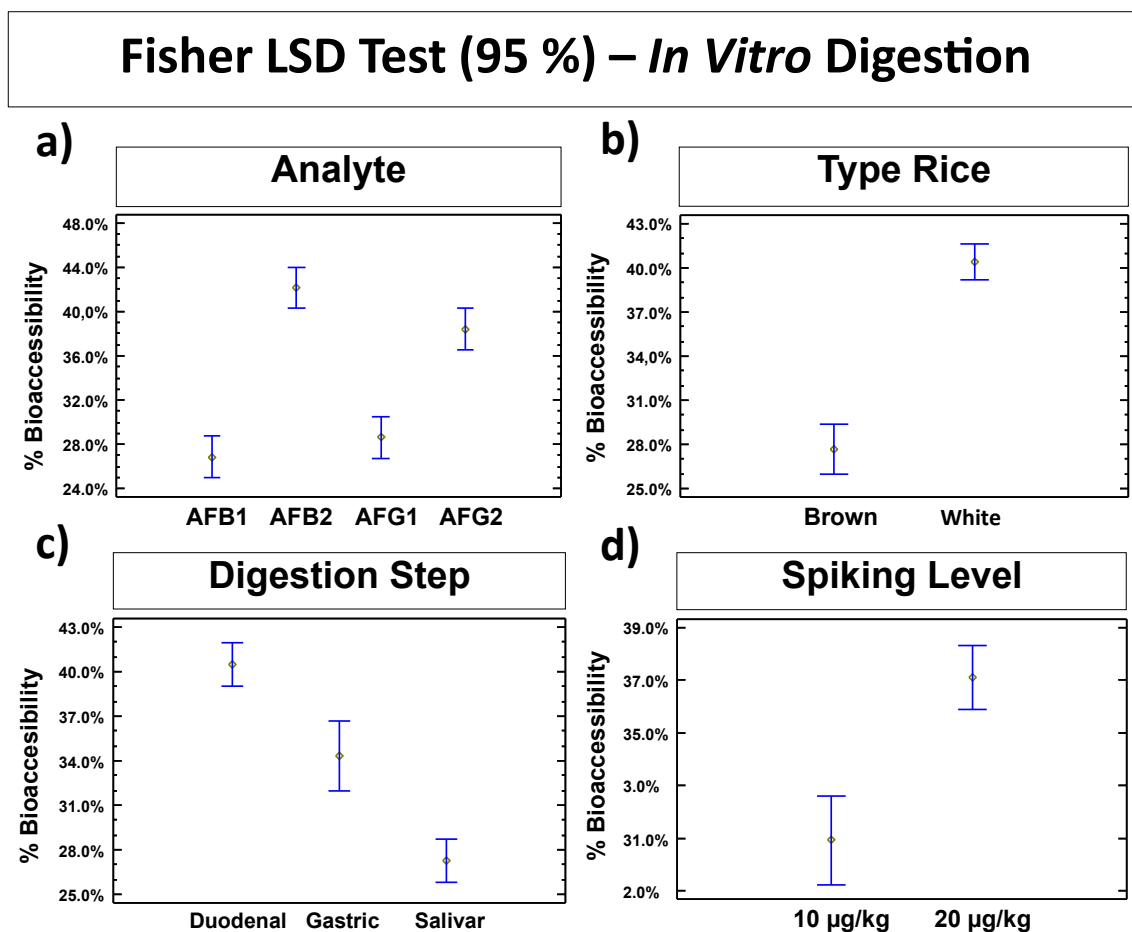


Figure S5. Graphical results of Fisher LSD test (95%) that compare the variability of mean bioaccessibility percentages between: a) Analytes (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2); b) Types of rice (white and brown); c) Digestion steps (salivary, gastric and duodenal); d) Spiking levels (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), from *in vitro* digestion treatment.

Table S1. Retention times, precursor and product ions, and collision energies employed for HPLC-MS/MS analysis.

Compound	Retention Time, <i>min</i>	Precursor Ion, <i>m/z</i> [M+H] ⁺	QUANTIFICATION TRANSITION	CONFIRMATION TRANSITION
			Product Ion I, <i>m/z</i> (CE, V)	Product Ion II, <i>m/z</i> (CE, V)
Aflatoxin B1	6.78	313.1	285.0 (22)	241.0 (38)
Aflatoxin B2	6.06	315.1	287.0 (26)	259.0 (30)
Aflatoxin G1	6.17	329.1	243.0 (26)	199.9 (46)
Aflatoxin G2	5.43	331.1	313.0 (22)	189.0 (46)

Artículo 3. Análisis y evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro* de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en bebidas vegetales.

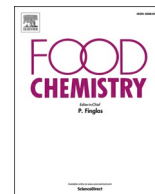
Analysis and evaluation of in vitro bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in plant-based milks.

Iván Romero-Sánchez, Irene Alonso-Núñez, Emma Gracia-Lor, Yolanda Madrid-Albarrán

Food Chemistry 460 (2024) 140538 (Impact Factor 8.5)

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

CONGRESO DE LA XXIV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA. *Análisis y evaluación de la bioaccesibilidad in vitro de las aflatoxinas B1, B2, G1 Y en leches vegetales.* Zaragoza, España, julio de 2024. Tipo de comunicación: Póster.



Analysis and evaluation of *in vitro* bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in plant-based milks

Iván Romero-Sánchez^{*}, Irene Alonso-Núñez, Emma Gracia-Lor^{*}, Yolanda Madrid-Albarrán

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Aflatoxins
Plant-based milks
In vitro digestion
Bioaccessibility
HPLC-MS
MS

ABSTRACT

Plant-based milks emerge as a healthy and vegan alternative for human diet, but these foodstuffs are susceptible to be contaminated by aflatoxins. A new method based on SPE and HPLC-MS/MS analysis was optimized and validated to test the presence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 analysis in almond, oat, rice and soy commercial milks. Moreover, aflatoxin bioaccessibility was evaluated through an *in vitro* digestion assay applied to each type of spiked milk. Aflatoxins B1, B2 and G1 were detected in one soy milk sample below the LOQ, fulfilling the limits established by the European Legislation. The final bioaccessibility percentages were highly dependent on the type of mycotoxin and sample matrix, the highest and the lowest values were obtained for AFB2 (82%–92%) and AFG1 (15%–30%), whereas AFB1 (28%–50%) and AFG2 (32%–76%) values resulted more influenced by the plant-based milk matrix.

Chemical compounds analysed in this article

Aflatoxin B1 (Pubchem CID: 186907)
Aflatoxin B2 (Pubchem CID: 2724360)
Aflatoxin G1 (Pubchem CID: 14421)
Aflatoxin G2 (Pubchem CID: 2724362)

1. Introduction

The demand for non-animal origin alternatives to cow's milk has witnessed a significant rise in recent years, driven by a variety of factors. Many consumers opt for these alternatives due to clinical conditions, such as lactose intolerance, milk allergies or hypercholesterolemia (Hamed et al., 2019). Lifestyle choices, including veganism and vegetarianism, also contribute to the increasing preference for plant-based options (Gil-Serna et al., 2020; Mäkinen et al., 2016). Additionally, plant-based milks are regarded as functional food, further amplifying their popularity due to the growing demand for healthier products (Hamed et al., 2019).

It is important to note that the raw materials used in these plant-based milks, including cereals, nuts, and seeds, may pose a risk of mycotoxin contamination (EFSA, 2013). Consequently, the occurrence of mycotoxins should be taken into consideration as they can persist throughout food processing, maintaining their chemical and thermal

stability, and therefore may be present in the final product (Bullerman & Bianchini, 2007; Gil-Serna et al., 2020).

Being recognized as carcinogenic agents to humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC), aflatoxins are the most hazardous mycotoxins for human and animal health (Benkerroum, 2020). They are highly toxic secondary metabolites produced by fungi belonging to the *Aspergillus* genus, and these aflatoxin-producing fungi usually contaminate crops either during harvesting or storage and transport (Bennett & Klich, 2003).

The implication of aflatoxins in cancer development occurs mainly at hepatic level as this organ is responsible for the metabolization and detoxification of mycotoxins, among other toxins (Rushing & Selim, 2019) (Marchese et al., 2018). Besides being recognized as carcinogenic, aflatoxins can cause a broad range of acute and chronic effects on animal and human health, according to Benkerroum, 2020 and Romero-Sánchez et al., 2022.

Today, despite the efforts spent on decreasing the fungal infections of crops and food stocks, aflatoxin contamination is still a major risk for agricultural industry and consumers. Considering the above, the European Commission has regulated the maximum levels of aflatoxins allowed in food marketed in the EU- whether it is produced in the EU or imported.

Aflatoxin B1 is the only aflatoxin with maximum level regulated by the European Commission. Additionally, the total concentration of

^{*} Corresponding authors.

E-mail addresses: ivaromer@ucm.es (I. Romero-Sánchez), emgracia@ucm.es (E. Gracia-Lor).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140538>

Received 22 February 2024; Received in revised form 5 July 2024; Accepted 18 July 2024

Available online 19 July 2024

0308-8146/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

aflatoxins, which corresponds to the sum of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, has also been regulated in multiple foodstuffs, so aflatoxin B1 and total aflatoxins concentrations in food for adult consumption has been set between 2 to 12 µg/kg and 4 to 15 µg/kg, respectively, depending on the commodity and its manufacture, according with the [Commission Regulation \(EU\), 2023/915](#). However, specific aflatoxin limits for plant-based milks are not established according with current legislation. Although cereals, oilseeds and nuts are the main raw materials used for plant-based milks elaboration, the European Regulation establishes that their aflatoxin limits should not be directly applied for derived products that contain <80% content of the raw material in the final product (case of plant-based milks). In these foodstuffs, [Commission Regulation \(EU\), 2023/915](#) maintain the regulatory limits of the original raw materials, but establishes that the final allowed aflatoxin content must be determined by considering the final percentage and the dilution or concentration factors of the raw material in the plant-based milk, but no more specifications are detailed in this regard.

A factor not considered when regulatory limits for aflatoxin levels in food matrices are established is that the amount of mycotoxin consumed does not always reflect the amount available to exert toxic action in a target organ of the body, as only a part of the ingested compound will be bioavailable ([Versantvoort et al., 2005](#)) ([González-Arias et al., 2013](#)). Therefore, this fraction is relevant for accurate risk assessment and should be considered to establish legal limits of mycotoxin content in foodstuffs.

In order to obtain the oral bioavailability, it is essential to previously assess the bioaccessibility ([Fernández-García et al., 2009](#)). Food composition has a significant effect on mycotoxin bioaccessibility, as complex and diverse interactions can occur between the mycotoxin and the food matrix, according to [González-Arias et al., 2013](#) and [Romero-Sánchez et al., 2023](#).

The bioaccessibility of mycotoxins is greatly dependent on mycotoxin chemical structure and food matrix composition, highlighting the need for further studies on bioaccessibility of these fungal metabolites ([Romero-Sánchez et al., 2023](#)).

On the other hand, bioaccessibility studies for highly demanded food as plant-based drinks are scarce but needed. Moreover, bioaccessibility assays applied to plant-based milks is of increasing interest considering that these beverages can be made from different types of cereals (rice, oat, spelt wheat, corn); pseudocereals (quinoa); dried fruits (almond, hazelnut, walnut); or oilseeds (soy, peanut), among others, in addition to other components to improve the consistency and shelf-life of the product, as well as flavours are added during the manufacturing process. ([González-Arias et al., 2013](#)).

In accordance with the significant importance of aflatoxins, analytical techniques for their proper separation, detection and quantification in food, feed and beverages have been extensively developed. These toxins occur naturally at trace levels and are toxic even at low concentrations. Therefore, quantification methods of aflatoxins must be both reliable and sensitive in order to measure aflatoxin levels lower than those required by national or international regulations to monitor levels in the food chain ([Tahir et al., 2018](#)). Among the analytical techniques, high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometer detectors are the method of choice for the separation and quantification of aflatoxins ([FAO & WHO, 2018](#)).

In order to successfully detect and quantify aflatoxins in plant-based milks, it is essential to optimize the sample pretreatment and clean-up steps to extract the aflatoxins from the matrix; to preconcentrate the extracted analytes as much as possible; and to mitigate the matrix effects that might interfere with accurate quantification ([Gil-Serna et al., 2020](#)). The nutritional complexity of plant-based milks, characterized by high contents of proteins, carbohydrates, lipids and fiber, requires a careful optimization of sample treatment procedures. Moreover, the differences between the nutritional composition of the most consumed plant-based milks (soy, oat, rice and almond) and even between the same beverage obtained from different manufacturers, poses an additional challenge in

order to develop new extraction and clean-up methods simultaneously valid for different types of plant-based drinks and from different commercial brands ([Silva et al., 2020](#)).

Several works have studied the occurrence of different mycotoxins in plant-based milks, especially oat, soy, rice- and almond-based milks, which are the most consumed worldwide. Despite previous analyses of certain plant-based beverages like tiger nut milk ([Rubert et al., 2011](#); [Sebastià et al., 2010](#)), the comprehensive investigation of mycotoxin presence in commonly consumed plant-based milk alternatives was unexplored until 2017. Moreover, the high and rapid rise in consumption of plant-based drinks, the multiple and unknown origins of the raw materials that compose the basis of this foodstuffs, and the high risk that supposes oral exposure to aflatoxins, require the development of reliable methods for the analysis of aflatoxins from commercial plant-based milk samples to monitoring the current population exposure, and *in vitro* digestion studies to evaluate aflatoxin behaviour and bioaccessibility from different types of plant-based milks.

To address the imperative of ensuring food safety concerning these milk substitutes, we have optimized a sample extraction and clean-up procedure and validated an analytical method by using High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) for the accurate quantification of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in rice, almond, oat and soy drinks. In addition, recognizing the importance of bioaccessibility evaluation in aflatoxin risk assessment in food and feed, this study includes an evaluation of the bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in the afore mentioned food matrices.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

A Milli-Q Millipore system (Bedford, MA, USA) was used to produce the ultrapure water. Acetonitrile (ACN) LC-MS grade employed for chromatography was acquired from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA); ACN and methanol (MeOH) supergradient grade for extractions and formic acid (HCOOH) for HPLC-MS/MS were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Solid phase extraction (SPE) cartridges Oasis HLB containing 60 mg and 200 mg of sorbent were supplied by Waters Corporation (Milford, MA, USA).

The salts CaCl₂·2H₂O, NaHCO₃, MgCl₂·6H₂O as well as mucin, bile salts, trypsin (10,000 U/mg), α-amylase (400 U/mg), pepsin (≥400 U/mg) and pancreatin (4 x USP) employed in the preparation of saliva, gastric and duodenal fluids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). NaCl and KCl were supplied by Panreac (Barcelona, España) and KH₂PO₄ by Riedel de Haën (Kufstein, Austria).

Aflatoxins analytical solid standards were purchased from Sigma Aldrich (St. Luis, Missouri, USA): (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19-trioxapentacyclo[10.7.0.02,9.03,7.013,17]-nonadeca-1,4,9,11,13(17)-pentaene-16,18-dione (Aflatoxin B1, ≥97.0%), (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19-trioxapentacyclo[10.7.0.02,9.03,7.013,17]nonadeca-1,9,11,13(17)-tetraene-16,18-dione (Aflatoxin B2, ≥98%), 11-methoxy-6,8,16,20-tetraoxapentacyclo-[10.8.0.02,9.03,7.013,18]jicosa-1,4,9,11,13(18)-pentaene-17,19-dione (Aflatoxin G1, ≥98%) and (3S,7R)-11-methoxy-6,8,16,20-tetraoxapentacyclo[10.8.0.02,9.03,7.013,18]jicosa-1,9,11,13(18)-tetraene-17,19-dione (Aflatoxin G2, ≥98%). Individual stock solutions were prepared by conveniently diluting with ACN 1 mg of mycotoxin to get a final concentration of 100 mg/L. A work solution containing a mixture of the four aflatoxins at 20 mg/L in ACN was prepared from the individual stock solutions. All the standards were stored at -20 °C until their use to prevent their degradation.

2.2. Plant-based milks samples

Plant based milk samples from four different brands (A, B, C and D) were selected for each type of milk and acquired from several supermarkets of Madrid (Spain). In accordance with the current consumption

trends the following beverages were selected: soy milk (soy content 13–15%), almond milk (almond content 4–4.5%), oat milk (oat content 15–16%) and rice milk (rice content 15–17%). All the samples were stored in darkness at room temperature until the analysis. The specific nutritional composition from the manufacturer of the plant-based milks that were assessed through *in vitro* digestion is detailed on Table 1.

2.3. Instrumentation

Analysis were carried out through a high performance liquid chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer detector (HPLC-MS/QqQ). Firstly, analyte separation was developed by a HPLC Model 1200 Series (Agilent Technologies, Madrid, Spain). The chromatographic system consists of a G1312A binary pump, a G1329A degasser, a G1329A automatic thermostatic injector and a G1316A thermostatic module column.

Reversed-phase separation of aflatoxins was achieved by a Synergy™ Fusion-RP C18 (150 mm × 3 mm, ID 4 μm, pore size 80 Å) analytical column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Volume sample of injection was 5 μL and the flow rate was set at 0.5 mL/min at 40 °C. *mobile* phase consisted of ultrapure water with HCOOH 0.1% (eluent A) and ACN with HCOOH 0.1% (eluent B). The percentage of B changed as follows along the chromatographic gradient: 0 min, 30%; 7 min, 60%; 8.0 min, 100%; 12 min, 100%; 13 min, 30%, and the last condition was kept during 4 min to re-equilibrate the column.

Aflatoxin detection and quantification was done with a G6410B triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Madrid, Spain). Analysis were performed in positive electrospray ionization mode using the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with a dwell time of 100 ms for the transitions corresponding to aflatoxins B1, B2, G1 and 150 ms for aflatoxin G2 transitions. ESI capillary voltage was set at 4.0 kV, fragmentation voltage at 152 V, and current chamber was established at 0.16 μA. The nebulisation system was set at 55 psi and the applied drying gas flow rate was 12 L/min at 300 °C. Selected transitions and collision energies (CE) for aflatoxins are detailed on Table S1, whereas chromatograms and MS/MS spectrum of the aflatoxins are provided on Fig. S1 in the Supplementary Material. For data acquisition and processing, Masshunter Data Acquisition B.04.01, Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 and Masshunter Quantitative Analysis B.07.00. were employed (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany).

2.4. Determination of aflatoxins in commercial plant-based milks

20 mL of each plant-based milk were firstly stirred at 99 rpm for 30 min using an Intelli-Mixer RM-2 M (Elmi, Riga, Latvia). Subsequently, 10 mL of MeOH were added, followed by another 30-min stirring incubation. The resulting samples were centrifuged at 16,400 xg using an Eppendorf Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 10 min.

Next, 25 mL of the supernatant were transferred to a pure polypropylene tube (Eppendorf, Hamburg, Germany), where 12.5 mL of n-hexane were then added and the mixture was shaken manually. The addition of the organic solvent was followed by another 10-min centrifugation at 16,400g, leading to the separation of two phases – an aqueous phase and an organic phase - with a noticeable interphase.

Table 1

Nutritional composition in terms of fats, carbohydrates and proteins (g/L) provided by the manufacturer of each type of plant-based milk (almond, oat, rice, and soy) employed for the *in vitro* digestion model.

Component	<i>In vitro</i> digested plant-based milk			
	Almond milk	Oat milk	Rice milk	Soy milk
Fats (g/L)	22	8	9	20
Carbohydrates (g/L)	3	93	110	12
Proteins (g/L)	8	13	1	35

Both the above organic phase and the interphase were removed. Then, a 15 mL aliquot of the aqueous phase was taken and diluted with Milli-Q water to reach a final volume of 50 mL. Half of this resulting dilution (25 mL) was passed drop by drop, with the assistance of a vacuum pump, through a previously conditioned HLB cartridge containing 60 mg of sorbent. The cartridges were previously conditioned with 6 mL of MeOH followed by 6 mL of Milli-Q water. After the 25 mL solution had been passed through the cartridges, the columns were washed with 20 mL of Milli-Q water and completely dried under vacuum for 5 min. Aflatoxins were then eluted from the cartridges by adding 5 mL of MeOH, which was subsequently evaporated to dryness by nitrogen stream. Finally, the extracts were reconstituted in 0.1 mL of Milli-Q water for the analysis by HPLC-MS/MS.

2.5. Validation study of the analysis methodology for aflatoxins on commercial plant-based milks

For the aflatoxin extraction and clean-up methodology from milk commercial samples (Section 2.4), precision and accuracy were evaluated for each plant-based milk type by spiking of 20 mL of plant-based milks at 2.5 μg/kg with each aflatoxin (equivalent to an initial concentration of 2.5 μg/L and a final concentration of 125 μg/L) before the application of the extraction method. Analysis were performed in triplicate to evaluate precision by standard deviations and RSD calculations. For each aflatoxin, the area of the spiked sample was compared to the area of a blank extract that was spiked before the injection sample at the same final concentration as follows (1):

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{Peak area of spiked sample}}{\text{Peak area of purified spiked extract}} \times 100 \quad (1)$$

The recovery percentages and RSD values were evaluated at intra-day and inter-day levels, with two different determinations per day along two different days.

In addition, the aflatoxin recoveries considering only the losses caused by the matrix factor (MF) was calculated by comparing the area of blank purified extracts that were spiked with each aflatoxin before the injection at 125 μg/L with the area of a stock solution at the same concentration, as follows (2):

$$\% \text{MF} = \frac{\text{Peak area of purified spiked extract}}{\text{Area Stock Solution}} \times 100 \quad (2)$$

This method was also evaluated in terms of linearity, detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ). Linear range was established in a matrix-matched calibration curve for each aflatoxin by least squares linear regression representation, that was made by using peak areas of extracts from each plant-based milk that were spiked before the injection at four known final concentrations (25, 50, 125 and 250 μg/L), and results were evaluated in terms of slope and squared correlation coefficient (R²). Peak areas of real samples were interpolated on matrix calibration line to get their real concentration. The LOD and LOQ were estimated by the method based on signal-to-noise (giving a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 for LOD and 10 for LOQ), applied for the determination method and for the analytical instrument. In the first case, the aflatoxin concentration of the spiked milk samples was considered as the most reliable detectable and quantifiable for the determination method; in the second case, aflatoxin pure stock solutions were considered for the instrument.

2.6. *In vitro* digestion model

In vitro digestion model is an assay that simulates the physiological conditions that take place during human gastrointestinal digestion. For this purpose, solutions with different chemical and enzymatical composition were prepared to simulate the compositional properties of the salivary, gastric, and duodenal fluids, and were added sequentially on the foodstuff. In each step, the mixture was homogenized and

incubated at different times. In this work, the digestive model used by (Romero-Sánchez et al., 2023) was taken as a reference.

The *in vitro* digestion model was applied to 10 mL of each plant-based milk sample with a sequential addition of each artificial digestive fluid previously prepared (the composition of the digestive fluids is detailed in Table 2).

The digestive incubations were performed under oscillating agitation in rotate mode using an Incubator Genie (Scientific Industries, Inc., USA) at 35 rpm and 37 °C in darkness for all the digestive steps. Firstly, 5 mL of the salivary fluid was added to the beverage sample. The resulting mixture was vortexed, its pH was adjusted at 6.8 and was then incubated for 15 min. Next, 12 mL of the gastric fluid was applied to each sample, the resulting mixture was vortexed, and its pH was adjusted at 1.8, followed by a 2-h incubation. Finally, 17 mL of the duodenal fluid was introduced into the mixture, vortexed, the pH was adjusted at 8.2 and the final extract was incubated for 2 h. Once the incubations were finished, the digestive extracts were subjected to a thermal shock at -80 °C to denature the digestive enzymes and thereby to stop the digestive process.

2.7. Digestive extracts clean-up

In order to determine the bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, the digestive extracts were thawed at room temperature and centrifuged at 16,400g for 10 min. Subsequently, a 20 mL aliquot was transferred from each supernatant to a pure polypropylene tube (Eppendorf SE, Hamburg, Germany), where 10 mL of n-hexane were then added and the mixture was shaken manually. The addition of the organic solvent was followed by centrifugation at 16,400g for 10 min, leading to the separation of two phases – an aqueous phase and an organic phase - with a remarkable interphase. Then, the above organic phase and the interphase are removed, and a 10 mL aliquot of the aqueous phase was taken and diluted with Milli-Q water to reach a final volume of 50 mL. Half of this resulting dilution (25 mL) was passed drop by drop through a HLB cartridge containing 200 mg of sorbent, with the assistance of a vacuum pump. The cartridges were previously conditioned with 6 mL of MeOH followed by 6 mL of Milli-Q water. After the 25 mL solution had been passed through the cartridges, the columns were washed with 20 mL of Milli-Q water and completely dried under vacuum for 5 min. Aflatoxins were then eluted from the cartridges by adding 10 mL of ACN, which was subsequently evaporated to dryness by nitrogen stream. Finally, the extracts were reconstituted in 0.2 mL of Milli-Q water for the analysis by HPLC-MS/MS.

Table 2

Chemical and enzymatical composition of each digestive fluid (g/L) that were sequentially applied on the *in vitro* digestion model to each plant-based milk.

Component (g/L)	Digestive Fluid		
	Salivary	Gastric	Duodenal
NaCl	1.82	4.26	–
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.47	–	0.55
Na ₂ SO ₄	4.57	–	–
NaHCO ₃	0.64	–	0.96
KCl	1.62	1.16	0.34
KH ₂ PO ₄	2.00	0.41	–
MgCl ₂ · 6H ₂ O	–	–	0.24
Mucin	2.53	4.38	–
Urea	0.29	–	0.32
Uric acid	0.03	–	–
Bile salts	–	–	0.93
a-amylase	1.10	–	–
Pepsin	–	1.60	–
Pancreatin	–	–	0.90
Trypsin	–	–	0.24
pH	6.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	8.2 ± 0.2

2.8. Analytical performance of the *in vitro* digestion procedure

Bioaccessibility calculation was based on the formula below (3). On the basis of this formula, 10 mL of each plant-based milk sample were spiked simultaneously with all the aflatoxins at initial concentration of 100 µg/L by triplicate (equivalent to 100 µg/kg) to evaluate the precision of the assay, and submitted to the *in vitro* digestion procedure along with blank plant-based milk samples without aflatoxins (named as blank sample). After the *in vitro* digestion, 20 mL of final digested extracts from blank samples were spiked at 23 µg/L for each type of aflatoxin before the clean-up procedure. 23 µg/L concentration was selected as represents the expected concentration after *in vitro* digestion if aflatoxins exhibited a 100% of bioaccessibility (considering the dilution factors applied during *in vitro* digestion). Finally, both types of samples were preconcentrated at a final concentration of 568 µg/L after the clean-up of digestive extracts.

Finally, the area of each analyte obtained from the spiked sample was compared to the area of the blank extract spiked after the *in vitro* digestion and before the clean-up procedure:

$$\%B = \frac{\text{Peak area of spiked sample}}{\text{Peak area of spiked digestive extract}} \times 100 \quad (3)$$

In this way, the losses derived exclusively from the clean-up procedure and the matrix effect were corrected with this formula (because both types of samples were spiked previous to the clean-up procedure, so both suffered the same losses due to the matrix effect and the clean-up method), so the only losses taken into account in the calculation are those derived exclusively from the *in vitro* digestion procedure (because the sample was spiked before digestion and the extract was spiked after digestion).

The clean-up method applied to the digestive extracts after the *in vitro* digestion model was evaluated in order to test the recovery of the analytes (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) from each type of milk. For this purpose, the 20 mL aliquots taken from the blank digestive extracts were spiked at 23 µg/L with the four aflatoxins, and its area was compared to the area of a blank digestive extract that was spiked after the clean-up method at a 568 µg/L, exactly the final expected concentration after the clean-up procedure if there were not aflatoxin losses during the clean-up method, as follows (4):

$$\%Recovery = \frac{\text{Peak area of spiked digestive extract}}{\text{Peak area of purified spiked digestive extract}} \times 100 \quad (4)$$

Finally, LOD and LOQ for each type of plant-based milk sample spiked after the *in vitro* digestion were calculated based on S/N ratio of 3 and of 10, respectively, for the *in vitro* digestion process.

3. Results and discussion

3.1. Determination of aflatoxins in commercial plant-based milks

The presence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 has been evaluated in twenty commercial samples of almond, oat, rice and soy milks, and from four commercial brands (A, B, C and D) for each type of milk. All the samples were acquired on different supermarkets from Madrid (Spain) and selected according to a representative trend of current consumption. For the analysis of these samples, a method based on simultaneous extraction of aflatoxins with MeOH combined with SPE clean-up by using HLB cartridges to purify and concentrate the analytes was previously optimized in the same study.

The results obtained evidenced the presence of low intense peak signals in all the samples tested. To confirm that these signals corresponded to mycotoxins, signal ratios between quantification and confirmative transitions (Q/q) were calculated for each positive sample and compared with the Q/q average ratio of the matrix-matched calibration points. Q/q ratio values obtained were within ±30% of the allowed

tolerance range for AFB1, AFB2 and AFG1 on soy milk (sample A), compared with Q/q average ratio of matrix-matched calibration, according to the European Commission guidance for mycotoxin identification on foodstuffs (European Commission, 2017). Therefore, these samples were contaminated with the aflatoxins mentioned at levels below the quantification limits of the applied method (<LOQ), or not measurable, whereas the rest of the samples were not contaminated with aflatoxins, or aflatoxins were below the detection limits of the method (<LOD). Fig. 1 shows the chromatograms of the aflatoxins detected below the LOQ whose Q/q ratios were in accordance with the Q/q average ratio from the matrix-matched calibration.

Considering that LOD and LOQ of this method are much lower than the maximum limits for aflatoxins in cereals, dry fruits, legumes and derived products established by the Commission Regulation (EU), 2023/

915, we can conclude that the analysed samples accomplished with the current legislation. However, it should be taken into account the ambiguity of this legislation regarding to derived products which contain <80% of the regulated raw materials. In these cases, the maximum final aflatoxin level depends on the initial raw material content and the final dilution level applied to the raw material for the elaboration of the derived product (Commission Regulation (EU), 2023/915). In the current study, the absence of measurable aflatoxin levels in these commercial samples is in accordance with the results obtained by Hamed et al., 2019, that analysed aflatoxin presence in eleven samples of rice, oat and almond milk, and six additional products enriched with oat and almond marketed in Granada (Spain), and no quantifiable contamination was found. In a similar approach, Rodríguez-Cañas et al., 2024 analysed simultaneously aflatoxins along with other 25 emerging

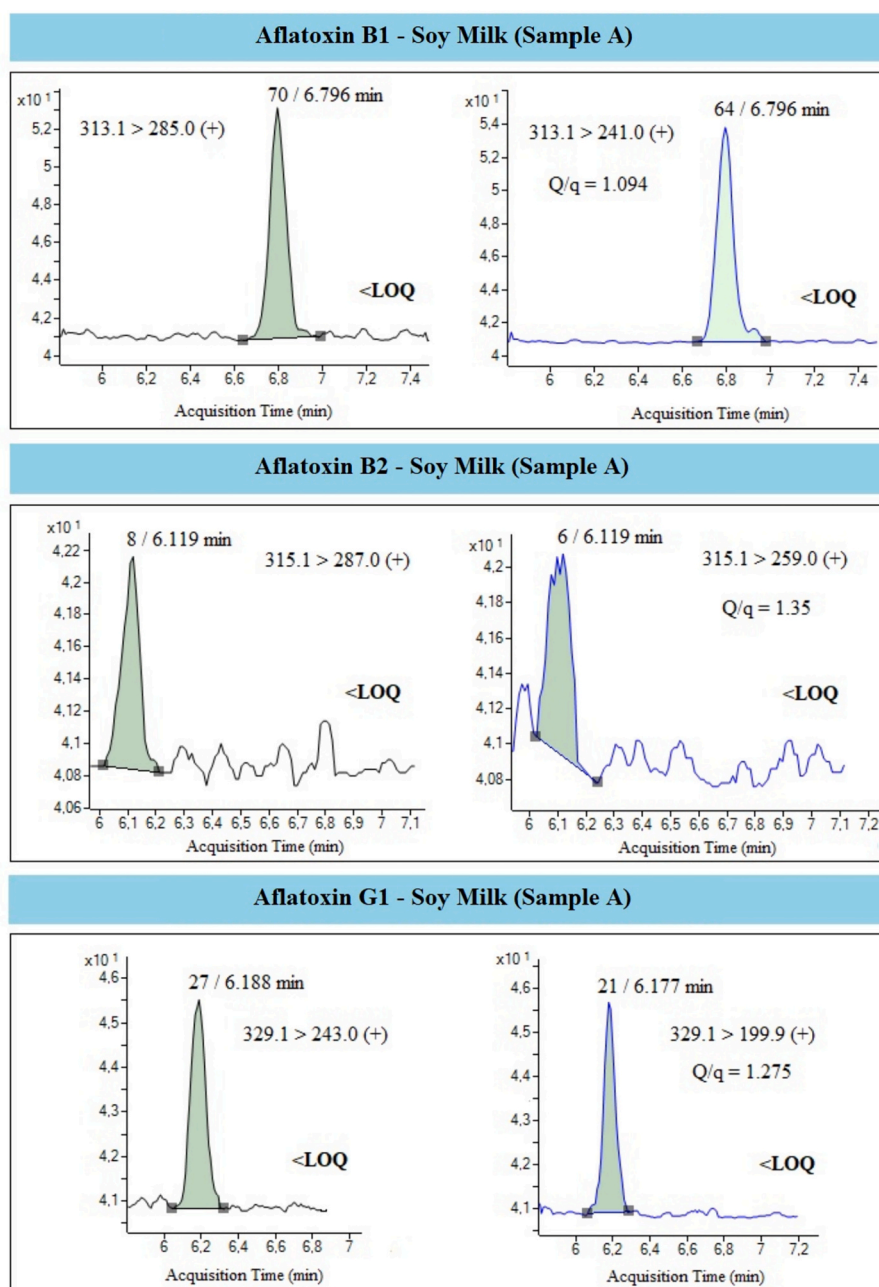


Fig. 1. Chromatograms for the quantification and confirmation transitions of each aflatoxin detected below the LOQ in commercial plant-based milks samples: AFB1 in soy milk (Sample A); AFB2 in soy milk (Sample A); and AFG1 in soy milk (Sample A). The area and the retention time for each transition is detailed and the Q/q ratios has been calculated (coincident with Q/q ratios from the matrix-matched calibration points).

mycotoxins in almond, oat, rice and soy sample milks from Galicia (Spain). In this case, AFB1 and AFB2 were detected in almond and rice samples (28%–33% of prevalence), with values below the LOQ, and only AFB1 was detected and quantified at 0.5 µg/L in soy milk (11% of prevalence). However, the low values of this study contrasted with the high presence of other mycotoxins as beauvericin, enniatins or fumonisins from the same study.

On the other hand, our results disagree with other studies of aflatoxin analysis in plant-based milks commercialized in other parts of Spain. For instance, Miró-Abella et al., 2017 monitored the presence of aflatoxins, among other mycotoxins, in oat, rice and soy milks acquired in Catalonia (Spain). In this study, oat milk samples from different brands were found to be contaminated with AFB1 at 0.2–0.3 µg/L, AFB2 at 0.4 µg/L and AFG1 at 0.1 µg/L, whereas AFB1, AFG1 and AFG2 were detected in other samples of oat, soy and rice at levels below the LOQ. In the same line, Juan et al., 2022 developed a multi-mycotoxin analysis in almond, oat, rice, and soy milks acquired from Valencia (Spain), and they found AFB2 at 0.7 µg/L in almond milk samples and AFG1 at 0.1 µg/L in oat milk samples. In a more international context, Mohebbi et al., 2022 found AFB1 contaminations in a range between 0.054 and 0.234 µg/L in five soy milk samples purchased from Iran, similar to Rezaeefar et al., 2022, who also found lower AFB1 levels between 1.6 and 3.9 ng/L in eight soy milk samples acquired in the same country.

Other studies have analysed aflatoxins in horchata, a vegetable drink elaborated with tiger-nut. In this drink, Arranz et al., 2006 found AFB1 at 0.06 µg/L in 1 sample out of 22 analysed, whereas Sebastia et al., 2010 quantified AFB1 at 1.2–3.1 µg/L, AFB2 at 1.3–2.2 µg/L and AFG2 at 1.3–1.4 µg/L present in 3 samples of 25, and Rubert et al., 2011 also quantified AFB1 at 0.8–1.7 µg/L, AFB2 at 1.1–1.6 µg/L and AFG2 at 1.2–2.3 µg/L in 15 samples out of a total of 190. Tiger-nut drinks were purchased in Valencia (Spain), in all the studies. To the best of our knowledge, there are no more monitoring studies on aflatoxins in vegetable drinks apart from those monitored above.

The disparity of results related to the presence or absence of aflatoxins in this type of food products may be related to the presence of the toxins in the original raw materials employed for drink elaboration, added to the inadequate storage conditions, the mixing and the specific processing of the plant-based milks (Baker et al., 2014 and Juan et al., 2022). Raw materials such as cereals, nuts or legumes are highly susceptible to the colonization by ubiquitous aflatoxigenic fungus during their growing and storage, which produce aflatoxins at variable levels under a combination of factors that are not entirely clarified. Then, the aflatoxigenic contamination can be extended during the blending and storage processes of the raw materials (Gil-Serna et al., 2020; Lin et al., 2023). In addition, the specific processes for plant-based milks elaboration also promotes the aflatoxin extraction from the raw materials to the final liquid beverage through the soaking and the wet milling processing (McClements et al., 2019; Tahir et al., 2018). On the other hand, the addition to the original vegetable extracts of substances to enhance the homogenisation, flavours, preservation and nutritional enrichment of the final beverage (i.e. emulgents, fats, sugars, salts, vitamins, minerals and synthetic additives) suppose a factor that may promote the masking of aflatoxins in the final beverage, so masked aflatoxins may not be detected along the analysis if the employed methods are not able to disrupt these interactions (Romero-Sánchez et al., 2023). Finally, the high chemical and thermal stability of aflatoxins confer them resistance to the common processing methods applied to the vegetable drinks (Alshannaq & Yu, 2017; Kabak, 2009). Moreover, a concise European Legislation to establish clear and homogeneous limits for mycotoxins in plant-based derived milks is required in order to decrease the risks derived from the exposition to these mycotoxins for the consumers (Marchese et al., 2018).

3.2. *In vitro* bioaccessibility of plant-based milk samples

In this *in vitro* assay, almond, oat, rice and soy milk samples were

spiked simultaneously with aflatoxins B1, B2, G1 and G2 at 100 µg/L (equivalent to 100 µg/kg approximately) and subjected to an *in vitro* digestion process step-by-step through the sequential addition of artificial salivary, gastric and duodenal fluids to establish the final bioaccessibility values for each aflatoxin and the influence of the milk composition over each analyte tested. Once finished the digestion, the final duodenal extracts were purified, preconcentrated and analysed by HPLC-MS/MS. The final bioaccessibility percentages for each aflatoxin from each type of milk are presented on Fig. 2.

Considering that plant-based milks are water-rich liquid foods with a complex composition and that aflatoxins may be therefore found as free form in the aqueous media or linked with the milk components (masked forms), milk samples were incubated overnight after spiking to favour the possible interactions established between the aflatoxins and the matrix components of the milks. Moreover, the clean-up method for the duodenal extracts deliberately did not include any aflatoxin extraction phase to avoid that masked aflatoxins remaining after the digestion could be released, so the only analysed aflatoxins were those released to the final digestive extract in their free original form, because these free forms are the immediately bioaccessible for intestinal absorption, whereas masked aflatoxins are not considered as potentially susceptible to be absorbed by the intestine. Consequently, aflatoxins masked by the milk components or even adsorbed to the digestive components that could not be released to the soluble fraction of the duodenal extract have not been considered in the current study (i.e. the interaction between the analytes with the duodenal matrix components was corrected by spiking the duodenal extracts with the aflatoxins). Regarding the digestion process, large intestinal digestion step has not been taken into account because aflatoxins are mainly absorbed in the small intestine (Kabak & Ozbey, 2012).

The values obtained were processed by a multifactorial ANOVA to establish the individual contribution of both factors involved in the assay (i.e. plant-based milk and analyte) to the final variability of the results, the statistical differences between both factors and among the groups belonging to each factor, that is, between the plant-based milk types and between the aflatoxin types (Fig. 3). Firstly, multifactorial ANOVA confirmed that both plant-based milk and analyte factors involved in the assay are statistically significant with *p*-values <0.05, and statistically significant differences were observed between both factors. This trend confirms that milk and analyte factors are determinant in the final bioaccessibility of aflatoxins.

Regarding the constituent groups of each factor, ANOVA established significant differences between the analytes and between the plant-based milks. Although the behaviour differences observed between the aflatoxin groups were higher than between the based-plant milks groups, as shown in the ANOVA diagram from Fig. 3. So, all the aflatoxins showed statistical differences with respect to each other (no homogeneous groups). However, in the case of the plant-based milks groups, significant differences were found between almond - soy, almond - rice and oat - rice, but homogeneous groups were established between almond - oat, oat - soy and soy - rice. A Fisher LSD test was performed to confirm the differences between the groups belonging to the analyte and milk factors (Fig. S2 from Supplementary Material).

The differences obtained in the ANOVA test are in accordance with the results observed in Fig. 2, as we can appreciate that each type of aflatoxin was released from the foodstuff to the final digestive extract according to a single pattern of behaviour. Meanwhile AFB2 is bioaccessible at high levels (82%–92%) and AFG1 is poorly bioaccessible (15%–30%) regardless of the milk type, AFB1 (28%–50%) and AFG2 (32%–76%) present values broadly dependent on the milk matrix. These differences of bioaccessibility between the aflatoxin types contrast significantly with their highly structural similarity. Influence of milk composition on aflatoxins bioaccessibility is relevant, so while AFB2 and AFG1 bioaccessibility are independent of the compositional differences between the matrix milks (Table 1), AFB1 and AFG2 bioaccessibility are strongly dependent on specific composition of the milk. The major AFB1

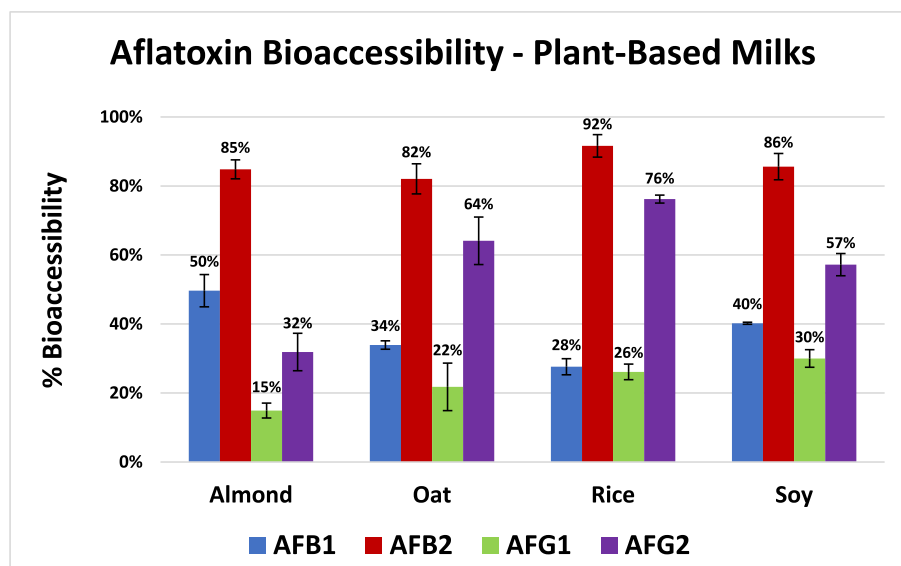


Fig. 2. Bioaccessibility percentages and standard deviations obtained for aflatoxin B1, B2, G1 and G2 from spiked almond, oat, rice and soy milks after the *in vitro* digestion assay.

MULTIFACTORIAL ANOVA – *In Vitro* Digestion

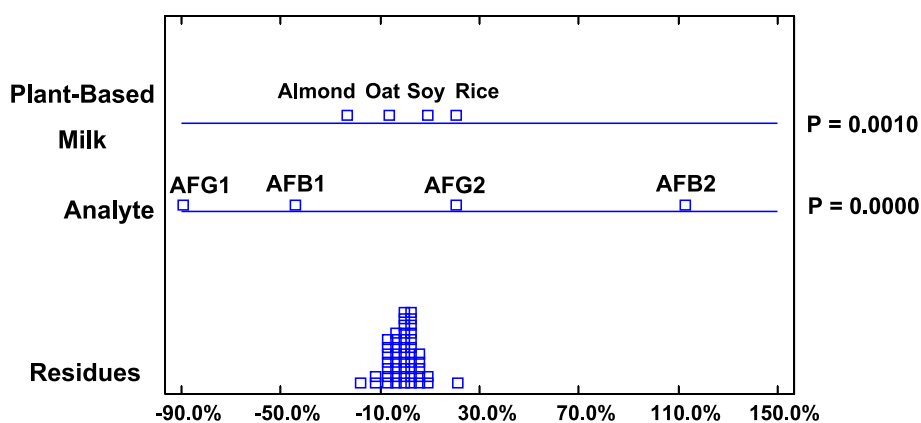


Fig. 3. Multifactorial ANOVA diagram for analyte (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) and based-plant milk (almond, oat, rice, soy) factors evaluated and p-values obtained.

bioaccessibility value (50%) obtained from almond milk seems to be related with the high fats content of this type of milk, but the high carbohydrates content in oat and rice milks reduce the AFB1 bioaccessibility until 34% and 28%, while the 40% AFB1 bioaccessibility from soy milk represents an intermediate value between the almond and the oat and rice milks. This trend could be related to the intermediate composition of soy milk (similar fats content to the almond milk but more carbohydrates, according to Table 1) and its higher protein content regarding to the rest of milks. Likewise, the opposite trend is observed for AFG2, as its bioaccessibility is higher from the oat and rice milks (64% and 76%) in contrast to the almond milk (32%), whereas intermediate values are obtained for AFG2 from the soy milk (57%).

Thus, fat, carbohydrate and protein content play an important role in the final bioaccessibility of AFB1 and AFG2 (Tahir et al., 2018). Considering that AFB1 is the most lipophilic aflatoxin (United States Environmental Protection Agency (EPA), 2012) due to the presence of an additional double bond (absent on type 2 aflatoxins) and the absence of the additional lactone group (present on type G aflatoxins), as well as the major presence of emulgents as much fats contain the plant-based milks (Gil-Serna et al., 2020), maybe the emulgent action from the

fatty milks could increase the final solubility of the fats and the AFB1 bioaccessibility in the duodenal extracts (Fernández-García et al., 2009). Regarding to the higher bioaccessibility values for AFG2 from rice and oat milks, this phenomenon could be related to the higher polarity of this aflatoxin according to the United States Environmental Protection Agency (EPA), 2012, whose diffusion to the final aqueous digestive extract could be easier from milks with a high polar composition as rice or oat milks. The relatively low AFB1 bioaccessibility values <50% obtained from all the plant-based milks contrast significantly with the high values close to 100% usually obtained by other authors for AFB1 from solid foods with variable composition, as the developed by Versantvoort et al., 2005 on peanut slurry or by Kabak et al., 2009 on pistachio nuts and infant processed pasta, among others; even for aflatoxin M1 (the main mammal hydroxylated metabolite derived from AFB1) from cow milk, bioaccessibility ratios between 81%–86% were found by Kabak & Ozbey, 2012, which implicates a higher risk of these foodstuffs related to AFB1 exposure compared to plant-based milks, considering that AFB1 is the most toxic and cancerous aflatoxin (Marchese et al., 2018).

Although this is the first study to test the aflatoxin bioaccessibility

from plant-based milks, there are behaviour patterns common to other *in vitro* digestion studies with aflatoxins from other foodstuffs. This is the case of the assay developed by Romero-Sánchez et al., 2023 to evaluate the bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from white and brown rice artificially spiked, where the authors also obtained important bioaccessibility differences between the food matrices, but the digestive trends among the aflatoxins were more homogeneous. However, a similar assay developed by Da Silva et al., 2019 with the same rice types established important differences in behaviour between the aflatoxins as well as between the matrices, in line with the trend observed in the present study. So, even from the same matrix, the bioaccessibility patterns can differ between the aflatoxin types, which can be due to the structural differences between aflatoxins and, to a lesser extent, to the experimental digestion conditions applied, the aflatoxin level or even the contamination type (natural or artificial) applied over the foodstuff (Hur et al., 2011; Kabak et al., 2009).

Considering that the final bioaccessible aflatoxin is the free toxin present in the soluble fraction of the duodenal extract, it is possible that the aflatoxins were initially linked to the milk matrix components and the digestive physio-chemical conditions provoked the leakage of these interactions and their release; or even a part from the aflatoxins remained at the original free form in the initial milk, and then were transferred to the final duodenal extract by mixing with the initial milk matrix without extractive action from the digestive fluids, according with Fernández-García et al., 2009. Aflatoxins which were not detected along the *in vitro* digestion could be formed by masked aflatoxins linked with matrix components (González-Arias et al., 2013), or aflatoxins partially degraded by some digestion conditions as the strongly acidic gastric pH at 1.8. This is in agreement with the ability of acidic substances as hydrochloric acid (used to adjust the gastric pH) of disturbing the aflatoxin structure, decreasing the concentration of the original aflatoxin, as Kabak et al., 2006 reviewed. Romero-Sánchez et al., 2023 also observed a reduction on the aflatoxin bioaccessibility from spiked rice during the gastric digestion step. Based on these hypothesis, new studies would be necessary to determine how the different physio-chemical digestive parameters affect aflatoxins behaviour.

3.3. Validation of analysis method for aflatoxins in commercial plant-based milks and *in vitro* digestion assay

The methodology for the analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial samples of plant-based milks was evaluated in terms of accuracy and precision. Firstly, LOD and LOQ were calculated for each aflatoxin in almond, oat, rice and soy milk matrices for the determination method. LOD values ranged between 4 ng/kg and 39 ng/kg, and LOQ values between 14 ng/kg and 131 ng/kg in the initial samples. LOD and LOQ values for the determination method are detailed on Table S2 in the Supplementary Material. These values are far below the limits established by the current legislation for aflatoxin B1 and the total content of aflatoxins on cereals, legumes (2–4 µg/kg) and nuts (8–10 µg/kg) and their derived products, even with high dilution levels. On the other hand, LOD and LOQ range values for the analytical instrument were between 0.21 and 1.53 µg/L and between 0.69 and 5.09 µg/L. LOD and LOQ values for the analytical instrument are detailed on Table S3 in the Supplementary Material. Linearity of the matrix-matched calibration curve was satisfactory within the range from 25 µg/L to 250 µg/L (equivalent to a range from 0.5 µg/kg to 5 µg/kg in the initial drink) for each type of aflatoxin present in the four plant-based milks, with R^2 values >0.99 in all cases. Regarding the recoveries obtained in this method, blank samples of each matrix were spiked by triplicate with each aflatoxin at 2.5 µg/kg previous to the application of the extraction and clean-up methodology. Recovery assays were repeated to test the intra-day (two assays per day) and inter-day (two different days) reproducibility, and the final range of media recoveries ranged from 73% to 98% in all matrices, with the only exception of AFG2 in oat milk with a recovery of 46%, and standard deviations resulted between 1%

and 6%, and RSD range was between 1% and 8% in all cases. No differences were found between the recovery values obtained between different days nor into the same day in terms of accuracy or precision. The average from all the recovery results is represented in Fig. 4. Considering that the Commission Regulation (EC) No. 401/2006, 2006 establishes minimal recovery values between 70 and 110% in samples spiked at 1–10 µg/kg for aflatoxin extraction methodologies from foodstuffs, all the recoveries are in accordance with the legislation, except the recovery of AFG2 from oat milk. This low recovery value could be attributed to the presence of specific components in oat milk able to interact only with AFG2, thus preventing their extraction and retention on the cartridge. Regarding the matrix factor (MF), the final range of recoveries considering only the losses caused by the matrix effect ranged from 127% to 137% in rice milk, from 42% to 66% in oat milk, from 72% to 94% in almond milk, and from 46% to 73% in soy milk.

For the bioaccessibility test, the methodology applied to purify the aflatoxins from the digested extracts of spiked plant-based milks was evaluated to establish the aflatoxin losses exclusively due to the clean-up method. In this case, the range of recoveries for all the aflatoxins achieved by the clean-up methodology applied over the final spiked digestive extracts obtained from plant-based milks was 84%–100% for almond milk extracts, 96%–104% for oat milk extracts, 89%–99% for rice milk extracts, and 106%–116% for soy milk extracts. On the other hand, LOD and LOQ of all aflatoxins in the plant-based milk digestive extracts for the *in vitro* digestion methodology resulted in the following ranges: LOD at 0.42–13.31 µg/L and LOQ at 1.41–44.38 µg/L for almond milk; LOD at 0.56–1.80 µg/L and LOQ at 1.86–6.00 µg/L for oat milk; LOD at 0.15–2.29 µg/L and LOQ at 0.50–7.64 µg/L for rice milk; and LOD at 0.16–2.21 µg/L and LOQ at 0.53–7.38 µg/L for soy milk.

4. Conclusions

Considering the growing implementation of the plant-based milks as healthy and vegan dietary alternatives in addition to their contamination susceptibility by aflatoxigenic fungus, the current optimized method to analyse the aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from almond, oat, rice and soy milks represents a useful tool to test the presence of these highly toxic substances in commercial samples.

This method of analysis has detected AFB1, AFB2 and AFG1 in at least one sample of soy milk and, although the contaminations could not be quantified, the presence of these aflatoxins on plant-based milks suppose a health risk for the customer, especially AFB1.

On the other hand, the *in vitro* digestion assay performed over almond, oat, rice and soy milks has demonstrated the high influence of the aflatoxin structure and the plant-based nutritional composition on the final bioaccessibility of aflatoxins. However, more *in vitro* digestion studies are needed to elucidate the specific interaction between aflatoxins and the matrix components of each type of milk, to detect sources of aflatoxin losses during the digestion, and to extend aflatoxin bioaccessibility studies to other plant-based milks, as new types of plant-based beverages are continuously entering the market.

Finally, the moderate bioaccessibility observed for AFB1 from the plant-based milks tested supposes a human exposure barrier against this hazardous aflatoxin, that suppose an additional health advantage for plant-based milks compared to other contaminated foodstuffs.

CRedit authorship contribution statement

Iván Romero-Sánchez: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Irene Alonso-Núñez:** Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Emma Gracia-Lor:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization. **Yolanda Madrid-Albarrán:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration,

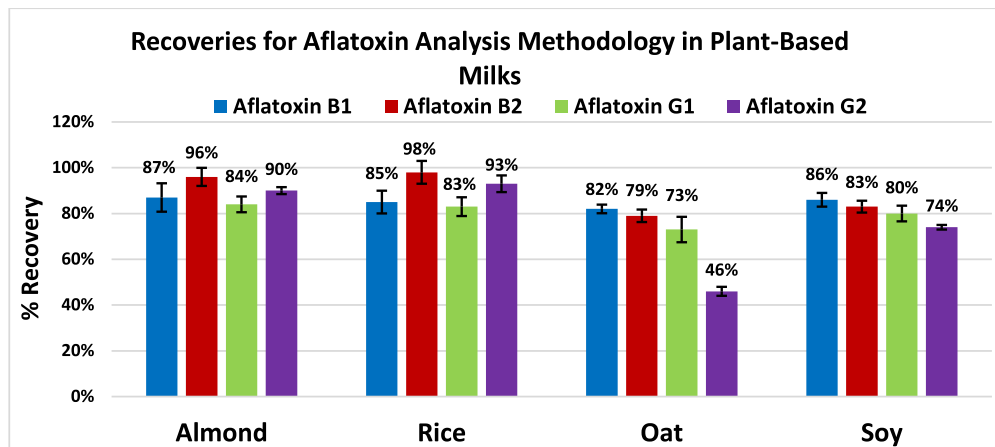


Fig. 4. Mean recovery percentages and standard deviations obtained for aflatoxin B1, B2, G1 and G2 from spiked almond, rice, oat and soy milks after the application of the plant-based milks analysis method.

Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This work was supported the Spanish Commission of Science and Technology (PID2020-114714RB-I00) and by the Madrid Government under the Multiannual Agreement with Complutense University in the line Program to Stimulate Research for Young Doctors in the context of the V PRICIT (Regional Program of Research and Technological Innovation) [PR65/19-22432].

I. Romero-Sánchez acknowledges Complutense University of Madrid for his predoctoral grant [CT63/19-CT64/19].

Authors are grateful to the Analysis Service Unit facilities of ICTAN for the analysis of Chromatography and Mass Spectrometry.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140538>.

References

- Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(632), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Arranz, I., Stroka, J., & Neugebauer, M. (2006). Determination of aflatoxin B1 in tiger nut-based soft drinks. *Food Additives and Contaminants*, *23*(3), 305–308. <https://doi.org/10.1080/026520305500415652>
- Baker, R. C., Ford, R. M., Helander, M. E., Marekci, J., Natarajan, R., & Ray, B. (2014). Framework for managing mycotoxin risks in the food industry. *Journal of Food Protection*, *77*(12), 2181–2188. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-060>
- Benkerroum, N. (2020). Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(2). <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>. MDPI AG.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, *119*(1–2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>
- Commission Regulation (EC). (2006). No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, 12 http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxin_guidance_es.pdf.
- Commission Regulation (EU). (2023). 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006, 1. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?toc=OJ%3AL%3A2023%3A119%3ATOC&uri=uriserv%3AOJ.L_.2023.119.01.0103.01.SPA&pri.
- Da Silva, M. N., Massarolo, K. C., Kupski, L., & Furlong, E. B. (2019). Hydrothermal treatment of rice: Reduction of aflatoxins and bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, *85*, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.12.009>
- EFSA. (2013). Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products. *EFSA Supporting Publications*, *10*(3). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.EN-406>
- European Commission. (2017). Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. SANTE/12089 /2016. https://ec.europa.eu/food/system/files/2017-05/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf.
- FAO, & WHO. (2018). *Safety evaluation of certain contaminants in food*.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, *29*(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2020). Mycotoxins in functional beverages: A review. In , 6. *Beverages* (pp. 1–11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/beverages6030052>. Issue 3.
- González-Arias, C. A., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2013). Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using *in vitro* digestion models: A review. *World Mycotoxin Journal*, *6*(2), 167–184. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1521>
- Hamed, A. M., Abdel-Hamid, M., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., & Arroyo-Manzanares, N. (2019). Determination of aflatoxins in plant-based milk and dairy products by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Letters*, *52*(2), 363–372. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1467434>
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, *125*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>
- Juan, C., Mañes, J., Juan-García, A., & Moltó, J. C. (2022). Multimycotoxin analysis in oat, rice, almond and soy beverages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Applied Sciences*, *12*(8), 3942. <https://doi.org/10.3390/app12083942>
- Kabak, B. (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*(4), 549–554. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>
- Kabak, B., Brandon, E. F. A., Var, L., Blokland, M., & Sips, A. J. A. M. (2009). Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an *in vitro* digestion model under fed conditions. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *44*(5), 472–480. <https://doi.org/10.1080/03601230902935154>
- Kabak, B., Dobson, A. D. W., & Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *46*(8), 593–619. <https://doi.org/10.1080/10408390500436185>
- Kabak, B., & Ozbey, F. (2012). Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an *in vitro* digestion model. *Food Control*, *28*(2), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.029>
- Lin, X., Duan, N., Wu, J., Lv, Z., Wang, Z., & Wu, S. (2023). Potential food safety risk factors in plant-based foods: Source, occurrence, and detection methods. *Trends in Food Science and Technology*, *138*, 511–522. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.032>
- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2016). Foods for special dietary needs: Non-dairy plant-based Milk substitutes and fermented dairy-type products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(3), 339–349. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>

- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, *10*(6), 214–233. <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>
- McClements, D. J., Newman, E., & McClements, I. F. (2019). Plant-based milks: A review of the science underpinning their design, fabrication, and performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(6), 2047–2067. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12505>
- Miró-Abella, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Borrull, F., Ras, R., & Fontanals, N. (2017). Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *229*, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.078>
- Mohebbi, A., Nemati, M., Afshar Mogaddam, M. R., Farajzadeh, M. A., & Lotfipour, F. (2022). Dispersive micro–solid–phase extraction of aflatoxins from commercial soy milk samples using a green vitamin–based metal–organic framework as an efficient sorbent followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination. *Journal of Chromatography A*, *1673*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463099>
- Rezaeefar, A., Nemati, M., Farajzadeh, M. A., Afshar Mogaddam, M. R., & Lotfipour, F. (2022). Development of N and S doped carbon sorbent-based dispersive micro solid phase extraction method combined with dispersive liquid-liquid microextraction for selected mycotoxins from soymilk samples. *Microchemical Journal*, *173*. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107039>
- Rodríguez-Cañás, I., González-Jartín, J. M., Alfonso, A., Alvarino, R., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2024). Application of a multi-toxin detect method to analyze mycotoxins occurrence in plant-based beverages. *Food Chemistry*, *434*(137427). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137427>
- Romero-Sánchez, I., Gracia-Lor, E., & Madrid-Albarrán, Y. (2023). Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of *in vitro* bioaccessibility from white and brown rice. *Food Chemistry*, *436*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137738>
- Romero-Sánchez, I., Ramírez-García, L., Gracia-Lor, E., & Madrid-Albarrán, Y. (2022). Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, *395* (133611), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133611>
- Rubert, J., Sebastià, N., Soriano, J. M., Soler, C., & Mañes, J. (2011). One-year monitoring of aflatoxins and ochratoxin A in tiger-nuts and their beverages. *Food Chemistry*, *127*(2), 822–826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.016>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. In, *Vol. 124. Food and chemical toxicology* (pp. 81–100). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Sebastià, N., Soler, C., Soriano, J. M., & Mañes, J. (2010). Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2609–2612. <https://doi.org/10.1021/jf903818x>
- Silva, A. R. A., Silva, M. M. N., & Ribeiro, B. D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. In, *Vol. 131. Food research international*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>
- Tahir, N. I., Hussain, S., Javed, M., Rehman, H., Shahzady, T. G., Parveen, B., & Ali, K. G. (2018). Nature of aflatoxins: Their extraction, analysis, and control. *Journal of Food Safety*, *38*(6). <https://doi.org/10.1111/jfs.12561>. Blackwell Publishing Ltd.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). (2012, June 12). US EPA; Estimation program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Jun 12, 2013. <https://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.html>.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van De Kamp, E., Rempelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, *43*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Analysis and evaluation of *in vitro* bioaccessibility of aflatoxins

B1, B2, G1 and G2 in plant-based milks.

Iván Romero-Sánchez*, Irene Alonso-Núñez, Emma Gracia-Lor* and Yolanda Madrid-Albarrán

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

* Corresponding author: ivaromer@ucm.es

* Corresponding author: emgracia@ucm.es

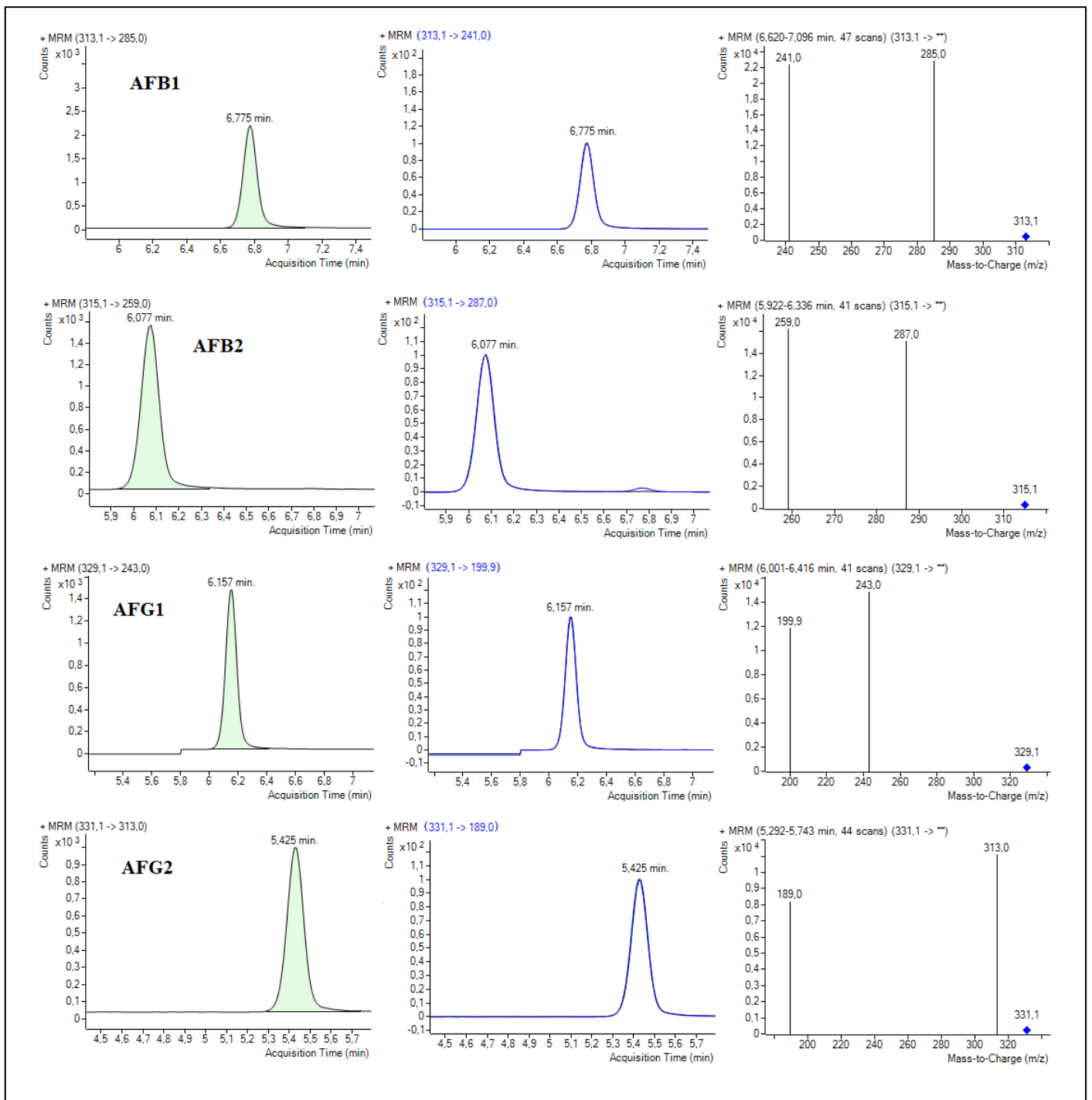


Figure S1. Chromatograms and MS/MS spectrums of the quantitative and confirmative transitions optimized for AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2.

Fisher LSD Test (95 %) – *In Vitro* Digestion

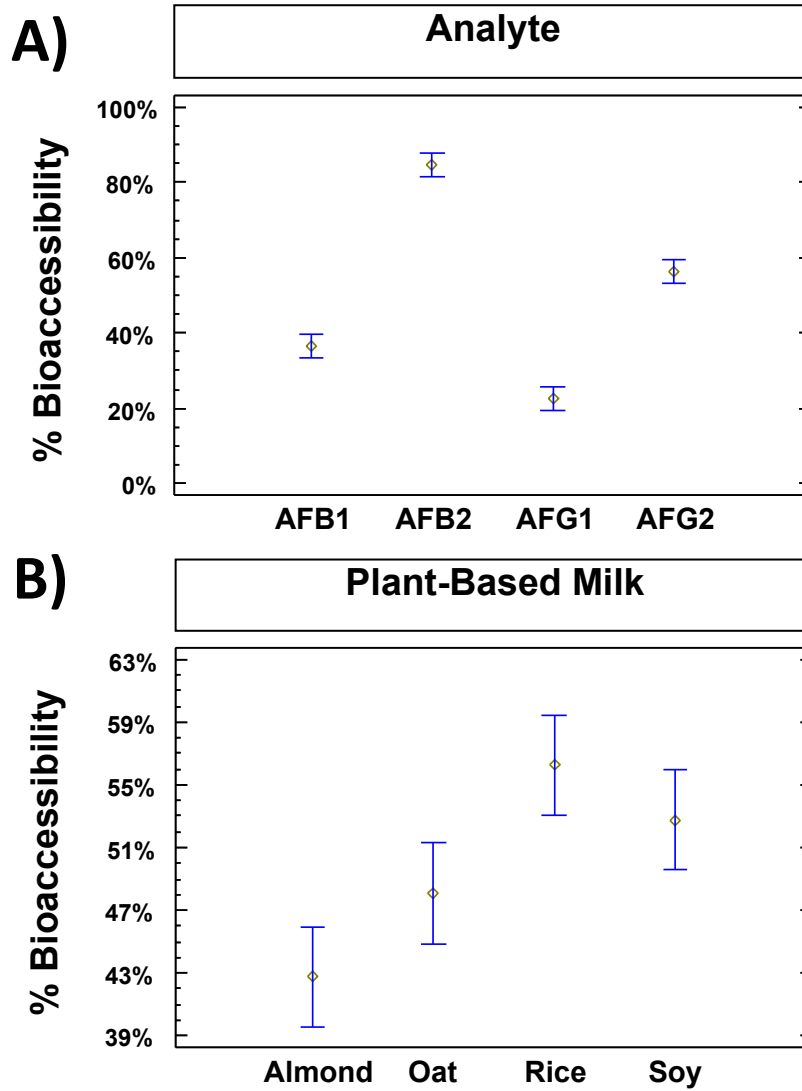


Figure S2. Graphical results of Fisher LSD test (95%) that compare the variability of bioaccessibility percentages regarding to A) The analytes (aflatoxins B1, B2, G1 and G2); and B) The different plant-based milks (almond, oat, rice and soy).

Table S1. Retention times, precursor ions, quantitative and confirmative transitions with collision energy values employed on HPLC-MS/MS analysis.

Compound	Retention time (min)	Precursor Ion (m/z)	Transitions	
			Product Ion I, m/z (CE, V)	Product Ion II, m/z (CE, V)
AFB1	6.78	313.1	285.0 (22)	241.0 (38)
AFB2	6.06	315.1	287.0 (26)	259.0 (30)
AFG1	6.17	329.1	243.0 (26)	199.9 (46)
AFG2	5.43	331.1	313.0 (22)	189.0 (46)

Table S2. LOD and LOQ values for determination method (ng/kg) calculated over initial sample of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from spiked almond, oat, rice and soy milks before the application of the aflatoxin extraction and clean-up method of commercial plant-based milk samples.

Plant-Based Milk	AFB1		AFB2		AFG1		AFG2	
	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)
Almond	10	32	4	14	9	31	11	37
Oat	26	88	8	27	39	131	21	71
Rice	13	43	28	93	21	69	15	50
Soy	11	36	4	15	5	16	16	54

Table S3. LOD and LOQ values for analytical instrument ($\mu\text{g/L}$) calculated over pure stock solutions of aflatoxins B1, B2, G1 and G2.

Stock Solution	AFB1		AFB2		AFG1		AFG2	
	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
	0.40	1.35	1.53	5.09	0.21	0.69	0.56	1.87

2. POTENCIAL NEUROTÓXICO DE LAS MICOTOXINAS

Las micotoxinas ejercen su efecto tóxico en diferentes órganos y sistemas según su capacidad para distribuirse en el organismo y para atravesar las barreras tisulares (el epitelio gastrointestinal, los glomérulos renales, la BBB, etc.). Los efectos tóxicos más comunes provocados por la mayoría de las micotoxinas afectan al hígado o los riñones, debido al papel fundamental de estos órganos en su detoxificación y excreción. Por otra parte, la baja polaridad de las micotoxinas también posibilita su interacción con el sistema nervioso central. En este sentido, se ha demostrado el efecto neurotóxico de determinadas micotoxinas como la OTA, la FB1 e incluso la STG mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, no se dispone de mucha información acerca de la neurotoxicidad de las aflatoxinas, pese a tener una similar liposolubilidad y, por tanto, capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, con el agravante de que las aflatoxinas son las micotoxinas más peligrosas debido a su elevada genotoxicidad. El conocimiento del potencial neurotóxico de las aflatoxinas es menor en comparación con su toxicidad a niveles hepático, intestinal y renal. Se ha demostrado que la exposición neuronal a determinadas micotoxinas puede estimular la síntesis y la proliferación de péptidos β amiloides, cuya agregación es uno de los desencadenantes de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Sin embargo, se desconoce si las micotoxinas pueden ejercer algún tipo de interacción directa con este tipo de péptidos y, de esta manera, provocar su agregación a nivel molecular.

Por todo ello, en el trabajo titulado *Neurotoxic effect of mycotoxins on human neuroblastoma cell line and amyloid β aggregation. Protective effect of curcumin and caffeine* (enviado a la Revista Toxicology) se estudió la potencial neurotoxicidad de las aflatoxinas B y G, la OTA y la STG, mediante dos aproximaciones : 1) su capacidad para agregar el péptido $A\beta_{1-42}$ en condiciones *in vitro* y 2) su citotoxicidad sobre la línea celular neuronal indiferenciada SH-SY5Y. Adicionalmente, se ha evaluado la capacidad de la curcumina y de la cafeína (dos polifenoles con propiedades antioxidantes y antiagregantes reconocidas) para contrarrestar los posibles efectos agregativos y citotóxicos de las micotoxinas evaluadas. Los resultados obtenidos evidenciaron que las aflatoxinas B1 y G1, la OTA y la STG provocan una fuerte agregación *in vitro* del péptido $A\beta_{1-42}$, mientras que la curcumina y la cafeína son capaces de minimizar la agregación causada por las aflatoxinas B1, G1 y por la STG, aunque la cafeína potencia la agregación causada por la OTA. Por otro lado, se demostró una elevada citotoxicidad por parte de las cuatro

micotoxinas ($LC_{50} < 3 \mu M$), siendo la STG la más tóxica en comparación con las demás, mientras que la AFB1 resultó ser la menos tóxica. La citotoxicidad ejercida por la AFB1 y la STG puede ser reducida por la coexposición con curcumina, aunque esta sustancia también potencia la citotoxicidad provocada por la AFG1, mientras que la cafeína reduce ligeramente la citotoxicidad provocada por la AFB1, la OTA y la STG. En conclusión, este trabajo evidencia dos mecanismos de neurotoxicidad específicos ejercidos por diferentes tipos de micotoxinas a niveles *in vitro* (agregación del péptido $A\beta_{1-42}$ y citotoxicidad sobre células de fenotipo neuronal), así como el potencial de la curcumina y de la cafeína para mitigar la neurotoxicidad provocada por estas micotoxinas, aunque los resultados dependen del tipo de micotoxina.

Artículo 4. Efectos neurotóxicos de micotoxinas sobre la línea celular de neuroblastoma humano y sobre la agregación del péptido β amiloide. Efecto protector de la curcumina y la cafeína.

Neurotoxic effect of mycotoxins on human neuroblastoma cell line and amyloid β aggregation. Protective effect of curcumin and caffeine.

Iván Romero-Sánchez, David Vicente-Zurdo, Emma Gracia-Lor, Yolanda Madrid-Albarrán.

Toxicology (enviado, TOX-24-1875)

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

1° INTERNATIONAL WORKSHOP OF THE SPANISH NETWORK ON MYCOTOXINS, TOXIGENIC FUNGI AND THEIR DECONTAMINATION PROCESSES. Evaluation of intestinal and neuronal behavior of mycotoxins by in vitro assays. Valencia, España, junio de 2023. Tipo de comunicación: Póster.

Toxicology

NEUROTOXIC EFFECT OF MYCOTOXINS ON HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE AND AMYLOID β AGGREGATION. PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN AND CAFFEINE.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	TOX-24-1875
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Mycotoxins; Curcumin; Caffeine; Amyloid β peptide; Cytotoxicity; SH-SY5Y cells
Corresponding Author:	Iván Romero Complutense University of Madrid SPAIN
First Author:	Iván Romero-Sánchez
Order of Authors:	Iván Romero-Sánchez David Vicente-Zurdo Emma Gracia-Lor Yolanda Madrid-Albarrán
Abstract:	<p>Neurotoxic influence of mycotoxins on neurodegenerative pathologies is scarce. Moreover, some natural substances such as curcumin and caffeine could counterpart to these neurotoxic effects. Here, neurotoxicity of aflatoxins B and G (AF), ochratoxin A (OTA) and sterigmatocystin (STG) has been evaluated by testing their ability to aggregate the Aβ1-42 peptide and their cytotoxicity on the neural undifferentiated SH-SY5Y cell line for 48 h, as well as the protective effect exerted by curcumin and caffeine against both mycotoxigenic effects.</p> <p>Transmission electronic microscopy (TEM) results demonstrated the high aggregation capacity of AFB1, AFG1 and, to a lesser extent, OTA and STG (3 μM) on the Aβ1-42 peptide. Curcumin and caffeine (6 μM) partially inhibited the aggregation induced by AFB1, AFG1 and STG, but caffeine enhanced the aggregation caused by OTA.</p> <p>Aggregative mycotoxins at 0.3-3 μM confirmed these LC50 values over SH-SY5Y cells: STG (0.97 μM) > OTA (1.82 μM) > AFG1 (3.13 μM) > AFB1 (> 3 μM). Curcumin reduced the AFB1 and STG induced cytotoxicity approximately 35% but increased AFG1 mortality to 49%, whereas caffeine reduced the AFB1, OTA and STG cytotoxicity to 15%, 26% and 24% but increased the AFG1 mortality by 10%.</p> <p>This is first time that the aggregation capacity of AFB1, AFG1, OTA and STG on the Aβ1-42 peptide and the higher SH-SY5Y cell cytotoxicity of STE and OTA compared to aflatoxins have been demonstrated, as well as the potential of curcumin and caffeine to counterpart or enhance these neurotoxic effects depending on the mycotoxin type.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Esther Gómez Mejía egomez03@uclm.es This researcher is an expert on polyphenols and the aggregation of the Amyloid Beta peptide.</p> <p>Rosario Serrano Vargas rosario.serrano@uclm.es The researcher is an expert on molecular mechanisms caused by toxic substances.</p> <p>Verónica Zingales veronica.zingales@uv.es The researcher is specialized on cytotoxic mechanisms of sterigmatocystin over SH-SY5Y cell line.</p> <p>Carmen Arribas Mocoeroa Carmen.Arribas@uclm.es The researcher is an expert on molecular signaling caused by toxic substances</p> <p>Massimo Frangiamone massimo.frangiamone@uv.es The researcher is an expert on mycotoxin toxicology by in vitro studies.</p>

Madrid, 9 December 2024

Toxicology

Editorial Office

Dear Editor,

Please, find enclosed our paper entitled “NEUROTOXIC EFFECT OF MYCOTOXINS ON HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE AND AMYLOID β AGGREGATION. PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN AND CAFFEINE.”.

This paper explores some neurotoxic effects induced by different mycotoxins (aflatoxins B and G, ochratoxin A and sterigmatocystin) as the *in vitro* aggregation over the A β peptide or the cytotoxicity over human neural undifferentiated cells such as SH-SY5Y. Moreover, the neuroprotective potential of curcumin and caffeine is evaluated to counterpart to these possible effects caused by mycotoxins.

This study acquires relevance because mycotoxins exposure causes serious problems for human health, but neurotoxic effects derived from their exposition are less explored than their toxicities over other different organs and tissues. In addition, this approach is highly original because it is the first time that the aggregative effect of mycotoxins over the A β peptide is tested, as well as the protective role of the curcumin and caffeine against specific mycotoxin neurotoxic effects at *in vitro* levels. So, this work provides valuable contributions to the toxicology field through the exploration of specific neurotoxic effects of mycotoxins at molecular level and over neural cells at *in vitro* levels combined with the neuroprotective potential of common diet compounds such as curcumin and caffeine.

We believe that the content of the paper fits the Aims and Scope in Toxicology Journal by considering the general background of this journal about natural toxins (with specific emphasis on mycotoxins) and their toxicological effect over human health. A graphic abstract has been included to provide a schematic understanding of the work as a whole.

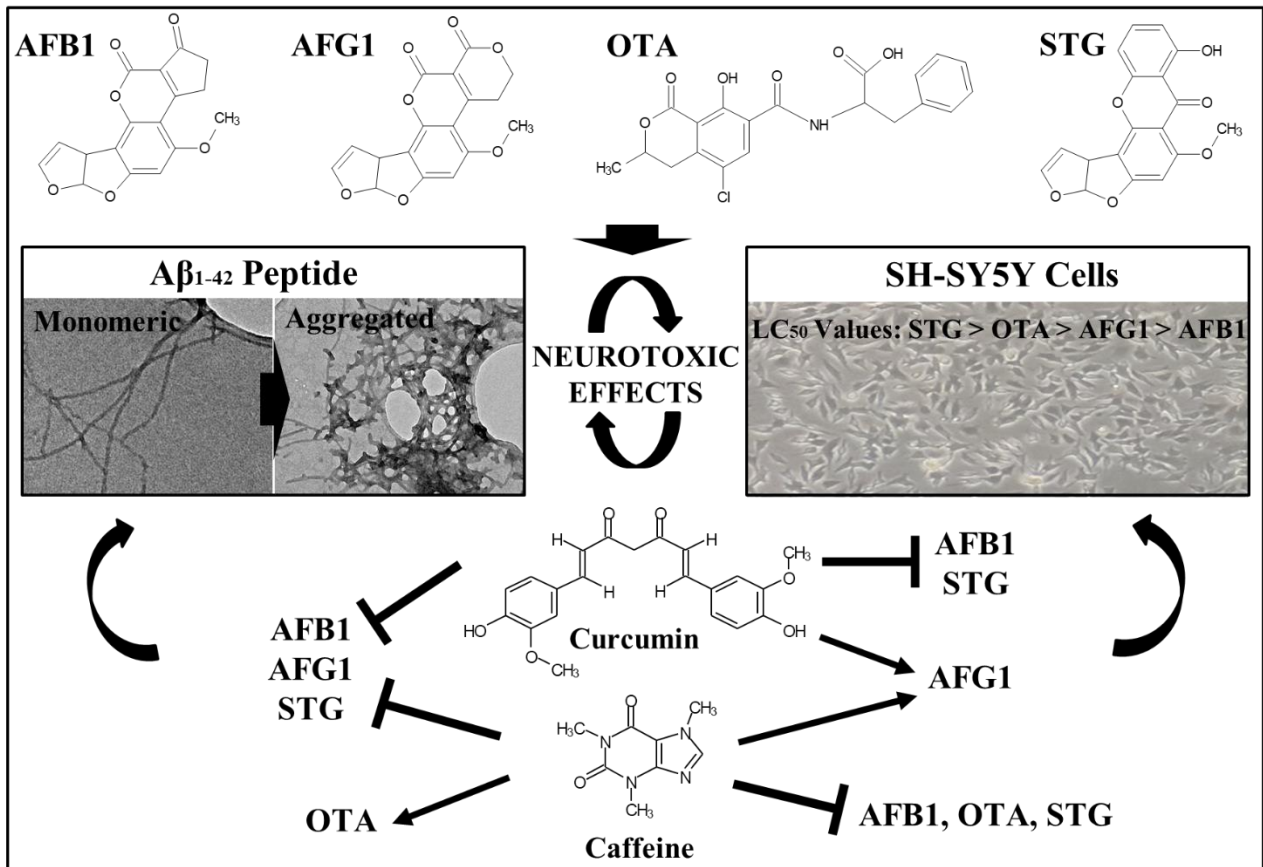
Neither this manuscript nor any parts of its content are currently under consideration or published in another journal. Considering the above, we kindly ask you to consider it for publication in Toxicology Journal.

Thanking you in advance for considering our work, we look forward to hearing from you.

Yours sincerely,

Iván Romero-Sánchez

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- AFB1, AFG1, OTA and STG induced *in vitro* aggregation of A β ₁₋₄₂ peptide.
- The degree of interaction between mycotoxins and A β ₁₋₄₂ peptide was very low.
- Curcumin and caffeine inhibited AFB1-, AFG1- and STG-induced aggregation.
- STG and AFB1 were the most and least cytotoxic mycotoxins over SH-SY5Y cells.
- Curcumin and caffeine were neuroprotective against AFB1, OTA and STG cytotoxicity.
- Neuroprotective effects of curcumin and caffeine mycotoxin dependent.

1 **NEUROTOXIC EFFECT OF MYCOTOXINS ON HUMAN NEUROBLASTOMA**
2 **CELL LINE AND AMYLOID β AGGREGATION. PROTECTIVE EFFECT OF**
3 **CURCUMIN AND CAFFEINE.**

4 Iván Romero-Sánchez*, David Vicente-Zurdo, Emma Gracia-Lor* and Yolanda Madrid-
5 Albarrán

6 Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of
7 Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

8 * Corresponding author: ivaromer@ucm.es

9 * Corresponding author: emgracia@ucm.es

10 ABSTRACT

11 Neurotoxic influence of mycotoxins on neurodegenerative pathologies is scarce.
12 Moreover, some natural substances such as curcumin and caffeine could counterpart to
13 these neurotoxic effects. Here, neurotoxicity of aflatoxins B and G (AF), ochratoxin A
14 (OTA) and sterigmatocystin (STG) has been evaluated by testing their ability to aggregate
15 the A β ₁₋₄₂ peptide and their cytotoxicity on the neural undifferentiated SH-SY5Y cell line
16 for 48 h, as well as the protective effect exerted by curcumin and caffeine against both
17 mycotoxigenic effects.

18 Transmission electronic microscopy (TEM) results demonstrated the high aggregation
19 capacity of AFB1, AFG1 and, to a lesser extent, OTA and STG (3 μ M) on the A β ₁₋₄₂
20 peptide. Curcumin and caffeine (6 μ M) partially inhibited the aggregation induced by
21 AFB1, AFG1 and STG, but caffeine enhanced the aggregation caused by OTA.
22 Aggregative mycotoxins at 0.3-3 μ M confirmed these LC₅₀ values over SH-SY5Y cells:
23 STG (0.97 μ M) > OTA (1.82 μ M) > AFG1 (3.13 μ M) > AFB1 (> 3 μ M). Curcumin
24 reduced the AFB1 and STG induced cytotoxicity approximately 35% but increased AFG1
25 mortality to 49%, whereas caffeine reduced the AFB1, OTA and STG cytotoxicity to 15%,
26 26% and 24% but increased the AFG1 mortality by 10%.

27 This is first time that the aggregation capacity of AFB1, AFG1, OTA and STG on the A β ₁₋
28 ₄₂ peptide and the higher SH-SY5Y cell cytotoxicity of STE and OTA compared to
29 aflatoxins have been demonstrated, as well as the potential of curcumin and caffeine to
30 counterpart or enhance these neurotoxic effects depending on the mycotoxin type.

31 **Keywords:** Mycotoxins / Curcumin / Caffeine / Amyloid β peptide / Cytotoxicity / SH-
32 SY5Y cells

33 **Chemical compounds analysed in this article:**

34 Aflatoxin B1 (Pubchem CID: 186907); Aflatoxin B2 (Pubchem CID: 2724360);
35 Aflatoxin G1 (Pubchem CID: 14421); Aflatoxin G2 (Pubchem CID: 2724362);
36 Ochratoxin A (Pubchem CID: 442530); Sterigmatocystin (Pubchem CID: 5280389);
37 Curcumin (Pubchem CID: 969516); Caffeine (Pubchem CID: 2519).

38 1. Introduction

39 Mycotoxins are synthesized as secondary metabolites produced by different fungal genres
40 such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* or *Tricothecum*. Mycotoxins that
41 represent the greatest health hazard (even at low exposure ratios) are those that exert a
42 wide range of acute and chronic toxicities, are prevalent in crops and foodstuffs and are
43 resistant to food processing techniques. Some examples are aflatoxins (especially
44 aflatoxin B1 [AFB1]), ochratoxins (especially ochratoxin A [OTA]), sterigmatocystin
45 (STG), deoxynivalenol (DON), citrinin (CIT), patulin (PAT), zearalenone (ZEA),
46 enniatins, fumonisins, toxins T2 and HT-2, or other emerging toxins [1].

47 Aging, eating behaviors, food choice, health status and route of exposure (ingestion,
48 inhalation or cutaneous) significantly influence the toxicity of mycotoxins. Ingestion is
49 the most common route of exposure to mycotoxins due to their prevalence in food
50 products [2]. After ingestion, these toxins could generate health problems such as
51 gastrointestinal disorders, abdominal pain, convulsions, pulmonary and cerebral edema,
52 coma or even death, among other symptoms. Chronical effects include the development
53 of cancer in tissues that have been in contact with mycotoxins (with especial prevalence
54 of hepatocarcinoma [HCC]), hepatic and renal damage, and hormonal, immune and
55 neurological disorders [3]. The International Agency Research of Cancer (IARC) has
56 classified mycotoxins into five groups (1, 2A, 2B, 3 and 4) according to their
57 carcinogenicity [4].

58 However, the neurotoxicity of mycotoxins and their potential influence on the
59 development of neurodegenerative pathologies such as Alzheimer (AD) or Parkinson
60 (PD) diseases is still unknown [5]. Among the most neurotoxic mycotoxins reported are
61 AFB1, OTA, and, to a lesser extent, STG, among others. The mechanisms of
62 neurotoxicity are highly dependent on chemical structure and pharmacokinetic properties
63 [6].

64 The neurotoxicity of AFB1 is strongly conditioned by the reactive specie AFB1-exo-8,9-
65 epoxide (AFBO), generated during the metabolism of AFB1 [7]. The electronic instability
66 of AFBO causes its reaction with DNA, RNA and proteins, forming the genotoxic adduct
67 8,9-dihydro-8(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (AFB1-N7-Gua), that stimulates DNA
68 mutagenicity (AFB1 is considered as group 1 carcinogenic by IARC), inhibition of
69 protein synthesis, loss of protein function, oxidative stress and cellular apoptosis [8].

70 Moreover, the high lipid solubility of aflatoxins facilitates their passage through the
71 blood-brain barrier (BBB), causing a partial disruption of this membrane. The
72 combination of the behavior of AFB1 liposoluble and its metabolism into genotoxic
73 adducts constitutes the basis of its neurotoxic potential according to Qureshi et al [7].
74 Although AFB1 is the most toxic aflatoxin, aflatoxin B2, G1 and G2 can also exert effects
75 on the central nervous system (CNS) because of their similar structures and detoxifying
76 metabolic pathways to AFB1.

77 On the other hand, the high binding capacity of OTA to the serum albumin protein
78 increases its average lifetime in the blood system compared to the mycotoxins (Babayan
79 et al., 2020). This fact, together with its ability to cross the BBB (mediated by the ease of
80 OTA interaction with cell membrane proteins), and its tendency to be accumulated in
81 brain regions strongly affected by AD such as the hippocampus [5], brain cortex,
82 cerebellum, Varolium bridge, striated body and ventral midbrain [10], explain the
83 neurotoxic potential of OTA.

84 At the molecular level, OTA neurotoxicity is linked with the production of reactive
85 oxygen species (ROS), protein synthesis alteration, mitochondrial disruption,
86 genotoxicity (group 2B carcinogenic by IARC), and cellular apoptosis via the caspases
87 3-9 activation [11]. Moreover, OTA can stimulate the synthesis of amyloid β peptides (A β
88 peptides), strongly implicated in AD according with Doi and Uetsuka [12] and Zhang
89 [13].

90 STG neurotoxicity has been less studied, although it is highly involved in the
91 mitochondrial dysfunction of neural cells, a key factor in the development of
92 neurodegenerative diseases such as AD or PD [14]. Furthermore, Takashima et al [15]
93 confirmed the implication of STG on neurogenesis and synaptic plasticity suppression.
94 Moreover, STG is a fungal metabolic precursor of AFB1, maintaining common effects
95 with this neurotoxic aflatoxin, as ROS generation or genotoxicity (group 2B carcinogenic
96 by IARC), according to Gao et al [16].

97 Considering the above mentioned, numerous studies have been performed to elucidate
98 the mechanisms involved in the neurotoxicity of mycotoxins, but there are no studies to
99 test the interactions established between mycotoxins and A β peptides.

100 These A β peptides include several types of amyloid fragments of 36-43 amino acids,
101 generated from the cleavage of the amyloid precursor protein (APP) that is mainly

102 expressed in nervous tissues. The final A β peptides are produced after different post-
103 transcriptional and post-translational modifications of APP, mediated by proteases that
104 cut and fold the final A β peptides [17]. Among them, A β_{1-40} fragment is the most frequent
105 (almost 90% of the total A β s), while A β_{1-42} fragment is considered the most toxic due to
106 its greater susceptibility to aggregation, caused by the overproduction of peptide or due
107 to failures in its cellular elimination. The aggregation of A β peptides causes a dysfunction
108 of neural tissues at different levels, being considered as one of the main molecular causes
109 of AD (according with the amyloid cascade hypothesis), and, to a lesser extent, of PD,
110 amyotrophic lateral sclerosis, Creutzfeldt-Jakob or Huntington diseases [18].

111 Currently, AD is a neurodegenerative disease with no cure, and the main treatments
112 applied using synthetic drugs only ameliorate the symptoms and produce important
113 secondary effects. However, in recent years there has been a growing interest in the search
114 for natural substances that exert neuroprotective effects [19]. One example is curcumin
115 (diferuloylmethane), a polyphenolic compound obtained from the roots of the *Curcuma*
116 *longa* plant (turmeric), which is widely used as a food additive. This compound is really
117 promising as a neuroprotective alternative for AD due to its antioxidant, anti-
118 inflammatory, anticancer and immunomodulating properties, and its confirmed potential
119 to inhibit the A β_{1-40} and A β_{1-42} peptides aggregation at *in vivo* and *in vitro* levels [20].

120 Another natural compound with high neuroprotective capacity is caffeine (1,3,7-
121 trimethylxanthine), an alkaloid from coffee beans with a short-term neuro-stimulant effect
122 over the CNS, mediated by its interaction with adenosine receptors from the nervous
123 tissue, and, to a lesser extent, from vascular endothelium, heart, liver, muscle and adipose
124 tissues [21]. Different studies developed from *in vivo* and *in vitro* approaches
125 demonstrated the neuroprotective capacity of caffeine, according to Yelanchezian et al
126 [22].

127 In addition to the last mentioned, some other studies have demonstrated the high potential
128 of curcumin and caffeine to reverse the toxicity of some of the most hazardous
129 mycotoxins such as AFB1, according to Dai et al [23] and Ferik et al [24].

130 Considering the neurotoxic effects of aflatoxins, OTA or STG, the implication of A β
131 peptides in the progression of AD, and the urgent need for studies that link both factors,
132 in this work the direct interaction of these mycotoxins with the *in vitro* aggregation of the
133 A β_{1-42} peptide and their SH-SY5Y cell cytotoxicity has been tested. Complementarily, the

134 anti-aggregative and the neuroprotective capacities of curcumin and caffeine alone or co-
135 administrated with each mycotoxin has also been evaluated.

136 To achieve these objectives, different analytical techniques were applied: Transmission
137 electronic microscopy (TEM) to test the degree of folding or unfolding of the A β ₁₋₄₂
138 peptide induced by mycotoxins and applied neuroprotective substances; high
139 performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-
140 MS/MS) to quantify the possible interactions between mycotoxins and the A β ₁₋₄₂ peptide;
141 and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay to
142 evaluate the cytotoxicity of each mycotoxin alone and in combination with the
143 neuroprotective compounds selected.

144 **2. Materials and Methods**

145 *2.1. Reagents and standards*

146 Analytical grade solvents and reagents were employed and deionized water was obtained
147 from a Milli-Q water purification system unit (Millipore, Bedford, MA, USA). ACN,
148 MeOH and DMSO solvents were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain), and solid
149 Fe₂SO₄·7 H₂O (Panreac) was dissolved in 5% (v/v) of concentrated H₂SO₄ (Scharlab)
150 leading to a stock solution of 200 μ M.

151 Mycotoxins were acquired from Sigma Aldrich (St. Luis, Missouri, USA):

152 (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19-trioxapentacyclo[10.7.0.0²,9.0³,7.0¹³,17]-nonadeca-
153 1,4,9,11,13(17)-pentaene-16,18-dione (Aflatoxin B1, \geq 97.0%, CAS: 1162-65-8);

154 (3S,7R)-11-methoxy-6,8,19- trioxapentacyclo[10.7.0.0²,9.0³,7.0¹³,17]nonadeca-
155 1,9,11,13(17)-tetraene-16,18-dione (Aflatoxin B2, \geq 98%, CAS: 7220-81-7);

156 11-methoxy-6,8,16,20-tetraoxapentacyclo-[10.8.0.0²,9.0³,7.0¹³,18]icosa-
157 1,4,9,11,13(18)-pentaene-17,19-dione (Aflatoxin G1, \geq 98 %; CAS: 1402-68-2);

158 (3S,7R)-11-methoxy- 6,8,16,20-tetraoxapentacyclo[10.8.0.0²,9.0³,7.0¹³,18]icosa-
159 1,9,11,13 (18)-tetraene-17,19-dione (Aflatoxin G2, \geq 98%, CAS: 7241-98-7);

160 (2S)-2-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydroisochromene-7-
161 carbonyl]amino]-3-phenylpropanoic acid (Ochratoxin A, \geq 98%, CAS: 303-47-9);

162 (3S,7R)-15-hydroxy-11-methoxy-6,8,20-
163 trioxapentacyclo[10.8.0.02,9.03,7.014,19]icosa-1,4,9,11,14,16,18-heptaen-13-one
164 (Sterigmatocystin, $\geq 98\%$, CAS: 10048-13-2).

165 Stock solutions of mycotoxins were prepared by dilution of each solid mycotoxin in ACN
166 at a final concentration of 100 mg/L (3 μ M). These solutions were maintained at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
167 in darkness.

168 Curcumin and caffeine were purchased from Sigma Aldrich (St. Luis, Missouri, USA):
169 (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione (Curcumin, \geq
170 65%, CAS: 458-37-7); and 1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione (Caffeine, $\geq 99\%$, CAS: 58-
171 08-2).

172 Stock solution of curcumin was prepared before each essay by solving solid curcumin in
173 DMSO at 10000 mg/L (27 mM).

174 Stock solution of caffeine was prepared by solving solid caffeine in MeOH at 1000 mg/L
175 (5 mM), and this solution was maintained at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in darkness until be used.

176 Amyloid β protein fragment 1-42 ($\text{A}\beta_{1-42}$, $\geq 95\%$, CAS: 107761-42-2) for incubation
177 essays was acquired from Sigma Aldrich (A9810, St. Luis, Missouri, USA) was pretreated
178 with 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) from Sigma Aldrich and maintained at -
179 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in darkness until use. Before each use, stock solutions of 200 μ M (DMSO 4% v/v,
180 HCl 10 mM) were prepared from the solid standard by dissolution with DMSO firstly,
181 and HCl (Scharlab).

182 2.2. Culture conditions of SH-SY5Y cells

183 The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was purchased from the ATCC and cells
184 were stored in 90% fetal bovine serum (FBS) (ThermoFisher Scientific, Massachusetts,
185 USA) and 10% DMSO (Sigma Aldrich) at $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ in liquid nitrogen vapor until use. For
186 routine cell culture, cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient
187 Mixture F12 (DMEM/F12) previously supplemented with 10% FBS and 1% Penicillium
188 / Streptomycin (ThermoFisher Scientific), considered as complete culture media, and
189 incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 . For subculture maintenance, cells were washed with
190 phosphate-buffered saline at pH 7.4 (PBS) and detached with trypsin-EDTA 0.05%
191 (ThermoFisher Scientific) for 5 min ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5% CO_2) to reduce cell population regularly

192 in accordance with its growth rate. Mycoplasma infection in cell line was discarded by
193 using the Look Out Mycoplasma PCR Detection Kit (Sigma Aldrich).

194 2.3. *Mycotoxins stability assays under acidic conditions*

195 The amyloid β protein incubation assays imply the exposure of mycotoxins to HCl 10
196 mM (pH 2.2) solution for 48 h. Considering that the stability of aflatoxins B1, B2, G1,
197 G2, OTA and STG could be compromised at such low pH values [25], the stability of
198 mycotoxins under these conditions was previously tested. For this purpose, individual
199 stock solutions at 1 mg/L (3 μ M), were evaporated and resuspended in water at pH 7 and
200 water acidified with HCl 10 mM (pH 2.2) and subsequently incubated at 37 °C for 48 h
201 in darkness with a ThermoMixer (Eppendorf, Germany). The optimal wavelength of each
202 mycotoxin was experimentally optimized at 363 nm for AFB1 and AFB2, 354 nm for
203 AFG1, 369 nm for AFG2, 377 nm for OTA and 290 nm for STG. Absorbance at this
204 wavelength was then measured for each mycotoxin at 0 h and 48 h for both pH conditions.
205 The stability of mycotoxins was checked by comparing the absorbance values obtained
206 for both solutions (neutral vs acidic) and both incubation times (0 h vs 48 h).

207 2.4. *A β ₁₋₄₂ peptide incubation assays analyzed by TEM.*

208 This protocol is based on the previous method optimized by Vicente-Zurdo et al [26].
209 Previous to incubation, the A β ₁₋₄₂ peptide was pretreated as follows: 1 mg of the
210 commercial solid A β ₁₋₄₂ was thawed, equilibrated during 30 min at room temperature (to
211 avoid condensation of the peptide), and treated with 222 μ L of pure HFIP to disrupt beta-
212 sheet linkages between fragments and improve the prevalence of free monomeric A β ₁₋₄₂
213 form, according to Vicente-Zurdo et al [26]. Then, the 1 mM peptide solution was
214 vortexed, aliquots of 10 μ L were taken apart and evaporated at dryness at 45 °C for 30
215 min in a SpeedVac Concentrator Plus (Eppendorf), and the final pretreated aliquots were
216 maintained at -20 °C until use.

217 For protein incubation, pretreated A β ₁₋₄₂ monomers were thawed, equilibrated at room
218 temperature for 30 min, resuspended with 2 μ L of DMSO, sonicated for 10 min, and
219 diluted with 10 mM HCl aqueous solution to a final concentration of 200 μ M (DMSO
220 4% v/v).

221 For aggregation assays, individual working solutions for selected mycotoxins (AFB1,
222 AFB2, AFG1, AFG2, OTA and STG) were prepared at 4 mg/L (12 μ M) by diluting each

223 stock solution with ultrapure water (acidified with HCl 10 mM); curcumin working
224 solution was prepared at 8.8 mg/L (24 μ M) by diluting the stock solution with HCl 10
225 mM; caffeine working solution was prepared at 4.7 mg/L (24 μ M) by evaporation and
226 resuspension of the stock solution with 10 mM HCl. Final solutions of 1) A β ₁₋₄₂ (50 μ M);
227 2) A β ₁₋₄₂ + Fe²⁺ (50 μ M + 50 μ M); 3) A β ₁₋₄₂ + Curcumin (50 μ M + 6 μ M); 4) A β ₁₋₄₂ +
228 Caffeine (50 μ M + 6 μ M); 5) A β ₁₋₄₂ + Mycotoxin (50 μ M + 3 μ M); 6) A β ₁₋₄₂ + Mycotoxin
229 + Curcumin (50 μ M + 3 μ M + 6 μ M); and 7) A β ₁₋₄₂ + Mycotoxin + Caffeine (50 μ M + 3
230 μ M + 6 μ M), were prepared by adding working solutions and diluting with 10 mM HCl.

231 Solution 1 was prepared as a control to test that A β ₁₋₄₂ monomers are disaggregated under
232 basal conditions, whereas solution 2 containing Fe²⁺ was prepared as a positive control
233 for A β ₁₋₄₂ aggregation, as Vicente-Zurdo et al [26] reported that Fe²⁺ is able to produce
234 A β ₁₋₄₂ monomers aggregation; solutions 3 and 4 were prepared to discard any possible
235 aggregation capacity derived from the curcumin and the caffeine exposure; type 5
236 solutions were done to test the aggregation capacity of aflatoxins B1, B2, G1, G2, OTA
237 and STG over the A β ₁₋₄₂ monomers; and type 6 and 7 solutions were developed only for
238 those mycotoxins whose aggregation capacity had been previously confirmed (AFB1,
239 AFG1, OTA and STG), in co-exposure with curcumin and caffeine to test the possible
240 anti-aggregative capacity of both neuroprotective agents.

241 All the solutions were incubated at 37 °C for 48 h in darkness in an orbital shaker MaxQ™
242 4000 (Thermo Scientific™, Madrid, Spain), then 10 μ L of each sample was placed on a
243 carbon-coat copper grid, incubated for 5 min, stained with 10 μ L uranyl acetate 2% (w/v),
244 and maintained for another 5 min (to stain A β ₁₋₄₂ negatively). After drying the excess
245 staining solution, the grids with the samples were transferred to a glass slide for analysis
246 by TEM and magnified images at X1000, X6000 and X12000 were taken.

247 The images obtained for A β ₁₋₄₂ alone, combined with Fe²⁺, combined with each
248 mycotoxin, and combined with each mycotoxin in the presence of curcumin or caffeine
249 were compared to observe the differences between the applied conditions over the A β ₁₋₄₂
250 aggregation effect. Fibrils width obtained after each treatment were measured using
251 ImageJ program (n = 100).

252 *2.5. A β ₁₋₄₂ peptide incubation assays analyzed by HPLC-MS/MS.*

253 Once the aggregation capacity of some mycotoxins was confirmed by TEM, the
254 interactions established between A β ₁₋₄₂ and the aggregative mycotoxins (AFB1, AFG1,

255 OTA and STG) were indirectly quantified. For this assay, the working solutions of each
256 mycotoxin and A β ₁₋₄₂ peptide from Section 2.4 were diluted 1:10 with 10 mM HCl
257 because the final mycotoxin concentrations for TEM (3 μ M) could cause the saturation
258 of the MS/MS detector, but proportions between A β ₁₋₄₂:Mycotoxin were maintained. The
259 following final solutions were prepared: 1) Individual AFB1, AFG1, OTA and STG
260 solutions (0.3 μ M); 2) A β ₁₋₄₂ (5 μ M); 3) A β ₁₋₄₂ + Mycotoxin (5 μ M + 0.3 μ M).

261 Type 1 solutions were prepared to quantify each free mycotoxin in absence of the peptide,
262 type 3 solutions were used to quantify mycotoxins after their incubation with A β ₁₋₄₂
263 peptide (losses of mycotoxin are attributed to their interactions with the peptide), and type
264 2 solution was prepared to check interferences in MS/MS mycotoxin analysis due to the
265 ionization of the A β ₁₋₄₂ peptide. Type 3 solutions were prepared by triplicate.

266 All the samples were incubated at 37 °C in darkness for 48 h, and then centrifugated at
267 14,000 rpm for 15 min to promote the precipitation of the A β ₁₋₄₂ at free form and linked
268 with mycotoxins. In this way, the peptide residues would not interfere with the analysis
269 of free mycotoxins (maintained in the supernatant). The supernatant was collected for
270 mycotoxin analysis by HPLC-MS/MS.

271 A β ₁₋₄₂-mycotoxin interaction was estimated indirectly by quantifying each free
272 mycotoxin after the incubation for 48 h with the A β ₁₋₄₂, compared to the mycotoxin
273 samples incubated for 48 h without the A β ₁₋₄₂ peptide. The final interaction percentage
274 was established as follows (1):

$$275 \quad \% \text{ Interaction} = 100\% - \left[\left(\frac{|\text{Mycotox Area with A}\beta \text{ Peptide}|}{|\text{Mycotox Area without A}\beta \text{ Peptide}|} \right) \times 100 \right] \quad (1)$$

276 Moreover, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated using
277 the signal-to-noise method, considering the mycotoxin concentration of the sample
278 without exposure to the A β ₁₋₄₂ peptide and signal-to-noise (S/N) ratios of 3 and 10,
279 respectively.

280 2.6. MTT assays

281 The neurotoxicity of AFB1, AFG1, OTA, STG, and the neuroprotective capacity of
282 curcumin and caffeine against these mycotoxins were tested via the 3-(4,5-
283 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method, which
284 determines the cell viability of SH-SY5Y cell line after exposure to these substances by
285 comparing it with a positive control of cells without treatment.

286 For these assays, confluent cultures of SH-SY5Y cells previously detached and
287 homogenized were seeded on 96-well plates (Corning™, NY, USA) at an initial density
288 of 24,000 cells per well (0.64 cm diameter), except in the negative control wells that only
289 contained complete culture media. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h
290 to promote cell attachment, then the media was removed and replaced with fresh culture
291 media enriched with each mycotoxin at different concentration levels (five replicates for
292 each concentration). Cells were incubated again for 48 h. 20 µL of a 5 mg/mL MTT
293 solution (Merck, Darmstadt, Germany) previously prepared in PBS and filtered with
294 PVDF (Merck) in darkness, was applied to the media of each well and the plate was
295 incubated at 37 °C for 4 h in darkness (to facilitate the synthesis of solid formazan in alive
296 cells). Finally, the culture media was removed, and precipitate of formazan was
297 resuspended with DMSO (Scharlab) and maintained for 15 min at room temperature. The
298 absorbance of formazan was measured at 550 nm. Positive and negative cytotoxicity
299 controls were also included. The viability percentages were calculated according to the
300 equation (2):

$$301 \quad \% \text{ Cell Viability} = \frac{(A_S - |A_{C-}|)}{(|A_{C+}| - |A_{C-}|)} \times 100 \quad (2)$$

302 In equation (2), |A_{C+}| refers to the mean absorbance of the replicates of the positive
303 viability controls, and |A_{C-}| refers to the mean absorbance of the replicates of the negative
304 viability controls. The calculations were applied to the absorbance of all replicates of the
305 cells treated with each mycotoxin (A_S) and then the mean and standard deviation were
306 calculated from the % viability for each concentration applied.

307 First, this assay was applied to AFB1, AFG1, OTA and STG alone to establish the lethal
308 concentration 50 (LC₅₀) for each mycotoxin. The concentrations selected for the viability
309 study were: 0.3, 0.8, 1.5 and 3 µM. The selected low range of mycotoxins concentrations
310 is based on a realistic *in vivo* exposure (higher levels could cause anaphylactic shock and
311 probably death before reaching CNS) [2]. Stock solutions were evaporated and
312 resuspended with complete culture media at the final applied concentrations.

313 The LC₅₀ for each compound was calculated by interpolating the viability percentages
314 obtained in a linear regression curve for AFG1 and OTA (3) or a logarithmic regression
315 curve for AFB1 and STG (4):

$$316 \quad y = ax + b \quad (3)$$

317
$$y = a \ln(x) + b \quad (4)$$

318 where y is the viability percentage, a is the slope, x is the concentration applied and b the
319 intercept at the origin.

320 Secondly, curcumin and caffeine were tested alone to establish a wide safe range of
321 concentrations for cell viability. For curcumin, the range tested included the following
322 concentrations: 0.03, 0.15, 0.3, 1.5, 3, 7 and 14 μM . Higher levels were not tested because
323 of the aqueous solubility limitations of this compound. The exposure solutions were
324 prepared from the stock solution previously diluted in the complete culture media (the
325 final DMSO content was below 0.05%, considered harmless). For caffeine, the following
326 concentrations were selected: 0.5, 1.5, 3, 5, 13, 26, 52, 103 μM , a much larger range than
327 that of curcumin considering higher caffeine intake, its high polar character and its facility
328 cross the BBB. The caffeine stock solution was evaporated and resuspended with
329 complete culture media to get the tested concentrations.

330 Finally, a single concentration of each mycotoxin close to the LC_{50} (3 μM for AFB1 and
331 AFG1, 2 μM for OTA and 0.8 μM for STG) was applied to the cells in co-administration
332 with two safe levels of curcumin (0.3 and 3 μM) or caffeine (5 y 26 μM), to test the
333 possible neuroprotective effect of these compounds against sub-lethal mycotoxin
334 concentrations. The final effect of the curcumin and the caffeine against each mycotoxin
335 was expressed as the increase (+) or decrease (-) of the cell viability compared to the basal
336 viability obtained from single mycotoxin exposure experiments (according to equation
337 5).

338
$$\% \text{Cell Viability (Mycotox + NA *)} - \% \text{Cell Viability (Mycotox)}$$

339
$$= \pm \% \text{Cell Viability (NA *)} \quad (5)$$

340 *NA: Neuroprotector Agent (Curcumin or Caffeine)

341 2.7. Instrumentation

342 To visualize the aggregative and anti-aggregative capacity of the analytes over the $\text{A}\beta_{1-42}$
343 peptide in Section 2.4, a JEOL JEM-1400 Plus transmission electronic microscope at 10
344 kV was employed.

345 To quantify the interactions established between $\text{A}\beta_{1-42}$ and mycotoxins in Section 2.5,
346 HPLC-QqQ/MS was employed. An Agilent 1200 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
347 equipped with a binary pump (G1312A), a coupled degasser (G1329A), an automatic

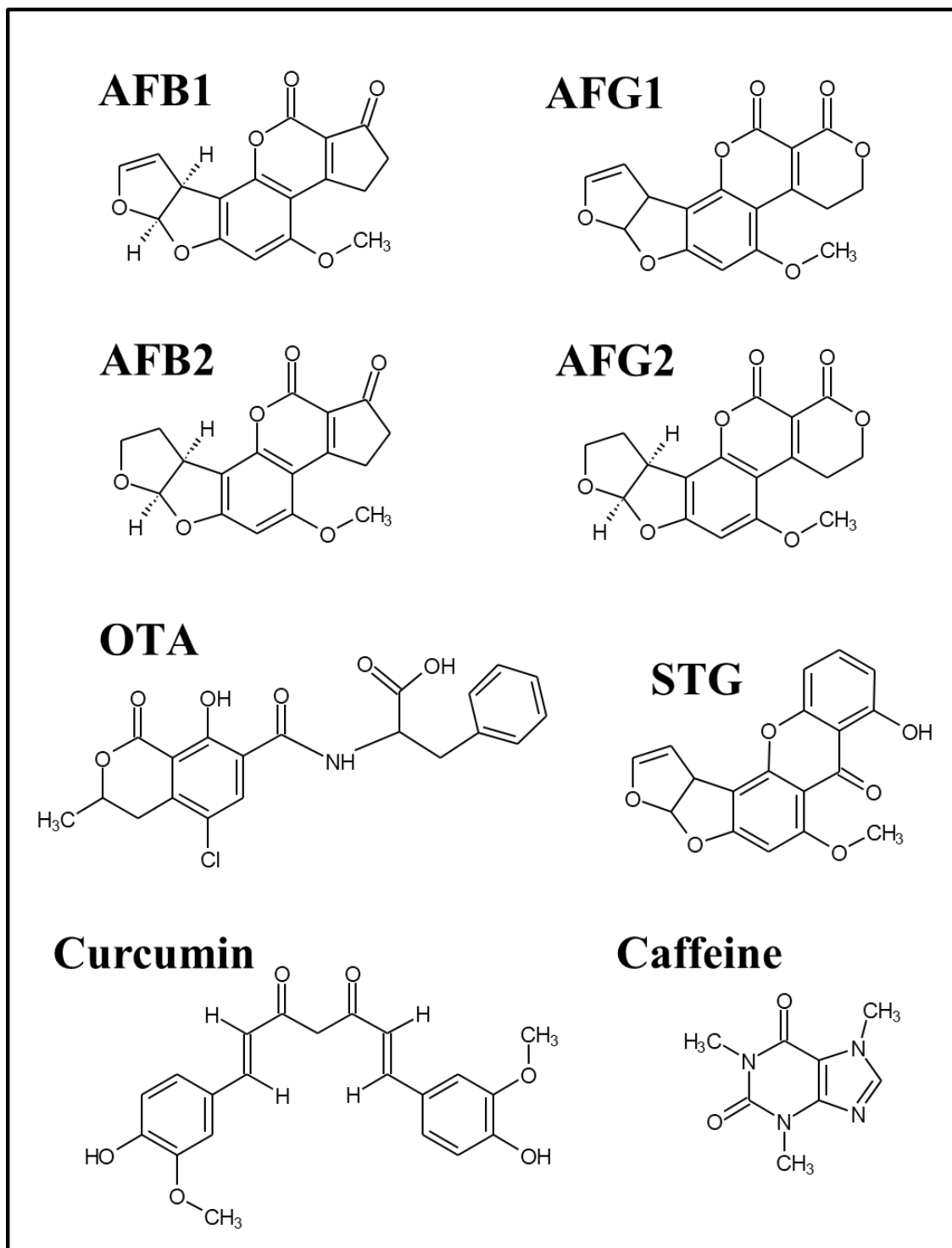
348 thermostatic injector (G1329A), a thermostatic column module (G1316A), and a
349 Sinergy™ Fusion Reverse Phase C18 column (150 mm × 3 mm, ID 4 μm, pore size 80
350 Å) acquired from Phenomenex, Torrance, CA, USA) were used for the chromatographical
351 separation. The flow rate was maintained at 0.5 mL/min and the injection volume was 5
352 μL. The column was maintained at 40 °C and the mobile phase consisted of ultrapure water
353 (eluent A) and ACN (eluent B), both 0.1% HCOOH. The percentage of eluent B changed as
354 follows: 0 min - 30%; 7 min - 60%; 8 min - 100%; 12 min - 100%; 13 min - 30%; 17 min
355 - 30%. A triple quadrupole spectrometer (LCMS-G6410B, Agilent, Santa Clara, CA,
356 USA) equipped with an electrospray source ionization (ESI) at atmospheric pressure was
357 used for the determination of the mycotoxins. Positive electrospray ionization (ESI)
358 through Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode was applied, with ESI capillary
359 voltage at 4000 V, fragmentor voltage at 152 V, nebulizer at 55 psi, drying gas with flow
360 rate of 12 L/min at 300 °C, dwell time at 100 ms, and chamber current at 0.16 μA. For all
361 the compounds, the two most abundant precursor/product ion transitions were selected.
362 Selected transitions, collision energies (CE) and retention times for each mycotoxin
363 analyzed are detailed on **Table S1** from the Supplementary Material.

364 Acquisition data was developed with Agilent MassHunter Workstation Software (Agilent
365 Technologies, Waldbronn, Germany).

366 Finally, the absorbance of AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, STG and formazan
367 (Sections 2.3 and 2.6) was measured with a UV-visible Multiskan SkyHigh Microplate
368 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) equipped with a microplate reader and a
369 quartz cuvette, with a measurement range from 200 nm to 1000 nm.

370 **3. Results and Discussion.**

371 In this work, a double approach has been developed to evaluate different neurological
372 toxic effects caused by several mycotoxins (aflatoxins B1, B2, G1 and G2, OTA, STG)
373 alone or combined with two agents with neuroprotective potential (curcumin and
374 caffeine). For this purpose, the *in vitro* aggregation effect of mycotoxins on the Aβ₁₋₄₂
375 peptide and the effect of mycotoxins on the cytotoxicity of SH-SY5Y cells were
376 evaluated. Moreover, the capability of each neuroprotective agent to reverse the
377 mycotoxin-induced effects was tested. The molecular structures of all mycotoxins and
378 both neuroprotective agents are illustrated in **Figure 1**.



379

380 **Figure 1.** Molecular structures for the mycotoxins investigated in this study: Aflatoxin
 381 B1 (AFB1), aflatoxin G1 (AFG1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G2 (AFG2), ochratoxin
 382 A (OTA) and sterigmatocystin (STG); and for the neuroprotective agents: Curcumin and
 383 caffeine.

384 *3.1. Mycotoxins stability under acidic incubation conditions with Aβ₁₋₄₂ peptide.*

385 According to Wei Cr and Lee [27], Ding et al [28], and Septien et al [29], low polarity of
386 aflatoxins, OTA, and STG makes them structurally unstable under some acidic
387 conditions. Considering this limiting factor, the specific conditions to test the aggregation
388 potential of these mycotoxins with respect to the A β ₁₋₄₂ peptide (acidic aqueous media at
389 pH 2.2 and 37 °C for 48 h). poses a risk to the chemical stability of these compounds.

390 As a result of this, a previous assay was performed to check the stability of the mycotoxins
391 under the experimental incubation conditions of the A β ₁₋₄₂ peptide. For this purpose, 3
392 μ M aqueous solutions of mycotoxins at pH 7 and pH 2.2, and the absorbance of each
393 individual mycotoxin was measured at t = 0 and 48 h after their preparation (the
394 incubation temperature was set at 37 °C). Finally, none of the mycotoxins experimented
395 with a decrease in the absorbance values after applying 48 h of incubation to the initial
396 absorbance, neither under acidic nor neutral pH conditions. So, stability of the
397 mycotoxins under the tested conditions in both acidic (pH 2.2) and neutral (pH 7) aqueous
398 media for at least 48 h at 37 °C is confirmed.

399 On the other hand, the stability of curcumin and caffeine at similar pH conditions had
400 been reported in the literature. In the case of curcumin, despite its poor solubility and its
401 frequent instability in aqueous solvents, its structural integrity was experimentally
402 demonstrated until 40 μ M at pH 2-3 and 37 °C [30]. Regarding caffeine, this molecule
403 has a high solubility in water and it is able to maintain its chemical stability even at highly
404 acidic conditions [31].

405 *3.2. A β ₁₋₄₂ peptide exposure to mycotoxins alone and combined with the curcumin and the* 406 *caffeine analyzed by TEM*

407 The experimental conditions applied to test the aggregative effect of mycotoxins (alone
408 and combined with curcumin and caffeine) over the A β ₁₋₄₂ peptide were previously
409 optimized by Vicente-Zurdo et al [26]. These authors demonstrated that the A β ₁₋₄₂ peptide
410 aggregation is highly dependent on the treatment conditions applied and they optimized
411 the suitable experimental conditions to keep the peptide monomers separated (considered
412 as the negative aggregation control). They also confirmed the aggregative effect of some
413 metals as Fe over the A β ₁₋₄₂ peptide, which has been used as a positive aggregation control
414 in this study.

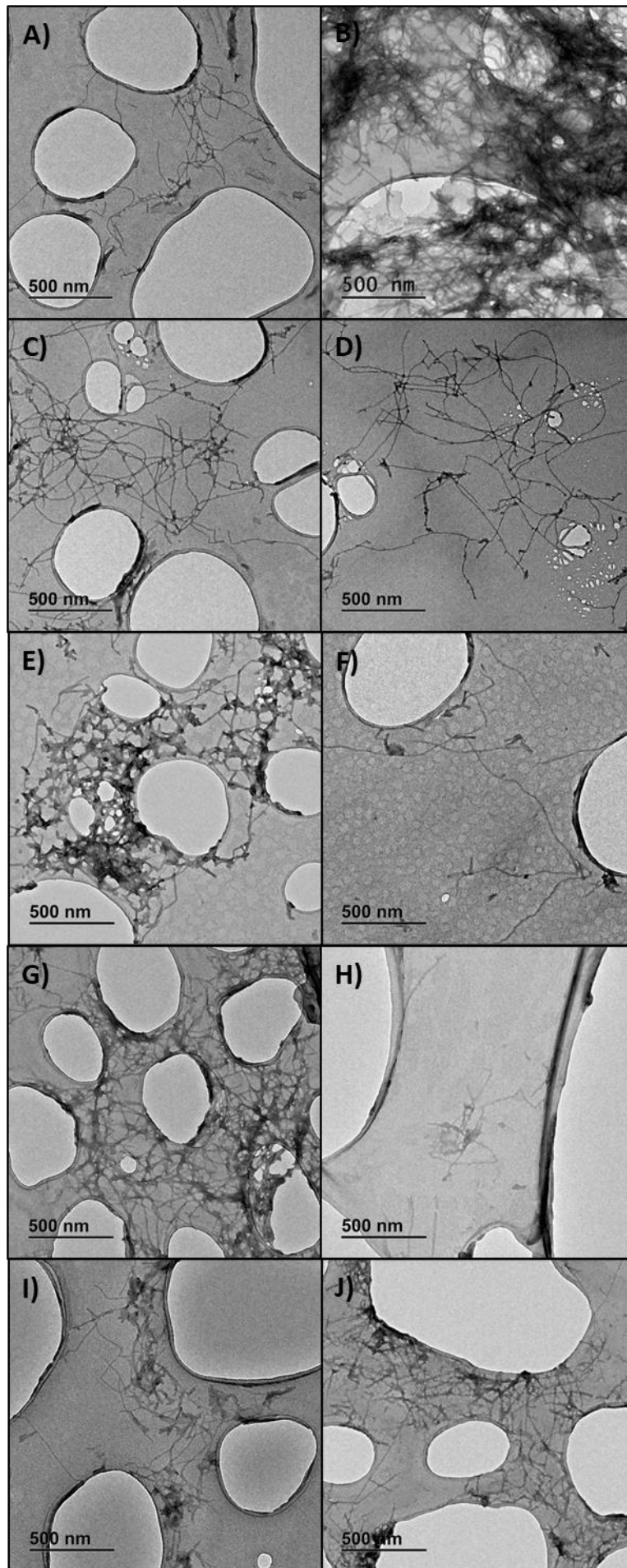
415 It should be noted that TEM is a visual qualitative analysis technique, so the results
416 obtained are subject to interpretation and may differ between the sample sections focused

417 along the analysis [32]. To overcome this problem, different sections from each sample
418 have been targeted to obtain a set of images as much representative as possible of the
419 effect of each substance over the aggregation of the A β ₁₋₄₂ peptide. Therefore, for each
420 type of sample, the most representative image of each observed trend has been selected.

421 Additionally, the average width of the amyloid fibrils from each condition have been
422 measured to confirm if the aggregation and disaggregation effects observed in the TEM
423 micrographs are consistent with a quantitative increase of the fibril width compared to
424 the untreated A β ₁₋₄₂ peptide [33].

425 All mycotoxins (aflatoxins B and G, OTA and STG) and both neuroprotective agents
426 (curcumin and caffeine) have been tested at low exposure concentrations (3 μ M for each
427 mycotoxin, 6 μ M for the curcumin and the caffeine) compared to the A β ₁₋₄₂ peptide (50
428 μ M), considering the low levels of neuro-exposure to these substances. The A β ₁₋₄₂ peptide
429 has been incubated with the mycotoxins alone and combined with each neuroprotective
430 agent at 37 °C for 48 h in darkness with the specific conditions described on Section 2.4
431 from Materials and Methods.

432 First, the individual effect of curcumin, caffeine and each type of mycotoxin over the A β ₁₋₄₂
433 peptide was tested and compared with the untreated peptide (negative aggregation
434 control with a fibril width of (8.2 ± 0.7) nm) and with the peptide exposed to Fe₂SO₄
435 (positive aggregation control with a fibril width of (10.2 ± 0.5) nm). TEM micrographs
436 for the fibrils incubated with each substance alone are shown in **Figure 2**.

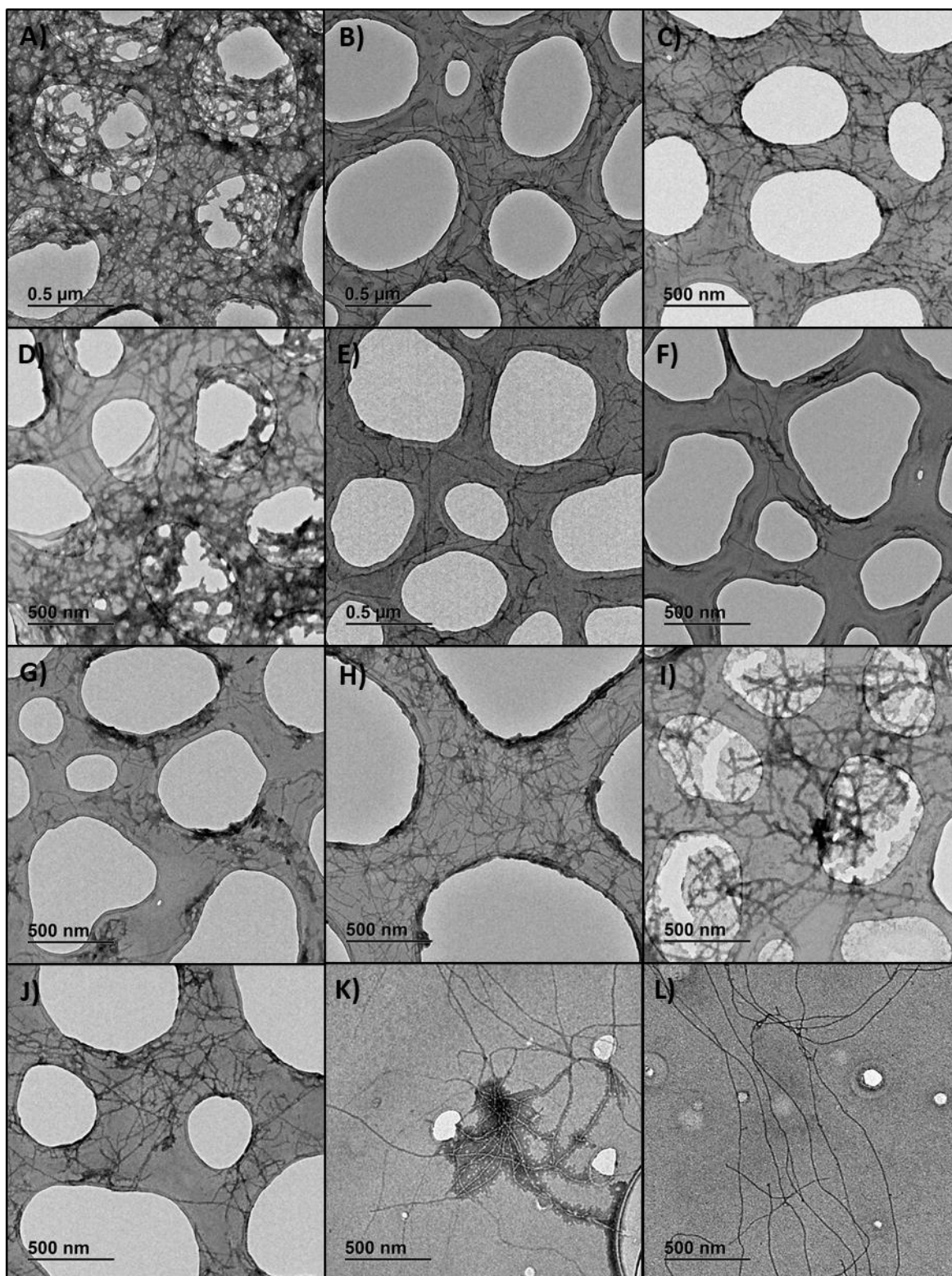


437 **Figure 2.** TEM images of A β ₁₋₄₂ peptide exposed to different substances at 37 °C for 48
438 h in 10 mM HCl medium. A β ₁₋₄₂ and Fe were applied at 50 μ M, mycotoxins at 3 μ M,
439 curcumin and caffeine at 6 μ M. A) Untreated A β ₁₋₄₂. B) A β ₁₋₄₂ + Fe (II). C) A β ₁₋₄₂ +
440 Curcumin. D) A β ₁₋₄₂ + Caffeine. E) A β ₁₋₄₂ + AFB1. F) A β ₁₋₄₂ + AFB2. G) A β ₁₋₄₂ + AFG1.
441 H) A β ₁₋₄₂ + AFG2. I) A β ₁₋₄₂ + OTA. J) A β ₁₋₄₂ + STG.

442 No aggregation effects are observed for the original A β ₁₋₄₂ peptide (micrograph of **Figure**
443 **2.A**) in the presence of curcumin and caffeine (**Figure 2.C and 2.D**), with fibril widths
444 of (8.4 \pm 0.5) nm and (8.2 \pm 0.4) nm after the exposure to the both neuroprotective agents,
445 respectively, whereas the exposure with Fe₂SO₄ has caused an important aggregation
446 effect (**Figure 2.B**), with fibril widths of (10 \pm 0.5) nm.

447 The individual mycotoxins show a different aggregation behavior of the A β ₁₋₄₂ peptide.
448 Meanwhile AFB2 and AFG2 have not produced any aggregation effect (**Figure 2.F and**
449 **2.H**) with fibril widths of (8.6 \pm 0.8) nm and (9 \pm 1) nm, the rest of the mycotoxins tested
450 induced a remarkable increase of the fibril aggregation. Although any of these mycotoxins
451 have aggregated the A β ₁₋₄₂ peptide to the same extent as Fe (**Figure 2.B**), AFB1 and
452 AFG1 have caused a relevant aggregation, even favoring the formation of a compact net
453 from the aggregated fibrils able to partially cover some holes of the copper grid where
454 the sample is supported (**Figure 2.E and 2.G**). Moreover, the fibril width values have
455 been increased up to (15 \pm 1) nm and (14 \pm 1) nm after exposure to AFB1 and AFG1,
456 much higher than the obtained in the positive aggregation control with Fe (10 \pm 0.5) nm.
457 OTA and STG have also generated aggregation over the A β ₁₋₄₂ peptide as it can be
458 observed in the micrographs of **Figure 2.I and 2.J**, but to a lesser extent than AFB1 and
459 AFG1. Although both mycotoxins provoke similar aggregation at qualitative level, the
460 width of the fibrils of the A β ₁₋₄₂ peptide exposed to STG is higher than the OTA exposure
461 ((13.9 \pm 0.9) nm and (11.5 \pm 0.8) nm).

462 So, the aggregative mycotoxins, and therefore the most neurotoxic ones were selected
463 (AFB1, AFG1, OTA and STG) and co-administrated with curcumin and caffeine to test
464 the anti-aggregative capacity of both neuroprotective agents against these mycotoxins
465 over the A β ₁₋₄₂ peptide. AFG2 was finally discarded as a potential aggregation agent
466 considering the low aggregation effect observed in the micrographs compared to the
467 positive aggregative control with Fe. The micrographies obtained after the co-exposure
468 to each mycotoxin with curcumin and caffeine are shown in **Figure 3**.



469 **Figure 3.** TEM images comparing the effect of curcumin and caffeine in co-exposure
 470 with the aggregative AFB1, AFG1, OTA and STG over the Aβ₁₋₄₂ amyloid peptide for 48
 471 h in 10 mM HCl medium at 37 °C. Aβ₁₋₄₂ was applied at 50 μM, mycotoxins at 3 μM,
 472 curcumin and caffeine at 6 μM. A) Aβ₁₋₄₂ + AFB1. B) Aβ₁₋₄₂ + AFB1 + Curcumin. C) Aβ₁₋₄₂ +
 473 Aβ₁₋₄₂ + AFB1 + Caffeine. D) Aβ₁₋₄₂ + AFG1. E) Aβ₁₋₄₂ + AFG1 + Curcumin. F) Aβ₁₋₄₂ +

474 AFG1 + Caffeine. G) A β ₁₋₄₂ + OTA. H) A β ₁₋₄₂ + OTA + Curcumin. I) A β ₁₋₄₂ + OTA +
475 Caffeine. J) A β ₁₋₄₂ + STG. K) A β ₁₋₄₂ + STG + Curcumin. L) A β ₁₋₄₂ + STG + Caffeine.

476 Both neuroprotective agents markedly inhibit the aggregation caused by AFB1, AFG1
477 and STG. For AFB1, the TEM micrographs confirm the inhibitory effect of curcumin
478 (**Figure 3.B**) and caffeine (**Figure 3.C**) against the initial AFB1-induced A β ₁₋₄₂
479 aggregation (**Figure 3.A**), although the peptide is not completely disaggregated.
480 However, the initial AFB1-induced A β ₁₋₄₂ aggregation is reduced even in zones with high
481 density of fibril accumulation, and the width of the fibrils decreases to (12.0 \pm 0.7) nm
482 (AFB1+curcumin) and (11.0 \pm 0.7) nm (AFB1+caffeine). The initial AFG1-induced
483 aggregation over the A β ₁₋₄₂ peptide (**Figure 3.D**) is also partially suppressed by curcumin
484 and caffeine, according to the TEM micrographs of **Figure 3.E and 3.F**, with a reduction
485 of the fibril width up to (10.7 \pm 0.8) nm (AFG1+curcumin) and (11.0 \pm 0.8) nm
486 (AFG1+caffeine). According to the results, the curcumin anti-aggregative effect could be
487 greater against AFG1 than AFB1. Regarding the STG-induced A β ₁₋₄₂ aggregation (**Figure**
488 **3.J**), both neuroprotective agents exhibit anti-aggregative effect, considering the lower
489 aggregation capacity of STG compared to AFB1 and AFG1. According to the TEM
490 micrographs, maybe the curcumin anti-aggregative effect against STG (**Figure 3.K**) was
491 lower than anti-aggregative effect of caffeine against the same mycotoxin (**Figure 3.L**),
492 considering the small located accumulations of aggregated A β ₁₋₄₂ fibrils observed after
493 the co-exposure STG-Curcumin, but the widths of A β ₁₋₄₂ fibrils after the co-exposures
494 were similar between both neuroprotective agents ((10 \pm 1) nm for STG+curcumin and
495 (10.1 \pm 0.6) nm for STG+caffeine). However, the presence of curcumin and caffeine has
496 not inhibited the initial OTA-induced A β ₁₋₄₂ aggregation (**Figure 3.G**), as we can observe
497 in the TEM micrographs of **Figure 3.H** (OTA+curcumin) and 3.I (OTA+caffeine). In
498 contrast, caffeine stimulates the initial OTA-induced aggregation effect, according to the
499 similar width of fibrils after the co-exposure OTA-Curcumin ((11.8 \pm 0.9) nm) but
500 surprisingly higher after the co-exposure OTA-Caffeine ((14 \pm 1) nm), compared to the
501 A β ₁₋₄₂ peptide exposure to the OTA alone ((11.5 \pm 0.8) nm).

502 Finally, the fibril width values of the A β ₁₋₄₂ peptide have been treated statistically through
503 a simple analysis of the variance (ANOVA) to confirm the significance of the differences
504 observed between the different substances applied to the A β ₁₋₄₂ peptide. The results
505 obtained from the ANOVA treatment are represented by several Fisher LSD tests applied
506 at a significant level of 95% (**Figure S1** from the Supplementary Material).

507 Regarding the exposure of A β ₁₋₄₂ peptide to each individual substance, there are no
508 significant differences between the width of the fibrils of the untreated A β ₁₋₄₂ peptide
509 (negative aggregation control) and the peptide treated with curcumin or caffeine, but there
510 are differences regarding the exposure to Fe and between the exposure to both
511 neuroprotective agents. Moreover, significant differences have been established between
512 the untreated A β ₁₋₄₂ peptide and all the tested mycotoxins except AFB2, and between all
513 the mycotoxins tested and the Fe-induced A β ₁₋₄₂ peptide exposure (**Figure S1.A**). With
514 respect to the A β ₁₋₄₂ peptide co-exposures to the most aggregative mycotoxins (AFB1,
515 AFG1, OTA, STG) combined with each neuroprotective agent, there are significant
516 differences for the width of A β fibrils exposed to each mycotoxin combined with both
517 neuroprotective agents with respect to the same mycotoxin alone; regarding the untreated
518 A β ₁₋₄₂ peptide and regarding the A β ₁₋₄₂ peptide treated with Fe (with the only exception
519 for the co-administration of STG+caffeine), as detailed in **Figure S1.B**. Therefore, the
520 statistical treatment confirms the significance of 1) The aggregative effect caused by
521 AFB1, AFG1, OTA, STG and even AFG2 over the A β ₁₋₄₂ peptide; 2) The anti-aggregative
522 effect caused by curcumin and caffeine over the aggregative effect of AFB1, AFG1 and
523 STG; and 3) The potentiation of the original OTA-induced aggregation by caffeine.

524 Currently there are no additional works in the literature on *in vitro* interaction between
525 the A β ₁₋₄₂ peptide and mycotoxins, although several studies have demonstrated the
526 indirect influence of different mycotoxins on the cellular mechanisms that stimulate the
527 synthesis and aggregation of A β peptides at the *in vitro* and *in vivo* levels. So, our study
528 demonstrates the existence of an interaction between some mycotoxins and the A β ₁₋₄₂
529 peptide, even if the applied technique does not allow us to detail the specific nature of the
530 established interactions. The primary structure of the A β ₁₋₄₂ peptide contains an
531 amphipathic polarity derived from a polar aminoacidic region (1-28 aa) combined with a
532 hydrophobic region (29-42 aa), and the initial random-coil conformation is replaced by a
533 highly crossed β -sheet conformation when the fibrils become aggregated [34] [35].
534 Considering these facts, the slightly non-polar character of the aggregative mycotoxins
535 could favor their interaction with the hydrophobic region of the A β ₁₋₄₂ peptide, while the
536 specific polar groups may induce interactions with the polar region (this hypothesis could
537 explain the greater aggregative effect of AFB1, AFG1 and STG compared to OTA, a less
538 polar mycotoxin). Moreover, these interactions could contribute to the generation of the
539 main crossed β -sheet conformation that generate the early aggregation of the A β fibrils.

540 However, the absence of aggregation after the exposure of the A β ₁₋₄₂ peptide to AFB2 and
541 AFG2 discards the influence of the high structural similarity between AFB1, AFG1 and
542 STG on the aggregation capacity of these mycotoxins. The aggregative mycotoxins could
543 also be involved on the formation of other unknown alternative conformations of the
544 aggregated A β ₁₋₄₂ fibrils other than the predominant crossed β -sheet conformation
545 (amorphous, spherical or fibrillar, between others), according to Nilsson [36].

546 Despite there is no evidence on literature on the effects of curcumin and caffeine to
547 counteract the aggregation caused by mycotoxins over the A β ₁₋₄₂ peptide, the anti-
548 aggregative effect of both neuroprotective agents has been tested against other
549 aggregative substances through some *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approaches. The anti-
550 aggregative effect exerted by curcumin against mycotoxins in this assay coincides with
551 the results obtained by Rodríguez-Blázquez et al [37], who demonstrated a similar
552 behavior of curcumin against the high aggregation capacity of Fe over the A β ₁₋₄₂ peptide
553 at the same incubation conditions (37 °C for 48 h at acidic aqueous solution). These
554 authors confirmed a reduction of up to 7 nm in the width of the A β fibrils after the co-
555 exposure to Fe combined with curcumin compared to the original width caused by Fe
556 alone, even reducing the basal width of the untreated A β ₁₋₄₂ peptide. These authors
557 applied curcumin at a higher concentration compared to this study (50 μ M instead of 6
558 μ M), so this factor could have increased the curcumin anti-aggregative capacity, but the
559 applied concentration in our assay is also effective even being eight times less
560 concentrated and it is also more realistic from a human exposure perspective.

561 Regarding the specific interactions established between curcumin and the A β peptides,
562 Kumaraswamy et al [38] have experimentally confirmed the occurrence of strong
563 hydrophobic interactions reinforced by additional hydrogen bonds, whereas Huo et al [39]
564 support that these hydrophobic interactions curcumin-A β peptide occur through the
565 symmetrical phenyl- and ethoxy- groups of the curcumin. Consequently, these molecular
566 interactions break the hydrogen-bonded β sheet structures and disaggregate the A β
567 peptide fibrils [40].

568 On the other side, the anti-aggregative effect exerted by caffeine against the AFB1-,
569 AFG1- and STG-induced A β ₁₋₄₂ aggregation agrees with some *in silico* studies developed
570 by Gupta and Dasmahapatra [41] or Sharma and Paul [42], who have demonstrated
571 through simulated models the capacity of caffeine to intersperse between the β sheet
572 structures that compose the aggregated fibrils through interactions between caffeine and

573 some phenylalanine residues of the hydrophobic region of the aggregated A β ₁₋₄₂ peptides.
574 These interactions would increase the distance between the A β monomers and destabilize
575 the β sheet conformation. Nevertheless, this anti-aggregation trend contrasts with the
576 enhancement of the OTA-induced aggregation caused by the co-administration with
577 caffeine observed in the current study. Considering the structural differences between
578 OTA and the rest of the aggregative mycotoxins (AFB1, AFG1 and STG), the OTA may
579 establish a different aggregation pattern that caffeine is not able to reverse and even
580 contribute to enhance it.

581 *3.3. A β ₁₋₄₂ peptide exposure to the aggregative mycotoxins analyzed by HPLC-MS/MS.*

582 The aggregation capacity of AFB1, AFG1, OTA and STG over the A β ₁₋₄₂ peptide has been
583 demonstrated by TEM, but the qualitative character of this analytical technique prevents
584 quantification of the interactions established between the mycotoxins and the peptide. For
585 this reason, the incubation of each aggregative mycotoxin with the A β ₁₋₄₂ peptide has been
586 repeated under the same conditions (the concentrations tested in this were ten times less
587 concentrated but the final proportions between the molecules were maintained with
588 respect to the TEM assays), following the procedure described in the 2.5 Section from
589 Materials and Methods. After the incubation, the A β ₁₋₄₂ peptide was removed from the
590 solution and the remanent free mycotoxin in the supernatant was analyzed by HPLC-
591 MS/MS, comparing the signal area of this sample with a sample of the mycotoxin
592 incubated under the same conditions in absence of the A β ₁₋₄₂ peptide.

593 So, the comparison between the signal areas obtained for the mycotoxin previously
594 exposed to the peptide with respect to the mycotoxin not exposed allows us to establish
595 an indirect estimation of the interaction mycotoxin-A β ₁₋₄₂ peptide. This estimation is
596 assumed on the basis that the signal loss is caused by the interactions established between
597 the mycotoxins and the peptide, so preventing the detection of the mycotoxin that is linked
598 to the peptide. However, no signal losses were detected for AFB1, AFG1 and OTA (100%
599 recoveries for the free mycotoxins have been achieved) and free STG was detected at
600 93% after the incubation with the peptide, compared to the alone mycotoxin not exposed.
601 Considering that some type of interaction is required to favor the aggregation of the A β <sub>1-
602 42</sub> peptide caused by the mycotoxins, the apparent absence of signal losses obtained after
603 the incubation of AFB1, AFG1 and OTA with the peptide cannot be interpreted as a total
604 absence of interaction.

605 These results suggest some hypothesis of interaction. Firstly, the interactions established
606 between the mycotoxins and the peptide may be so intense or so specific that only a small
607 fraction of mycotoxin molecules is able to aggregate the peptide, even if the peptide is
608 about 17 times more concentrated than the mycotoxins. This hypothesis would mean a
609 strong reactive behavior of these mycotoxins on the A β ₁₋₄₂ peptide aggregation, even at
610 not-detectable levels (lower than the LOD range between 0.8-2.7 nM established for all
611 the mycotoxins), according to the technique applied for AFB1, AFG1 and OTA
612 interactions. This fact is consistent with the high aggregation effect observed by TEM.
613 On the other hand, a decrease in the STG signal of around 7% was detected, so this
614 percentage of the mycotoxins could interact with the A β ₁₋₄₂ peptide. However, the
615 decrease in the STG signal could be also attributed to a possible auto-aggregation of this
616 mycotoxin, according to Jakšić et al [43]. These authors experimentally demonstrated that
617 this mycotoxin possesses a unique capacity to auto-aggregate in aqueous solution that is
618 not common to other mycotoxins.

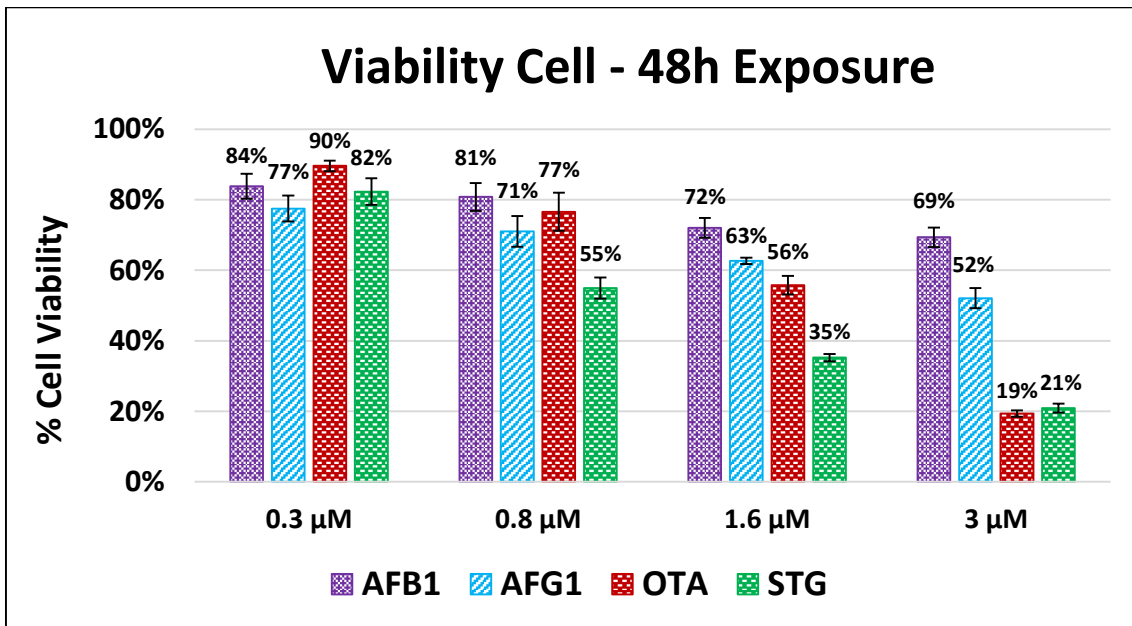
619 In contrast, a weak interaction between these mycotoxins and the A β ₁₋₄₂ peptide which
620 resulted easily reversed after the incubation can be discarded because the peptide was
621 removed from the solution by an additional centrifugation step before the analysis (so,
622 the fraction of mycotoxin linked to the peptide should have been removed with the
623 peptide). Moreover, the centrifugation step could not break these interactions between the
624 mycotoxins and the peptide.

625 Finally, the apparent absence of any detectable interaction between AFB1, AFG1 and
626 OTA with respect to the A β ₁₋₄₂ peptide could be explained by repulsive interactions, that
627 is, the aggregation of the A β ₁₋₄₂ monomers could be caused because of a repulsion effect
628 with respect to the mycotoxin structures. This hypothesis is supported by previous
629 findings that confirmed the repulsion capacity exerted by different mycotoxins against
630 different adsorbent agents, i.e. short peptides with similar structures to the A β ₁₋₄₂ peptide.
631 These authors have established precedents on repulsion interactions based on both
632 polarity differences [44] and electrostatic forces [45], the latter being relevant when
633 considering that the acidic pH of the sample could alter the original charge balance of
634 both types of molecules during the incubation [46].

635 *3.4. Mycotoxin cytotoxicity and co-exposure with the curcumin and caffeine over SH-*
636 *SY5Y cells.*

637 Considering the potential aggregation effect exerted by AFB1, AFG1, OTA and STG on
 638 the amyloid β protein, the cytotoxicity of these mycotoxins was evaluated in SH-SY5Y
 639 cell cultures. These cells were selected as a model assay because they are an immortal
 640 cell line from human neuroblastoma tumor with characteristics like the neural types
 641 affected by the main neurodegenerative pathologies [47]. Moreover, its immortal
 642 condition allowed an infinite growth by applying simple culture conditions to develop the
 643 experiments. The complete culture media was inoculated with each mycotoxin and
 644 applied to populations of 24,000 cells for 48 h, considering that the maximum levels of
 645 some mycotoxins in blood can be observed between the 24-48 h after ingestion [48]. So,
 646 a similar neural exposure time is feasible through the contact of BBB with the blood
 647 circulation.

648 First, cells were exposed to each mycotoxin at four different concentration levels (0.3,
 649 0.8, 1.6 and 3 μM). Levels above 3 μM were not considered because we considered that
 650 higher levels were not realistic from a human exposure approach neither a proper BBB
 651 absorption nor regarding with a normal organism operation [2]. The viability percentages
 652 obtained at the tested levels for all the mycotoxins are detailed in **Figure 4**.



653
 654 **Figure 4.** Viability percentages obtained for SH-SY5Y cells after the exposure to AFB1,
 655 AFG1, OTA and STG at 0.3, 0.8, 1.6 and 3 μM for 48 h.

656 In general, low toxicity values were observed at the lowest exposure level (0.3 μM) with
 657 a similar behavior between the mycotoxins. This trend was maintained up to 0.8 μM
 658 except for STG (a decrease in cell viability up to 55%, compared to 71%-81% observed

659 for the other mycotoxins). However, the cytotoxicity patterns among the mycotoxins
 660 changed from 1.6 μM to 3 μM , with OTA and STG becoming the most toxic mycotoxins
 661 among those tested. Regarding aflatoxins, AFG1 exhibits a greater effect than AFB1 at
 662 the highest concentration applied. LC_{50} values were calculated by interpolating the
 663 viability percentages in regression curves. For AFG1 and STG, linear regression was the
 664 most proper to model the decreasing trend in viability, but a logarithmic curve model was
 665 more suitable for AFB1 and OTA, with $R^2 > 0.99$ for all the mycotoxins except for AFB1
 666 ($R^2 = 0.93$) because AFB1 was the least toxic mycotoxin. So, LC_{50} for AFB1 could not
 667 be calculated and this value was considered above the highest tested level. The LC_{50}
 668 values are detailed in **Table 1**. Then, according to the LC_{50} values, the final order of
 669 mycotoxin neurotoxicity was as follows: $\text{STG} > \text{OTA} > \text{AFG1} > \text{AFB1}$.

Mycotoxin	LC50	
	mg/L	μM
AFB1	> 1*	> 3*
AFG1	1	3
OTA	0.7	1.8
STE	0.3	1

670 **Table 1.** LC_{50} estimated for AFB1 and calculated for AFG1, OTA and STG by
 671 interpolation in the linear and logarithmic curves previously represented from the
 672 viability percentages obtained.

673 * LC_{50} value for AFB1 was considered higher than 3 μM because the experimental value was not
 674 obtained within the range assayed.

675 Although some studies have been developed to test different parameters related to the
 676 neurotoxicity of each mycotoxin, this is the first study that compares the cytotoxicity of
 677 four mycotoxins in SH-SY5Y cells. The differences between the toxicity values of these
 678 mycotoxins could be related to their molecular structures (illustrated in **Figure 1**), which
 679 are responsible for their pharmaco-kinetical properties.

680 STG was the most cytotoxic compound for the cells with LC_{50} of same order as those
 681 found by Zingales et al [49] [14] (2.12 μM and 2.41 μM after 48 h of exposure,
 682 respectively).

683 The high toxicity of OTA could be related to its highly non-polar character that could
 684 facilitate its cross through the cell membranes, which is consistent with its ease of
 685 crossing BBB observed in mice [50]. Moreover, its high ability to bind to proteins may

686 facilitate its internalization into the cells through a previous linking with extracellular and
687 membrane proteins [51]. The high cytotoxic OTA values from the current study (LC₅₀ at
688 1.8 μM) contrast with the results obtained by other authors who did not find relevant
689 cytotoxicity of OTA in SH-SY5Y (85-98% viability) and HT-22 (95-99% viability) cell
690 lines, although the range of exposure to OTA was higher (2.5-30 μM) and the exposure
691 time was lower (24 h) [52]. In the same line, Yoon et al [53] did not find a relevant toxic
692 effect of OTA for SH-SY5Y and HT-22 cell models up to 100 μM after 24 h of exposure.
693 However, Sharma et al [54] established the LC₅₀ value for OTA above 0.05 μM using the
694 same cell line after 48 h of exposure, but the exposure media did not contain FBS.

695 Regarding aflatoxins, the lower cytotoxicity observed for AFB1 and AFG1 compared to
696 STG is relevant, considering that the latter is a biosynthesis precursor metabolite of the
697 aflatoxins, as well as their structural similarity and the common metabolic routes for
698 human detoxification [55]. Moreover, AFG1 was surprisingly more toxic than AFB1,
699 resulting the least toxic among the mycotoxins tested. Numerous studies consider AFB1
700 to be the most toxic aflatoxin for human health in general, and for the hepatic tissue in
701 particular, being the hepatic cells lines such as HepG2 the most common studied for the
702 effects of AFB1 [56]. AFB1 has been considered as the most potentially neurotoxic
703 aflatoxin, but there are no studies that directly compare the cytotoxicity between different
704 aflatoxins in SH-SY5Y cell line, which is considered the most appropriate cell line for
705 neuroprotective assessment. Although AFB1 was found to be the least toxic to SH-SY5Y
706 cells in this assay, its effect was more pronounced than the results obtained by Kara and
707 Oztas [57], who established the viability of SH-SY5Y cells above 90% after exposure to
708 AFB1 at 12.5-100 μM for 24 h. In the same line, Domijan et al [58] only achieved cell
709 mortality values of 16% after an exposure to 100 μM of AFB1 for 24 h, but in this case
710 AFB1 was applied to the cells through a PBS solution instead of complete media culture.
711 On the other hand, Huang et al [59] tested the cytotoxicity of AFB1 over the IMR-32
712 neuroblastoma cell line up to 30 μM and obtained IC₅₀ values of 19 μM and 18 μM for
713 24 h and 48 h exposures. The mentioned authors also detected an increase of the ROS as
714 a common effect of AFB1, as well as S-phase arrest, DNA damage and apoptosis.
715 Therefore, the wide differences of AFB1 neurotoxicity between the present study and the
716 others could be highly influenced by the exposure times; the specific methodologies
717 applied during the exposures (especially the composition of the exposure media); and the
718 cell lines tested.

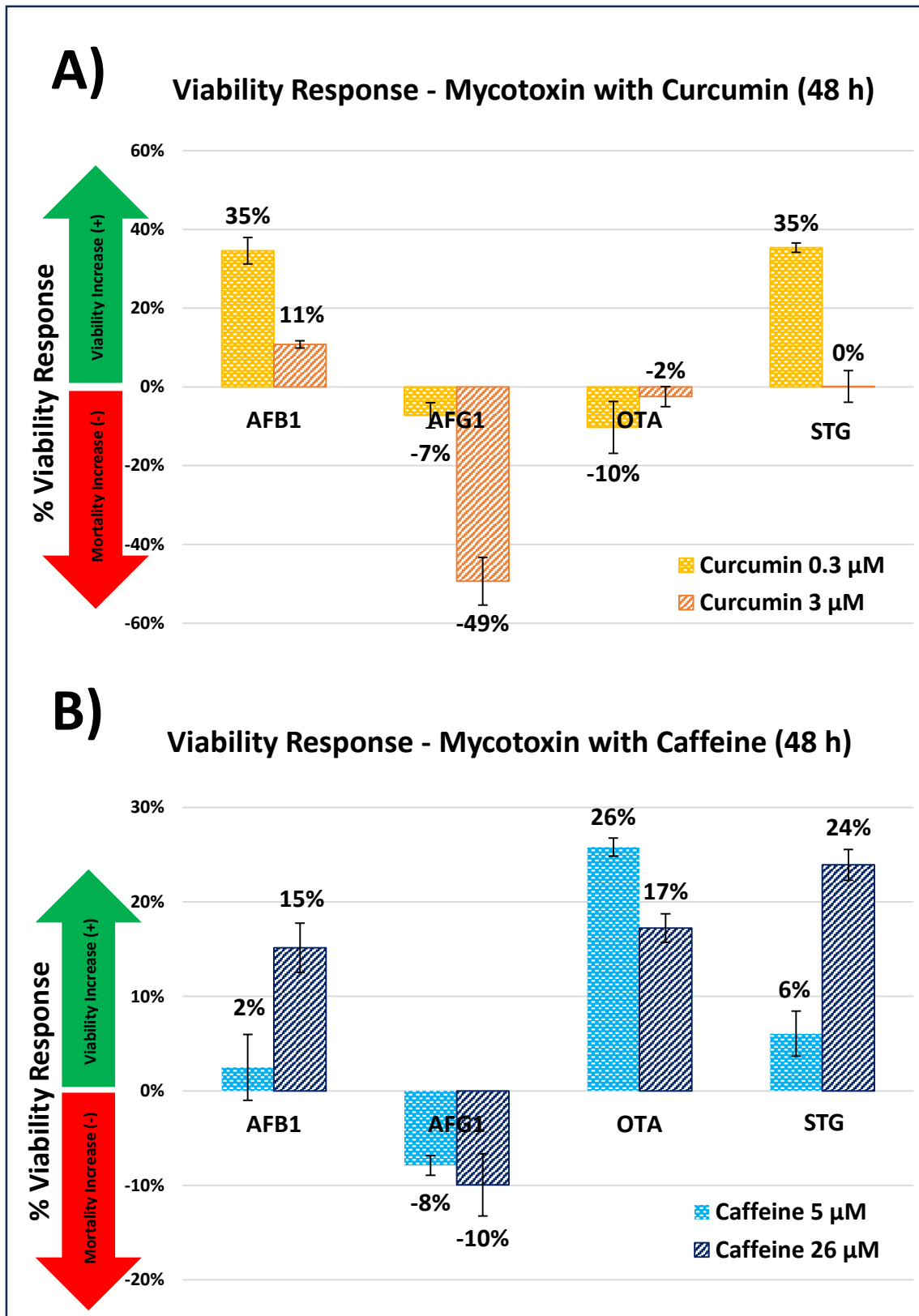
719 Once confirmed the neural cytotoxicity of these mycotoxins in SH-SY5Y cells, the
720 neuroprotective potential of curcumin and caffeine were tested to counteract the
721 mycotoxin neurotoxicity. First, the cytotoxicity of curcumin and caffeine alone was
722 evaluated. The preliminary exposure range for these substances was more extensive by
723 considering the low toxicity of these substances. The viability percentages are represented
724 in **Figure S2** from the Supplementary Material.

725 For curcumin, a range between 0.03 μM (0.01 mg/L) and 14 μM (5 mg/L) was selected.
726 Of the seven levels tested (0.03, 0.14, 0.3, 1.4, 2.7, 6.8 and 13.6 μM), a wide safe range
727 between 0.03 μM and 2.7 μM was confirmed, with viability percentages around 100%.
728 However, higher levels of curcumin were found to be toxic to the cells, with reductions
729 of the viability up to 79% and 17% at 6.8 μM and 13.6 μM (**Figure S2.A**). However,
730 these levels are not considered as representative of an *in vivo* neural exposure because
731 they are far above the maximal BBB absorption for curcumin, considering its low
732 bioaccessibility, fast metabolization, blood instability, and limited pass ratio across the
733 BBB [60].

734 Regarding caffeine, the range of concentrations tested was established between 0.5 μM
735 (0.1 mg/L) and 103 μM (20 mg/L), with much higher concentrations compared to
736 curcumin. These high levels were specifically selected because caffeine has an average
737 oral intake of 80 to 100 mg (content of a single cup of black coffee), as well as a high
738 bioavailability (close to 100%) and easily crosses BBB by simple diffusion and carrier-
739 mediated transport [61]. The viability percentages obtained were around 100% for all the
740 concentration tested (**Figure S2.B**), confirming the safety of this range for the next assay,
741 in accordance with the minimal caffeine level in blood at 155 μM (30 mg/L) related with
742 its *in vivo* toxicity [62]. Several authors have reported the capacity of caffeine to arrest
743 the cell cycle progression in the SH-SY5Y cells and primary neural cultures from rats
744 [63]. However, these authors tested much higher concentrations (20 mM) for a shorter
745 exposure time (4 h). On the other hand, other authors have confirmed the cytotoxic effect
746 due to an excessive antioxidant capacity of caffeine in SH-SY5Y cells (antioxidant
747 stress), but again higher concentrations were tested in both studies (644-1030 mM and 5-
748 10 mM) compared to the current range [64], [65].

749 The next step was to test the neuroprotective effect of curcumin and caffeine against the
750 cytotoxicity of mycotoxins. For this purpose, a specific level close to the established LC_{50}
751 was selected for each mycotoxin: 3 μM (1 mg/L) for AFB1, considering that the

752 experimental LC₅₀ could not be calculated; 3 µM (1 mg/L) for AFG1; 2 µM (0.75 mg/L)
753 for OTA and 0.8 µM (0.25 mg/L) for STG. The selected level of each mycotoxin was co-
754 administered with two different safe levels of curcumin at 0.3 µM (0.1 mg/L) and 3 µM
755 (1 mg/L), and caffeine at 5 µM (1 mg/L) y 26 µM (5 mg/L), and the cells were incubated
756 during 48h. After exposure, the increase (+) or decrease (-) of the cell viability with
757 respect to the basal viability obtained after e cell exposure to a single mycotoxin
758 (considered as the 0% viability) were established. The results obtained are represented
759 in **Figure 5**.



760 **Figure 5.** Viability response expressed as the viability increase (+) or the mortality
 761 increase (-) caused by the co-administration of each mycotoxin (AFB1, AFG1, OTA and
 762 STG) at two different levels of A) Curcumin (0.3 and 3 μ M) and B) Caffeine (5 and 26
 763 μ M), on the SH-SY5Y cells for 48 h.

764 ANOVA was applied to establish the individual contribution of each factor involved in
765 the co-exposure (mycotoxin, neuroprotective agent, exposure level), and the possible
766 significant interactions between the factors and between the groups belonging to each
767 factor. Moreover, the differences between the different groups of each factor were
768 confirmed by LSD Fisher tests. The ANOVA plot and the LSD Fisher test are represented
769 in **Figure S3** from the Supplementary Material. According to the ANOVA, the three
770 factors resulted in statistically significant (p-values < 0.05), with significant interactions
771 between all the factors. Regarding the groups of each factor, statistically significant
772 differences were observed between: AFB1-AFG1, AFB1-OTA, AFG1-STG, AFG1-OTA;
773 between curcumin-caffeine; and between the two levels of each neuroprotective agent
774 applied.

775 It is remarkable that both neuroprotective agents exert different effects on the basal
776 toxicity of mycotoxins depending on the type of mycotoxin and the level applied.
777 Curcumin demonstrated a neuroprotective action against AFB1 and STG at the lowest
778 level applied (0.3 μ M) by increasing the cell viability by about 35%, whereas the
779 neuroprotective capacity disappeared when curcumin was applied ten times more
780 concentrated (3 μ M). However, no relevant effect was observed during the co-
781 administration of curcumin with OTA, although a slight increase of the mortality at 10%
782 and 2% was observed at both curcumin levels, that could be discarded considering the
783 standard deviations. However, the co-administration of curcumin with AFG1 resulted
784 toxic to the cells, increasing the cell mortality by approximately 49% at the highest level,
785 compared to the individual application of AFG1.

786 Several studies have addressed the protective role of curcumin against some specific toxic
787 effects of mycotoxins, but these works are focused on hepatic, kidney and immune effects
788 (the hepatic level has been the most studied because of the mycotoxin hepatotoxicity)
789 [23]. However, studies to test the neuroprotective effects of curcumin against mycotoxins
790 are scarce, and most of them have been developed *in vivo*. So, this is the first work that
791 evaluates its neuroprotective effect in co-exposure with AFB1, the AFG1, OTA and STG
792 *in vitro*. The increase in cell viability achieved when curcumin was applied at 0.3 μ M in
793 co-exposure with the cytotoxic levels of AFB1 and STG could be highly related to the
794 antioxidant properties of curcumin (thereby reducing the ROS derived from the
795 metabolism of mycotoxins) and its regulating capacity on the metabolism of AFB1
796 through the modulation of the P450 Cytochrome isoenzymes [66]. These properties could

797 also explain the protective effect of curcumin against STG considering the structural
798 homology between both mycotoxins [67] and the same metabolic routes shared by AFB1
799 and STG in human tissues [68]. This trend contrasted with the increase in cell mortality
800 provoked by the co-exposure of curcumin with AFG1 (considering this mycotoxin as
801 structural and metabolically analogous to the previous ones), but this enhancement over
802 the cytotoxicity of AFG1 could be partially explained because of the curcumin level
803 applied was 3 μM , ten times more concentrated than the level that counteracted the toxic
804 effects of AFB1 and STG. This confirms that curcumin could exert both neuroprotective
805 or neurotoxic effects depending on the concentration of exposure and the type of
806 mycotoxins to counteract.

807 Regarding the protective effect of caffeine, this substance demonstrated neuroprotective
808 capacity against OTA, STG and, to a lesser extent, AFB1. Co-administration with OTA
809 increased cell viability by up to 26% and 17%, with a higher neuroprotective effect at the
810 lowest concentration applied (5 μM), whereas this trend decreased slightly when caffeine
811 was applied five times more concentrated (26 μM). However, the neuroprotective
812 capacity of caffeine followed an opposite pattern when co-administered with STE and
813 AFB1, with increases on the cell viability around 24% to counteract STE toxicity and
814 around 15% to AFB1 at the highest level of caffeine administrated (26 μM); this effect
815 was hardly appreciated at the lowest level applied (viability increases of 6% and 2%).
816 Finally, the application of caffeine in co-administration with AFG1 provoked slight
817 increments in the cell mortality of approximately 8% and 10% when caffeine was
818 administrated at 5 μM and 26 μM , respectively.

819 Although caffeine is one of the most studied substances and its neurological effects are
820 highly documented [19] [22], there are currently no reported studies about its possible
821 effects on the neurotoxic potential of mycotoxins. Only a few works have addressed its
822 antioxidant [69] and antigenotoxic capacities [24] or its modulating capacity on the
823 enzymes belonging to the P450 cytochrome (involved in the metabolism of all the
824 mycotoxins tested [70]). More specifically, the common metabolism of caffeine and
825 mycotoxins could establish a substrate competition between both substances, reducing
826 the production of oxidative metabolites responsible for their main toxic effects on cells
827 [71]. Moreover, many of the works that addressed the above mentioned were focused on
828 the effects of caffeine on AFB1 at hepatic level, although Juan-García et al [21] evaluated
829 the neuroprotective effect of several extracts of coffee that contain caffeine and other

830 bioactive compounds in co-exposure with beauvericin and alfa-zearalenol on SH-SY5Y
831 cells. These authors obtained promising neuroprotective effects for these complex
832 matrices in the same line with our results but testing other different mycotoxins.

833 **4. Conclusions**

834 This study demonstrates the ability of AFB1, AFG1, OTA and STG to aggregate A β ₁₋₄₂
835 peptide, as well as the potential of curcumin and caffeine to counteract the aggregation
836 induce by the AFB1, AFG1 and STG. Moreover, high cytotoxicity of the aggregative
837 mycotoxins has been confirmed by using SH-SY5Y cells, even at lower levels compared
838 to other studies, as well as the higher neurotoxicity of STG and OTA compared to AFG1
839 and AFB1. The lower cytotoxic effect exerted by AFB1 regarding to the other mycotoxins
840 challenges the current trend to establish AFB1 as the most important mycotoxin target for
841 the human health (regardless of its carcinogenic potential), increasing the risk of focusing
842 on other less known mycotoxins from a neurological approach. The neuroprotective
843 capabilities of curcumin and caffeine against the cytotoxicity of AFB1, OTA and STG
844 have confirmed that these compounds are potentially beneficial at neurological level. The
845 neuroprotective effects exerted by these compounds were highly dependent on the type
846 of mycotoxin.

847 The results obtained in the present work contribute to establishing some specific effects
848 of mycotoxins linked with their neurotoxic potential. However, more additional studies
849 are necessary to further explore the specific nature of the interactions established between
850 mycotoxins and the A β peptides, the molecular mechanisms responsible of their cytotoxic
851 effects at cellular and tissue levels, and the factors that are responsible for curcumin and
852 caffeine abilities to reduce or exacerbate the mycotoxin neurotoxicity.

853 **5. Acknowledgements**

854 This work was supported the Spanish Commission of Science and Technology (PID2020-
855 114714RB-I00) and by the Madrid Government under the Multiannual Agreement with
856 Complutense University in the line Program to Stimulate Research for Young Doctors in
857 the context of the V PRICIT (Regional Program of Research and Technological
858 Innovation [PR65/19-22432].

859 I. Romero-Sánchez acknowledges Complutense University of Madrid for his predoctoral
860 grant [CT63/19-CT64/19].

861 Authors are grateful to the Analysis Service Unit facilities of ICTS-NME for the analysis
862 of electronic microscopy and ICTAN for the analysis of Chromatography and Mass
863 Spectrometry.

864 **6. CRediT authorship contribution statement**

865 **Iván Romero-Sánchez:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation,
866 Writing - original draft, Writing - review & editing. **David Vicente-Zurdo:**
867 Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation, Writing - review & editing.
868 **Emma Gracia-Lor:** Resources, Funding acquisition, Project Administration,
869 Supervision, Writing-review and editing. **Yolanda Madrid-Albarrán:** Resources,
870 Funding acquisition, Project Administration, Supervision, Writing-review and editing.
871

- 873 A β – Amyloid β Peptide
- 874 A β ₁₋₄₀ – Amyloid β Peptide (Fragment 1-40)
- 875 A β ₁₋₄₂ – Amyloid β Peptide (Fragment 1-42)
- 876 ACN – Acetonitrile
- 877 AD – Alzheimer Disease
- 878 AFB1 – Aflatoxin B1
- 879 AFB1-N7-Gua – 8,9-dihydro-8(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1
- 880 AFB2 – Aflatoxin B2
- 881 AFBO – AFB1-exo-8,9-epoxide
- 882 AFG1 – Aflatoxin G1
- 883 AFG2 – Aflatoxin G2
- 884 AFs – Aflatoxins (B1, B2, G1 and G2)
- 885 ANOVA – Analysis of the Variance
- 886 APP – Amyloid Precursor Protein
- 887 ATCC – American Type Culture Collection
- 888 BBB – Blood-Brain Barrier
- 889 C18 – N-Octano
- 890 CE – Collision Energy
- 891 CIT – Citrinin
- 892 CNS – Central Nervous System
- 893 DMEM/F12 – Dulbecco’s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12
- 894 DMSO – Dimethyl Sulfoxide
- 895 DNA – Deoxyribonucleic Acid

- 896 DON – Deoxynivalenol
- 897 EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid
- 898 ESI – Electrospray Ionization
- 899 FBS – Fetal Bovine Serum
- 900 Fisher LSD Test – Fisher Least Significant Difference Test
- 901 HCC – Hepatocarcinoma
- 902 HCl – Hydrochloric Acid
- 903 HCOOH – Formic Acid
- 904 HFIP – 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
- 905 HPLC-MS/MS – High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass
906 Spectrometry
- 907 HPLC-QqQ/MS – High Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple
908 Quadrupole Mass Spectrometry
- 909 IARC – International Agency Research on Cancer
- 910 LC₅₀ -Lethal Concentration to kill the 50% of cell population
- 911 LOD – Limit of Detection
- 912 LOQ – Limit of Quantification
- 913 MeOH – Methanol
- 914 MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- 915 MRM – Multiple Reaction Monitoring
- 916 NA – Neuroprotector Agent
- 917 OTA – Ochratoxin A
- 918 PAT – Patulin
- 919 PBS – Phosphate Buffer Salt
- 920 PCR – Polymerase Chain Reaction

- 921 PD – Parkinson Disease
- 922 PVDF – Poly(Vinylidene Fluoride)
- 923 RNA – Ribonucleic Acid
- 924 ROS – Reactive Oxygen Species
- 925 S/N – Signal-to-noise Ratio
- 926 STG – Sterigmatocystin
- 927 TEM – Transmission electronic microscopy
- 928 ZEA – Zearalenone
- 929
- 930

931 **References**

- 932 1. Frangiamone, M., Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Vila-Donat, P., Manyes, L.:
933 In vitro and in vivo evaluation of AFB1 and OTA-toxicity through
934 immunofluorescence and flow cytometry techniques: A systematic review. *Food*
935 *and Chemical Toxicology*. 160, (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112798>
- 936 2. Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Font, G., Manyes, L.: Toxicity of mycotoxins in
937 vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 137,
938 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111161>
- 939 3. Alshannaq, A., Yu, J.H.: Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in
940 food. *Int J Environ Res Public Health*. 14, 1–20 (2017).
941 <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- 942 4. International Agency Research on Cancer (IARC): IARC Monographs on the
943 evaluation of carcinogenic risks to humans. In: *IARC Monographs*. pp. 225–249
944 (2012)
- 945 5. Bhat, P. V., Pandareesh, M.D., Khanum, F., Tamatam, A.: Cytotoxic effects of
946 ochratoxin a in neuro-2a cells: Role of oxidative stress evidenced by N-
947 acetylcysteine. *Front Microbiol*. 7, (2016).
948 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01142>
- 949 6. Nguyen, V.T.T., König, S., Eggert, S., Endres, K., Kins, S.: The role of mycotoxins
950 in neurodegenerative diseases: Current state of the art and future perspectives of
951 research. *Biol Chem*. 403, 3–26 (2022). <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0214>
- 952 7. Qureshi, H., Hamid, S.S., Ali, S.S., Anwar, J., Siddiqui, A.A., Khan, N.A.:
953 Cytotoxic effects of aflatoxin B1 on human brain microvascular endothelial cells
954 of the blood-brain barrier. *Med Mycol*. 53, 409–416 (2015).
955 <https://doi.org/10.1093/mmy/myv010>
- 956 8. Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., Severino, L.:
957 Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer
958 development. *Toxins (Basel)*. 10, 214–233 (2018).
959 <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>

- 960 9. Babayan, N., Tadevosyan, G., Khondkaryan, L., Grigoryan, R., Sarkisyan, N.,
961 Haroutiounian, R., Stopper, H.: Ochratoxin A induces global DNA
962 hypomethylation and oxidative stress in neuronal cells in vitro. *Mycotoxin Res.*
963 36, 73–81 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00370-y>
- 964 10. Niaz, K., Shah, S.Z.A., Khan, F., Bule, M.: Ochratoxin A–induced genotoxic and
965 epigenetic mechanisms lead to Alzheimer disease: its modulation with strategies.
966 *Environmental Science and Pollution Research.* 27, 44673–44700 (2020).
967 <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08991-y>
- 968 11. Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M.,
969 Galvano, F.: Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review.
970 *Toxins (Basel).* 5, 1742–1766 (2013). <https://doi.org/10.3390/toxins5101742>
- 971 12. Doi, K., Uetsuka, K.: Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through
972 oxidative stress-associated pathways. *Int J Mol Sci.* 12, 5213–5237 (2011).
973 <https://doi.org/10.3390/ijms12085213>
- 974 13. Zhang, Z.: Mycotoxin OTA Triggers Alzheimer’s Disease. *ACM International*
975 *Conference Proceeding Series.* 128–132 (2022).
976 <https://doi.org/10.1145/3570773.3570835>
- 977 14. Zingales, V., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M.J.: The role of mitochondria in
978 sterigmatocystin-induced apoptosis on SH-SY5Y cells. *Food and Chemical*
979 *Toxicology.* 142, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111493>
- 980 15. Takashima, K., Nakajima, K., Shimizu, S., Ojira, R., Tang, Q., Okano, H.,
981 Takahashi, Y., Ozawa, S., Jin, M., Yoshinari, T., Yoshida, T., Sugita-Konishi, Y.,
982 Shibutani, M.: Disruption of postnatal neurogenesis and adult-stage suppression of
983 synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure
984 to sterigmatocystin in rats. *Toxicol Lett.* 349, 69–83 (2021).
985 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.06.006>
- 986 16. Gao, W., Jiang, L., Ge, L., Chen, M., Geng, C., Yang, G., Li, Q., Ji, F., Yan, Q.,
987 Zou, Y., Zhong, L., Liu, X.: Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in
988 human liver-derived cell line through lysosomal damage. *Toxicology in Vitro.* 29,
989 1–7 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.08.007>

- 990 17. Meisl, G., Yang, X., Hellstrand, E., Frohm, B., Kirkegaard, J.B., Cohen, S.I.A.,
991 Dobson, C.M., Linse, S., Knowles, T.P.J.: Differences in nucleation behavior
992 underlie the contrasting aggregation kinetics of the A β 40 and A β 42 peptides. *Proc*
993 *Natl Acad Sci U S A.* 111, 9384–9389 (2014).
994 <https://doi.org/10.1073/pnas.1401564111>
- 995 18. Abyadeh, M., Gupta, V., Paulo, J.A., Mahmoudabad Arezoo G, Shadfar, S.,
996 Mirshahvaladi, S., Gupta, V., Nguyen, C.T.O., Finkelstein, D.I., You, Y., Haynes,
997 P.A., Salekdeh, G.H., Graham, S.L., Mirzaei, M.: Amyloid-beta and tau protein
998 beyond Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.* 19, (2023).
999 <https://doi.org/10.4103/1673-5374.386406>
- 1000 19. Andrade, S., Nunes, D., Dabur, M., Ramalho, M.J., Pereira, M.C., Loureiro, J.A.:
1001 Therapeutic Potential of Natural Compounds in Neurodegenerative Diseases:
1002 Insights from Clinical Trials. *Pharmaceutics.* 15, 1–25 (2023).
1003 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010212>
- 1004 20. Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S.,
1005 Chen, P., Kayed, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A., Cole, G.M.: Curcumin inhibits
1006 formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid
1007 in vivo. *Journal of Biological Chemistry.* 280, 5892–5901 (2005).
1008 <https://doi.org/10.1074/jbc.M404751200>
- 1009 21. Juan-García, A., Caprioli, G., Sagratini, G., Mañes, J., Juan, C.: Coffee Silverskin
1010 and Spent Coffee Suitable as Neuroprotectors against Cell Death by Beauvericin
1011 and α -Zearalenol: Evaluating Strategies of Treatment. *Toxins (Basel).* 13, (2021).
1012 <https://doi.org/10.3390/TOXINS13020132>
- 1013 22. Yelanchezian, Y.M.M., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M., Kwakowsky, A.:
1014 Neuroprotective Effect of Caffeine in Alzheimer's Disease. *Molecules.* 27, 3737
1015 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27123737>
- 1016 23. Dai, C., Tian, E., Hao, Z., Tang, S., Wang, Z., Sharma, G., Jiang, H., Shen, J.:
1017 Aflatoxin B1 Toxicity and Protective Effects of Curcumin: Molecular Mechanisms
1018 and Clinical Implications. *Antioxidants.* 11, 2031 (2022).
1019 <https://doi.org/10.3390/antiox11102031>

- 1020 24. Ferk, F., Speer, K., Mišík, M., Nersesyan, A., Knasmüller, S.: Protective Effects of
1021 Coffee Against Induction of DNA Damage and Cancer by Aflatoxin B1. *Coffee in*
1022 *Health and Disease Prevention*. 587–596 (2015). [https://doi.org/10.1016/B978-0-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00066-8)
1023 [12-409517-5.00066-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00066-8)
- 1024 25. Romero-Sánchez, I., Gracia-Lor, E., Madrid-Albarrán, Y.: Aflatoxin detoxification
1025 by thermal cooking treatment and evaluation of in vitro bioaccessibility from white
1026 and brown rice. *Food Chem.* 436, (2023).
1027 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137738>
- 1028 26. Vicente-Zurdo, D., Romero-Sánchez, I., Rosales-Conrado, N., León-González,
1029 M.E., Madrid, Y.: Ability of selenium species to inhibit metal-induced A β
1030 aggregation involved in the development of Alzheimer's disease. *Anal Bioanal*
1031 *Chem.* 412, 6485–6497 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02644-2>
- 1032 27. Wei Cr, R., Lee, S.-S.: Stability of Aflatoxin B1 in Aqueous Solutions. *Journal of*
1033 *the Chinese Chemical Society.* 16, 174–182 (1969).
1034 <https://doi.org/10.1002/jccs.196900023>
- 1035 28. Ding, L., Han, M., Wang, X., Guo, Y.: Ochratoxin A: Overview of Prevention,
1036 Removal, and Detoxification Methods. *Toxins (Basel).* 15, (2023).
1037 <https://doi.org/10.3390/toxins15090565>
- 1038 29. Septien, I., Blanco, J.L., Suarez, G., Cutuli, M.T., Blanco, J.L.: Solubility and
1039 stability of sterigmatocystin in aqueous solutions. *Mycotoxin Res.* 10, 15–20
1040 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF03192247>
- 1041 30. Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., McClements, D.J.: Physical and Chemical Stability
1042 of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature,
1043 and Molecular Environment. *J Agric Food Chem.* 65, 1525–1532 (2017).
1044 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815>
- 1045 31. Rigueto, C.V.T., Nazari, M.T., De Souza, C.F., Cadore, J.S., Brião, V.B., Piccin,
1046 J.S.: Alternative techniques for caffeine removal from wastewater: An overview of
1047 opportunities and challenges. *Journal of Water Process Engineering.* 35, (2020).
1048 <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101231>
- 1049 32. Talmon, Y.: Y. Talmon: Transmission Electron Microscow of Comdex Fluids: The
1050 State of the Art Transmission Electron Microscopy of Complex Fluids: The State

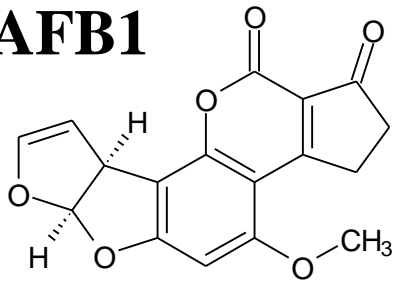
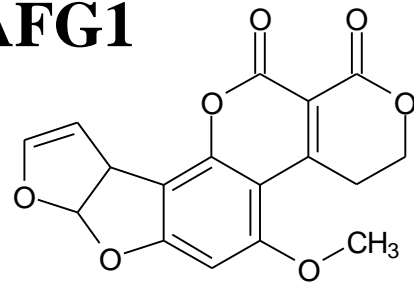
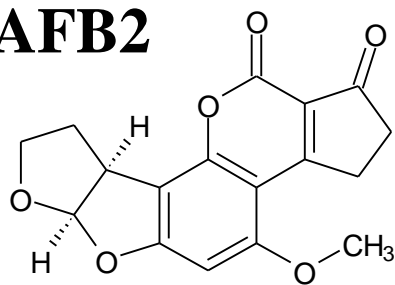
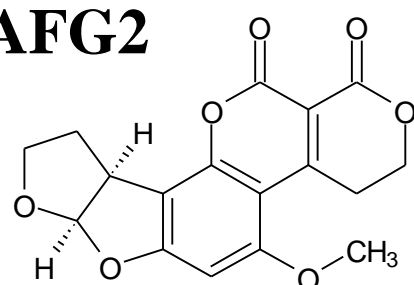
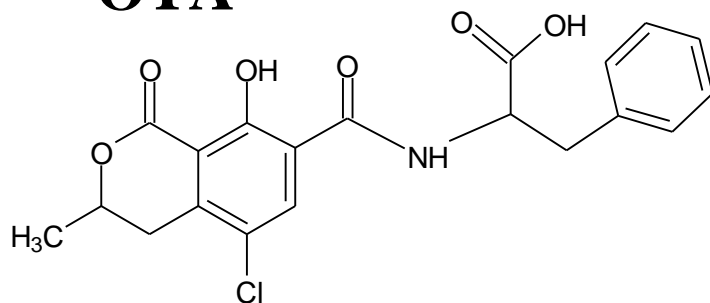
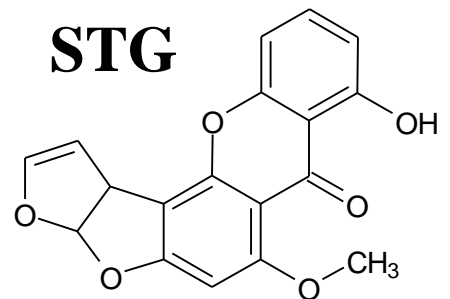
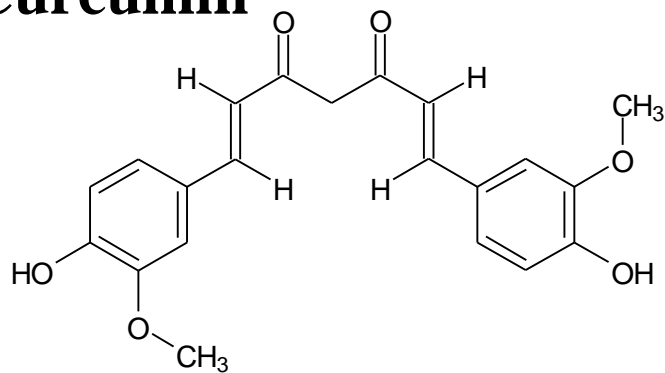
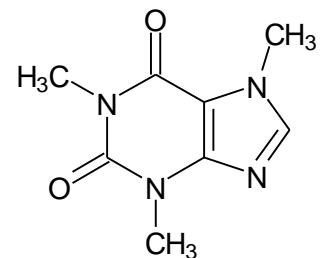
- 1051 of the Art. Reports of the Bunsen Society for Physical Chemistry. 100, 364–372
1052 (1996). <https://doi.org/10.1002/bbpc.19961000322>
- 1053 33. Moreno, N.: Optical Imaging Techniques in Cell Biology. In: Optical Imaging
1054 Techniques in Cell Biology. pp. 249–258 (2007)
- 1055 34. Benseny-Cases, N., Klementieva, O., Cladera, J.: In vitro oligomerization and
1056 fibrillogenesis of Amyloid-beta peptides. In: Subcellular Biochemistry. pp. 53–74.
1057 Springer New York (2012)
- 1058 35. Vicente-Zurdo, D., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E.: Unravelling the in
1059 vitro and in vivo potential of selenium nanoparticles in Alzheimer’s disease: A
1060 bioanalytical review. *Talanta*. 269, (2024).
1061 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125519>
- 1062 36. Nilsson, M.R.: Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*. 34,
1063 151–160 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012>
- 1064 37. Rodríguez-Blázquez, S., Pedrera-Cajas, L., Gómez-Mejía, E., Vicente-Zurdo, D.,
1065 Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., Rodríguez-Bencomo, J.J., Miranda,
1066 R.: The Potential of Plum Seed Residue: Unraveling the Effect of Processing on
1067 Phytochemical Composition and Bioactive Properties. *Int J Mol Sci*. 25, (2024).
1068 <https://doi.org/10.3390/ijms25021236>
- 1069 38. Kumaraswamy, P., Sethuraman, S., Krishnan, U.M.: Mechanistic insights of
1070 curcumin interactions with the core-recognition motif of β -amyloid peptide. *J*
1071 *Agric Food Chem*. 61, 3278–3285 (2013). <https://doi.org/10.1021/jf4000709>
- 1072 39. Huo, X., Zhang, Y., Jin, X., Li, Y., Zhang, L.: A novel synthesis of selenium
1073 nanoparticles encapsulated PLGA nanospheres with curcumin molecules for the
1074 inhibition of amyloid β aggregation in Alzheimer’s disease. *J Photochem Photobiol*
1075 *B*. 190, 98–102 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.008>
- 1076 40. Qin, J., Park, J.S., Jo, D.G., Cho, M., Lee, Y.: Curcumin-based electrochemical
1077 sensor of amyloid-B oligomer for the early detection of Alzheimer’s disease. *Sens*
1078 *Actuators B Chem*. 273, 1593–1599 (2018).
1079 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.078>

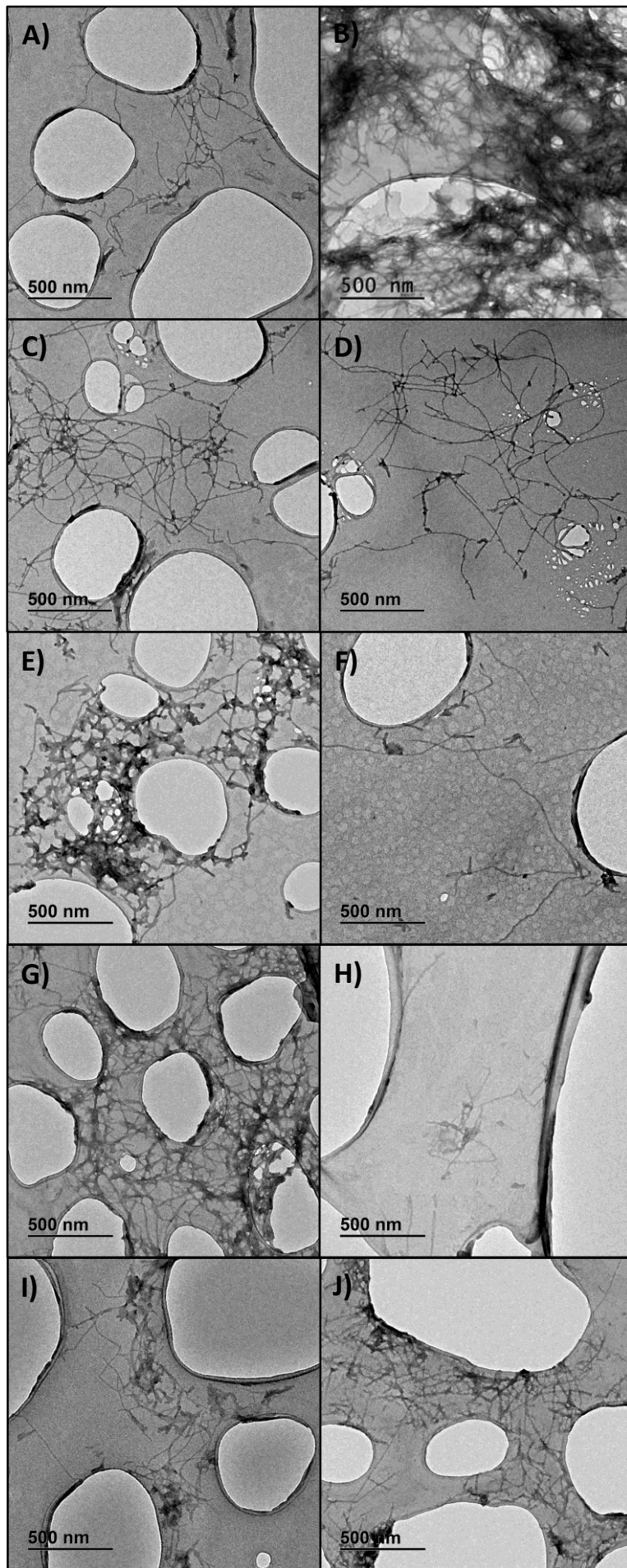
- 1080 41. Gupta, S., Dasmahapatra, A.K.: Caffeine destabilizes preformed A β
1081 protofilaments: Insights from all atom molecular dynamics simulations. *Physical*
1082 *Chemistry Chemical Physics*. 21, 22067–22080 (2019).
1083 <https://doi.org/10.1039/c9cp04162a>
- 1084 42. Sharma, B., Paul, S.: Action of Caffeine as an Amyloid Inhibitor in the Aggregation
1085 of A β 16-22 Peptides. *Journal of Physical Chemistry B*. 120, 9019–9033 (2016).
1086 <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b03892>
- 1087 43. Jakšić, D., Klaric, M.Š., Crnolatac, I., Vujičić, N.Š., Smrečki, V., Górecki, M.,
1088 Pescitelli, G., Piantanida, I.: Unique aggregation of sterigmatocystin in water
1089 yields strong and specific circular dichroism response allowing highly sensitive
1090 and selective monitoring of bio-relevant interactions. *Mar Drugs*. 17, (2019).
1091 <https://doi.org/10.3390/md17110629>
- 1092 44. Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J.: A review of the mycotoxin
1093 adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed
1094 decontamination. *Food and Chemical Toxicology*. 114, 246–259 (2018).
1095 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>
- 1096 45. Chi, J., Zhu, D., Chen, Y., Huang, G., Lin, X.: Online specific recognition of
1097 mycotoxins using aptamer-grafted ionic affinity monolith with mixed-mode
1098 mechanism. *J Chromatogr A*. 1639, (2021).
1099 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461930>
- 1100 46. Di Gregorio, M.C., Neeff, D.V. De, Jager, A.V., Corassin, C.H., Carão, Á.C.D.P.,
1101 Albuquerque, R. De, Azevedo, A.C. De, Oliveira, C.A.F.: Mineral adsorbents for
1102 prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Rev*. 33, 125–135 (2014).
1103 <https://doi.org/10.3109/15569543.2014.905604>
- 1104 47. Kovalevich, J., Langford, D.: Considerations for the use of SH-SY5Y
1105 neuroblastoma cells in neurobiology. In: *Methods in Molecular Biology*. pp. 9–21
1106 (2013)
- 1107 48. Zepnik, H., Völkel, W., Dekant, W.: Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A
1108 in F 344 rats after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 192, 36–44 (2003).
1109 [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00261-8](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00261-8)

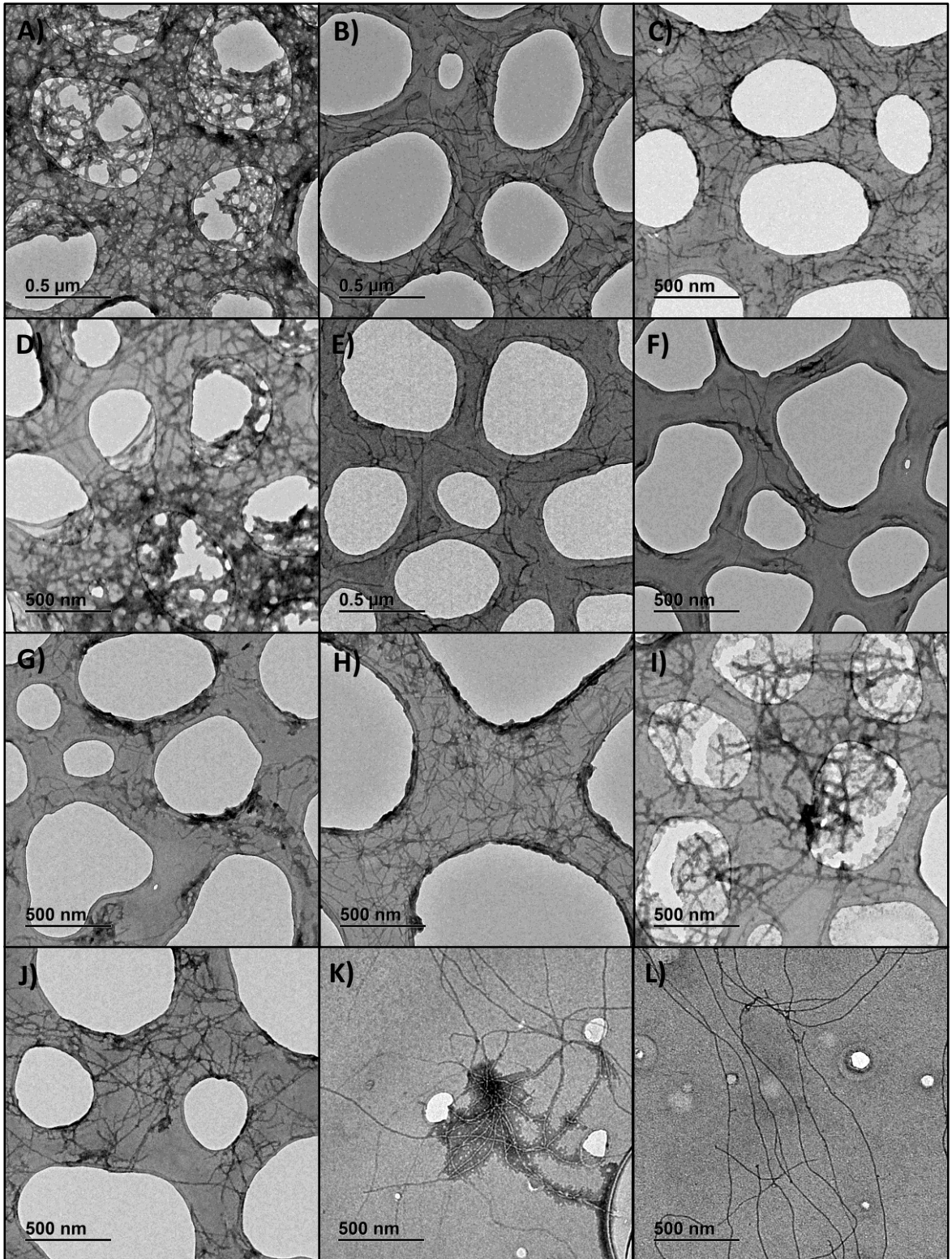
- 1110 49. Zingales, V., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M.J.: Sterigmatocystin-induced
1111 cytotoxicity via oxidative stress induction in human neuroblastoma cells. *Food and*
1112 *Chemical Toxicology*. 136, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110956>
- 1113 50. Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., Sánchez-Ramos, J.: Acute
1114 neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*. 27, 82–
1115 92 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.07.004>
- 1116 51. Obafemi, B.A., Adedara, I.A., Rocha, J.B.T.: Neurotoxicity of ochratoxin A:
1117 Molecular mechanisms and neurotherapeutic strategies. *Toxicology*. 497–498,
1118 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153630>
- 1119 52. Babayan, N., Tadevosyan, G., Khondkaryan, L., Grigoryan, R., Sarkisyan, N.,
1120 Haroutiounian, R., Stopper, H.: Ochratoxin A induces global DNA
1121 hypomethylation and oxidative stress in neuronal cells in vitro. *Mycotoxin Res.*
1122 36, 73–81 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00370-y>
- 1123 53. Yoon, S., Cong, W.T., Bang, Y., Lee, S.N., Yoon, C.S., Kwack, S.J., Kang, T.S.,
1124 Lee, K.Y., Choi, J.K., Choi, H.J.: Proteome response to ochratoxin A-induced
1125 apoptotic cell death in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurotoxicology*. 30, 666–
1126 676 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.04.013>
- 1127 54. Sharma, R., Gettings, S.M., Hazell, G., Bourbia, N.: In vitro study of ochratoxin A
1128 in the expression of genes associated with neuron survival and viability.
1129 *Toxicology*. 483, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153376>
- 1130 55. Díaz Nieto, C.H., Granero, A.M., Zon, M.A., Fernández, H.: Sterigmatocystin: A
1131 mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*. 118, 460–
1132 470 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.057>
- 1133 56. Chen, X., F. Abdallah, M., Chen, X., Rajkovic, A.: Current Knowledge of
1134 Individual and Combined Toxicities of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 In Vitro.
1135 *Toxins (Basel)*. 15, (2023). <https://doi.org/10.3390/toxins15110653>
- 1136 57. Kara, M., Oztas, E.: In-vitro evaluation of aflatoxin-B1 and fumonisin-B1 cellular
1137 stress effects on SH-SY5Y cell line. *Medicine Science | International Medical*
1138 *Journal*. 1 (2020). <https://doi.org/10.5455/medscience.2019.08.9206>

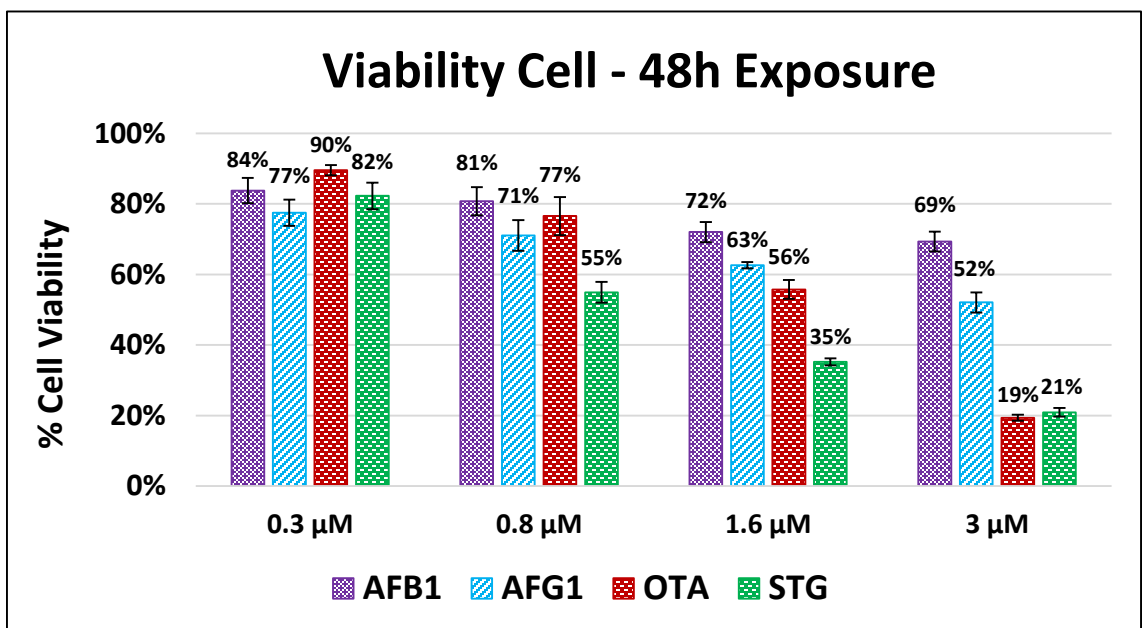
- 1139 58. Domijan, A.M., Marjanović Čermak, A.M., Vulić, A., Tartaro Bujak, I., Pavičić, I.,
1140 Pleadin, J., Markov, K., Mihaljević, B.: Cytotoxicity of gamma irradiated aflatoxin
1141 B 1 and ochratoxin A. *J Environ Sci Health B*. 54, 155–162 (2019).
1142 <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1536578>
- 1143 59. Huang, B., Chen, Q., Wang, L., Gao, X., Zhu, W., Mu, P., Deng, Y.: Aflatoxin b1
1144 induces neurotoxicity through reactive oxygen species generation, dna damage,
1145 apoptosis, and s-phase cell cycle arrest. *Int J Mol Sci*. 21, 1–15 (2020).
1146 <https://doi.org/10.3390/ijms21186517>
- 1147 60. Askarizadeh, A., Barreto, G.E., Henney, N.C., Majeed, M., Sahebkar, A.:
1148 Neuroprotection by curcumin: A review on brain delivery strategies. *Int J Pharm*.
1149 585, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119476>
- 1150 61. Alsabri, S.G., Mari, W.O., Younes, S., Elsadawi, M.A., Oroszi, T.L.: Kinetic and
1151 Dynamic Description of Caffeine. *J Caffeine Adenosine Res*. 8, 3–9 (2018).
1152 <https://doi.org/10.1089/caff.2017.0011>
- 1153 62. Meltzer, H.M., Fotland, Ø., Alexander, J., Elind, E., Hallström, H., Lam, H.R.,
1154 Liukkonen, K.-H., Petersen, M.A., Solbergdottir, E.J.: Risk assessment of caffeine
1155 among children and adolescents in the Nordic countries. (2008)
- 1156 63. Currais, A., Kato, K., Canuet, L., Ishii, R., Tanaka, T., Takeda, M., Soriano, S.:
1157 Caffeine modulates tau phosphorylation and affects Akt signaling in postmitotic
1158 neurons. *Journal of Molecular Neuroscience*. 43, 326–332 (2011).
1159 <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9444-8>
- 1160 64. Zeidán-Chuliá, F., Gelain, D.P., Kolling, E.A., Rybarczyk-Filho, J.L., Ambrosi, P.,
1161 Resende Terra, S., Pires, A.S., Da Rocha, J.B.T., Antônio Behr, G., Fonseca
1162 Moreira, J.C.: Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana)
1163 exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive
1164 oxygen species production. *Oxid Med Cell Longev*. 2013, (2013).
1165 <https://doi.org/10.1155/2013/791795>
- 1166 65. Bavari, M., Tabandeh, M.R., Najafzadeh Varzi, H., Bahramzadeh, S.:
1167 Neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of L-carnitine against
1168 caffeine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Drug Chem*
1169 *Toxicol*. 39, 157–166 (2016). <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1063062>

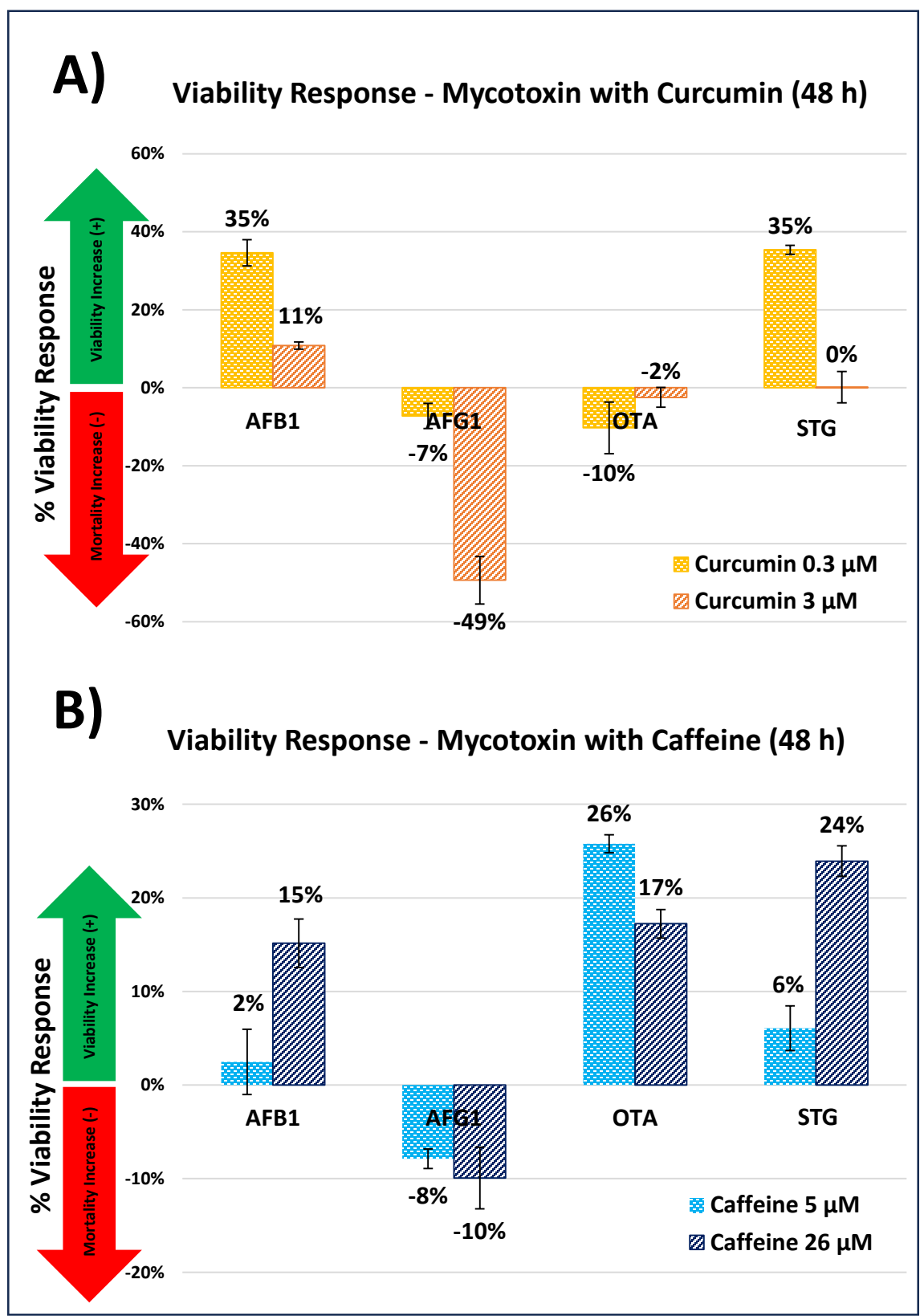
- 1170 66. Mohajeri, M., Behnam, B., Cicero, A.F.G., Sahebkar, A.: Protective effects of
1171 curcumin against aflatoxicosis: A comprehensive review. *J Cell Physiol.* 233,
1172 3552–3577 (2018). <https://doi.org/10.1002/jcp.26212>
- 1173 67. Veršilovskis, A., de Saeger, S.: Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and
1174 analytical methods - an overview. *Mol Nutr Food Res.* 54, 136–147 (2010).
1175 <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900345>
- 1176 68. Cabaret, O., Puel, O., Botterel, F., Pean, M., Khoufache, K., Costa, J.M., Delaforge,
1177 M., Bretagne, S.: Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary
1178 tracheal epithelial cells. *Chem Res Toxicol.* 23, 1673–1681 (2010).
1179 <https://doi.org/10.1021/tx100127b>
- 1180 69. Mihaiescu, T., Turti, S., Souca, M., Muresan, R., Achim, L., Prifti, E., Papuc, I.,
1181 Munteanu, C., Marza, S.M.: Caffeine and Taurine from Energy Drinks—A Review.
1182 *Cosmetics.* 11, 12 (2024). <https://doi.org/10.3390/cosmetics11010012>
- 1183 70. Tran, V.N., Viktorová, J., Ruml, T.: Mycotoxins: Biotransformation and
1184 bioavailability assessment using caco-2 cell monolayer. *Toxins (Basel).* 12, (2020).
1185 <https://doi.org/10.3390/toxins12100628>
- 1186 71. Kot, M., Daniel, W.A.: The relative contribution of human cytochrome P450
1187 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: An in vitro comparative study
1188 with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochem Pharmacol.* 76,
1189 543–551 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025>
- 1190

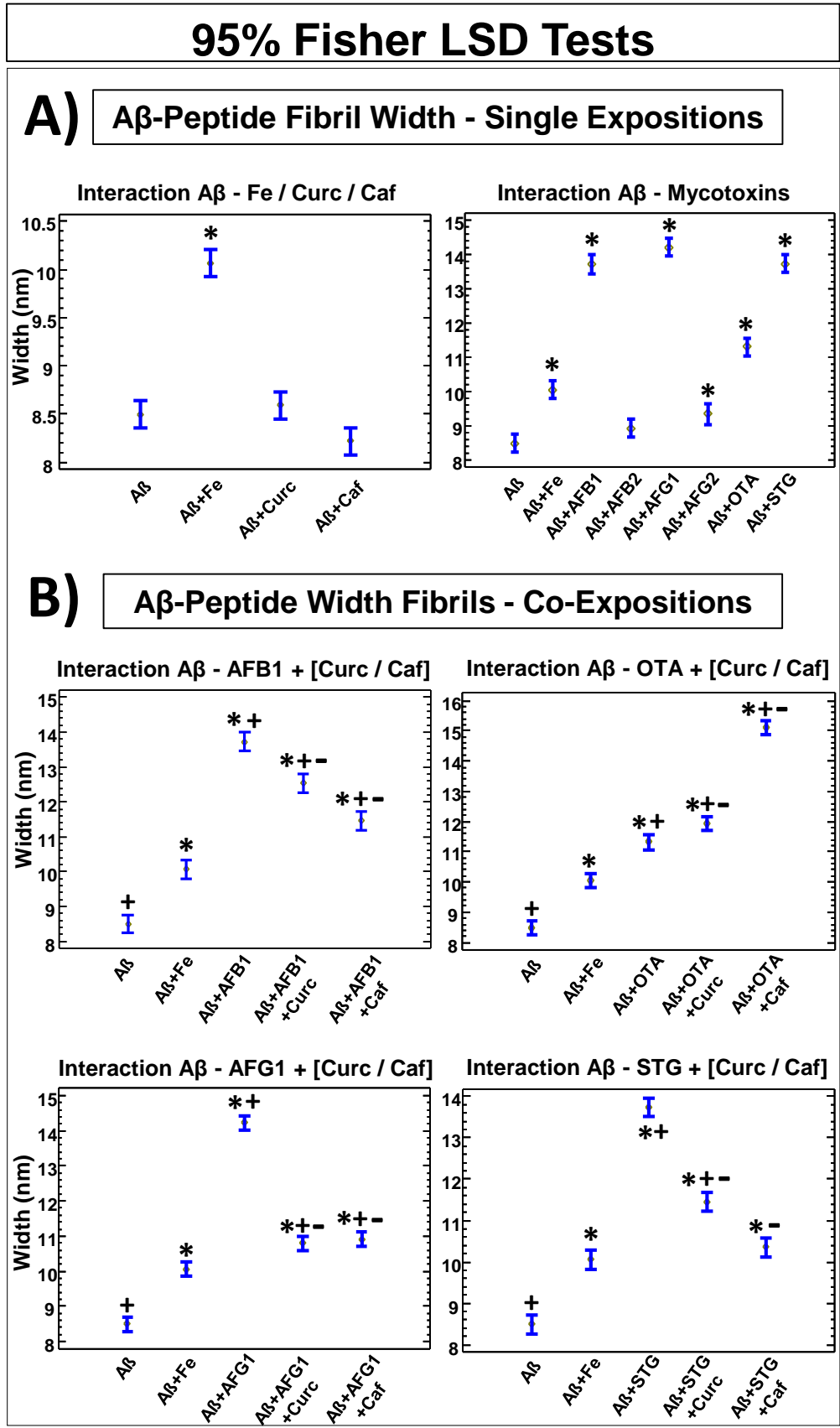
AFB1**AFG1****AFB2****AFG2****OTA****STG****Curcumin****Caffeine**

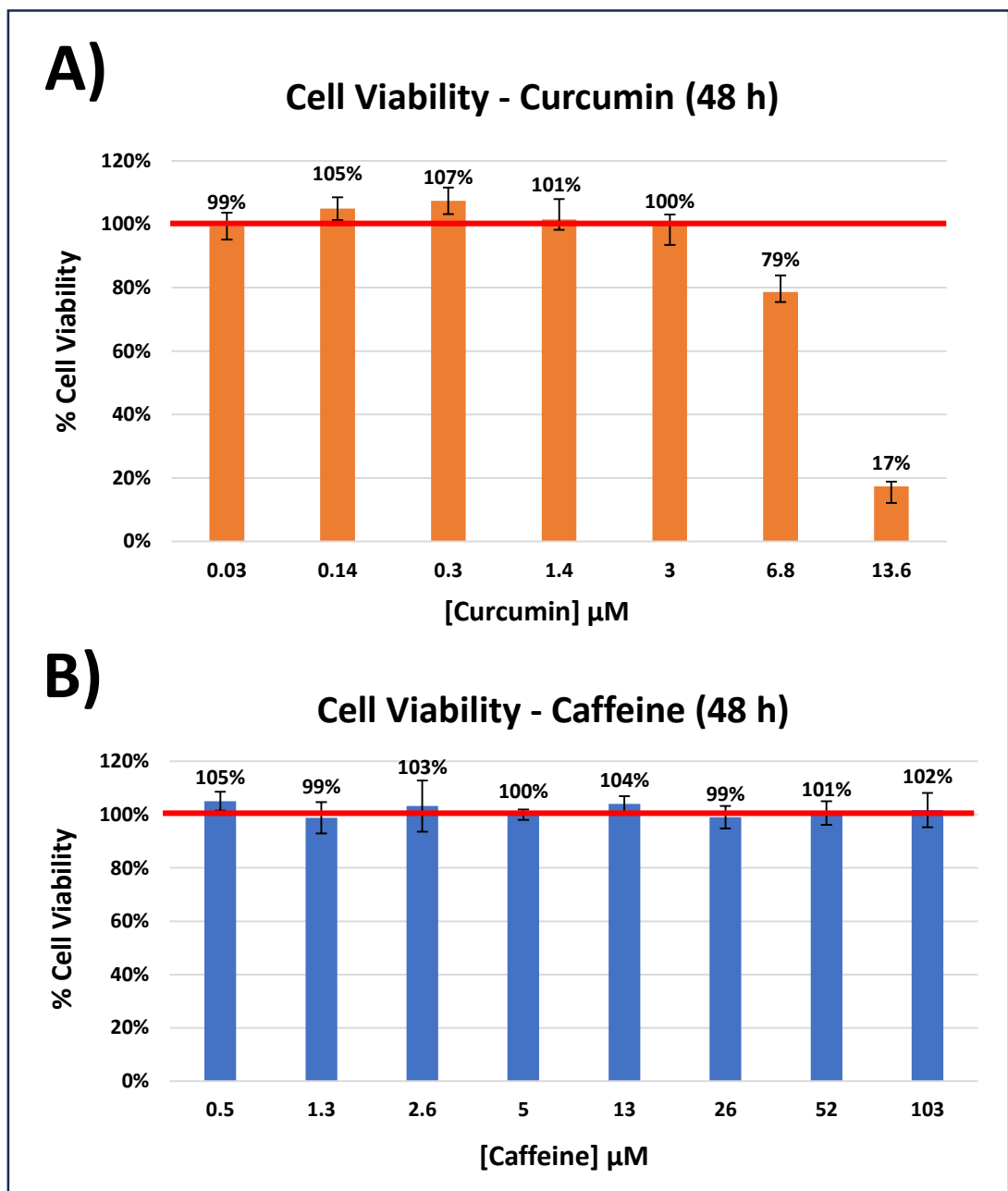






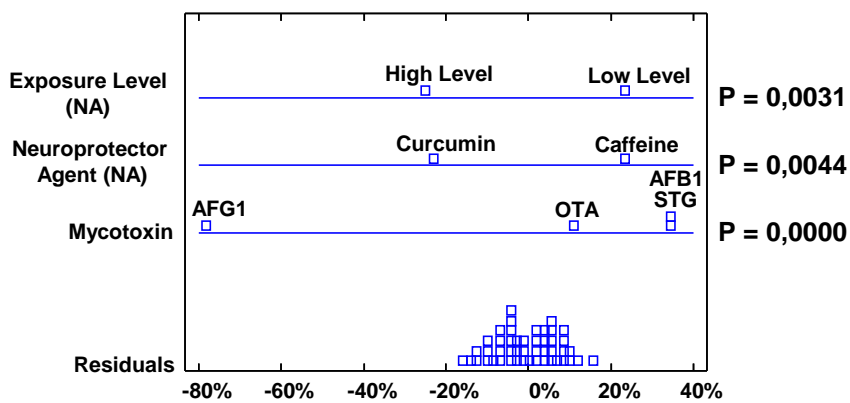






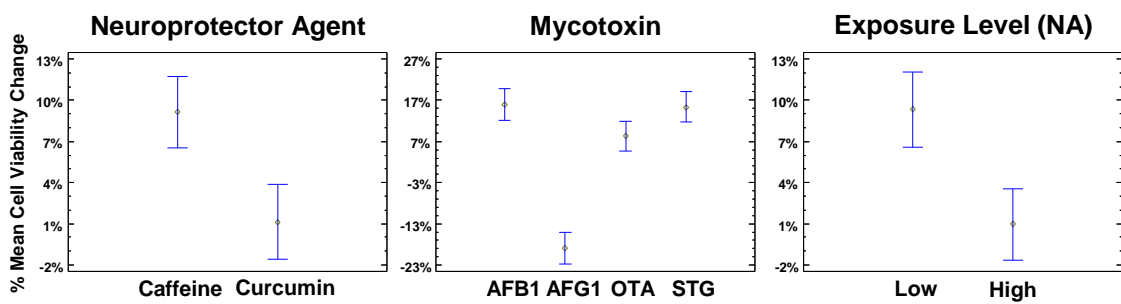
A)

**ANOVA Plot
% Cell Viability Response**



B)

Fisher LSD Tests - % Cell Viability Response





Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

SUPPLEMENTARY MATERIAL

NEUROTOXIC EFFECT OF MYCOTOXINS ON HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE AND AMYLOID β AGGREGATION. PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN AND CAFFEINE.

Iván Romero-Sánchez*, David Vicente-Zurdo, Emma Gracia-Lor* and Yolanda Madrid-Albarrán

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

* Corresponding author: ivaromer@ucm.es

* Corresponding author: emgracia@ucm.es

95% Fisher LSD Tests

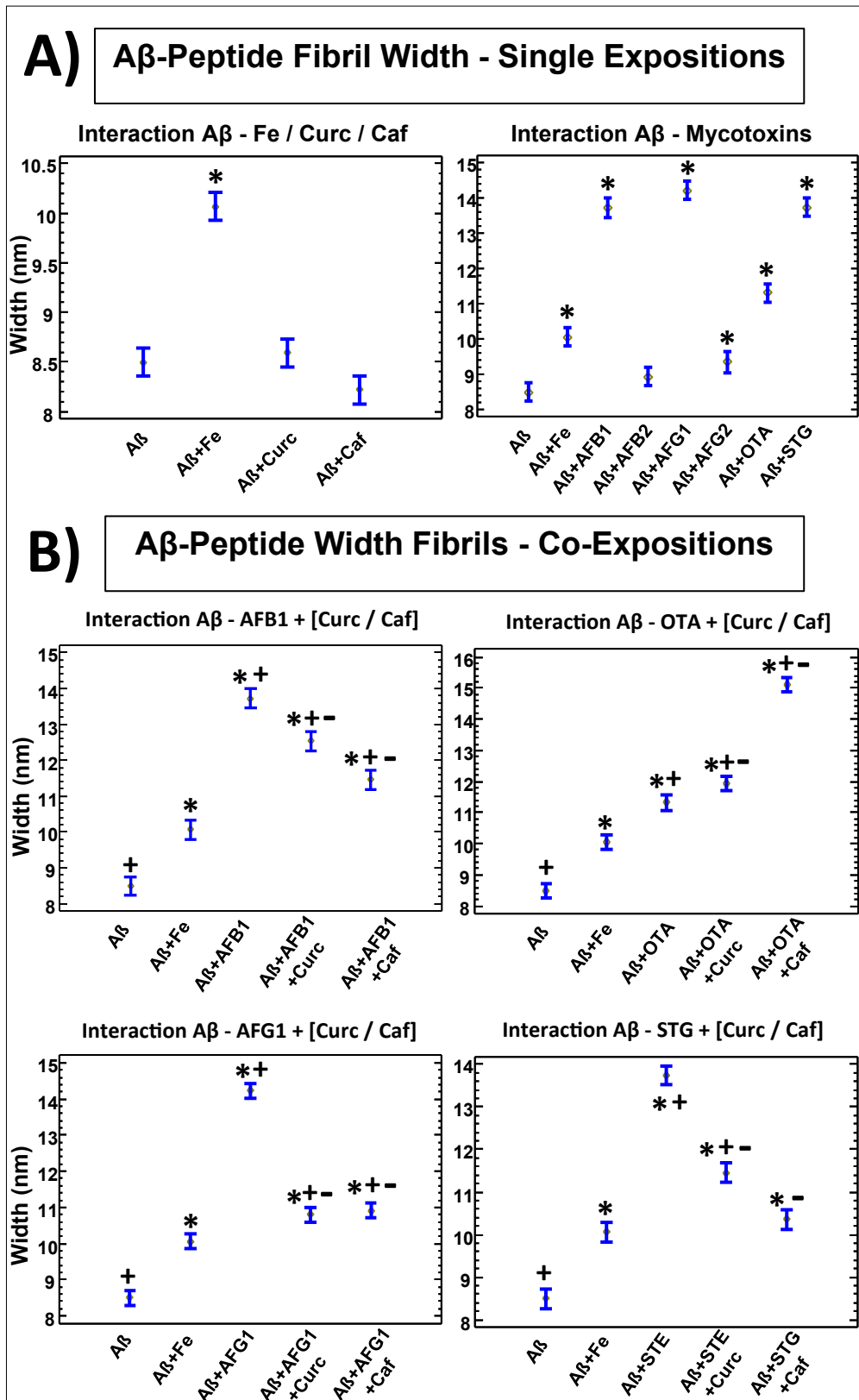


Figure S1. Fisher LSD Tests for a significance level of 95% to compare the A β ₁₋₄₂ Peptide width fibrils after A) The single exposition to Fe, Curcumin (Curc), Caffeine (Caf) and

Mycotoxins (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA and STG); and B) The co-exposition to AFB1, OTA, AFG1 and STG combined with the curcumin (Curc) and with the caffeine (Caf).

* Statistically significant differences between the marked values regarding to the untreated A β ₁₋₄₂ Peptide (A β).

+ Statistically significant differences between the marked values regarding to the A β ₁₋₄₂ Peptide exposed to Fe (A β +Fe).

- Statistically significant differences between the co-exposition values to each aggregative mycotoxin combined with curcumin and caffeine regarding to the single exposition to the same mycotoxin.

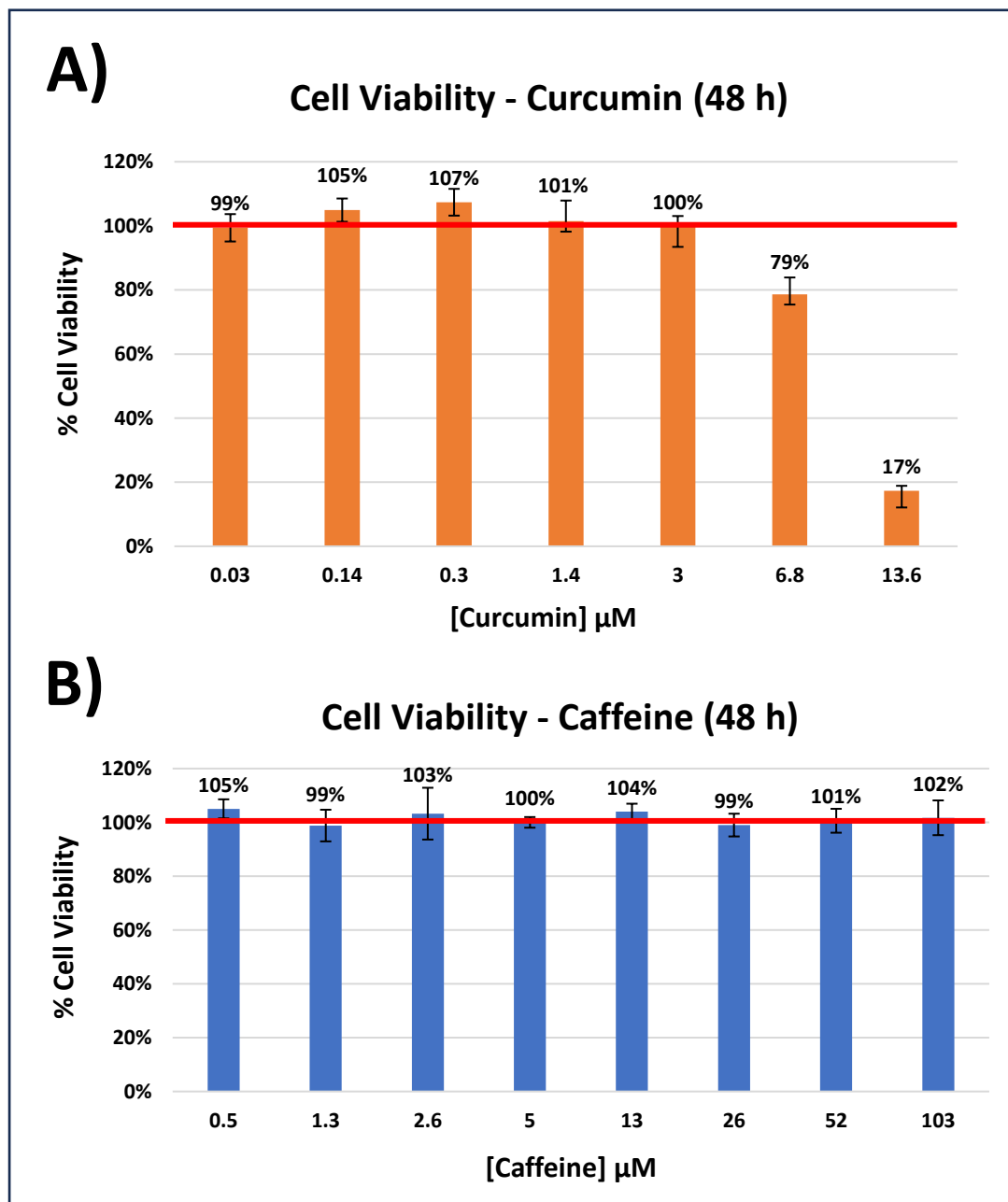


Figure S2. Viability percentages obtained for SH-SY5Y cells after the exposure to A) Curcumin at 0.03, 0.14, 0.3, 1.4, 3, 6.8 and 13.6 μ M; and B) Caffeine at 0.5, 1.3, 2.6, 5, 13, 26, 52 and 103 μ M.

13, 26, 52 and 103 μM , for 48 h. The desired 100% cell viability is marked with a red line.

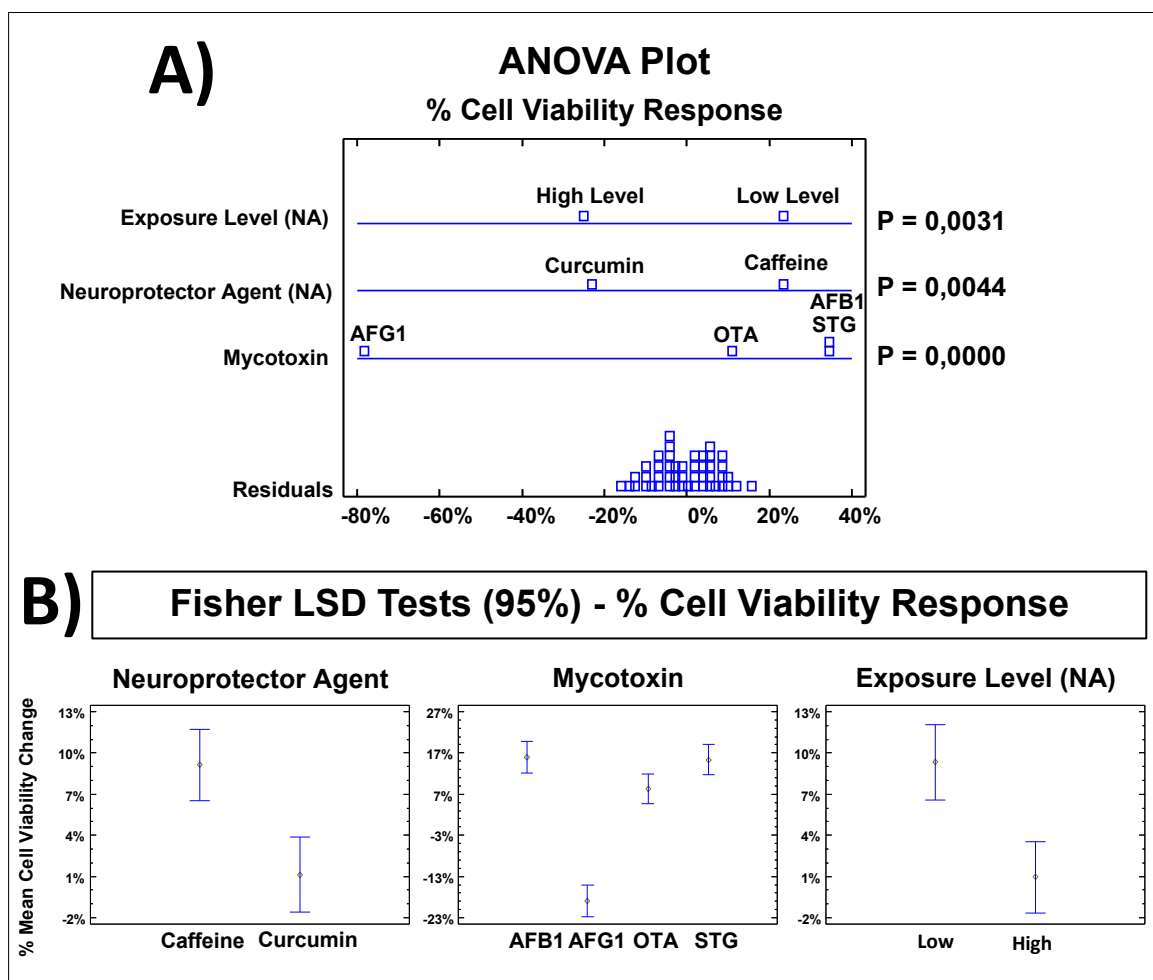


Figure S3. A) Multifactorial ANOVA plot for mycotoxins (AFB1, AFG1, OTA and STG), neuroprotector agent (curcumin and caffeine) and NA concentration level (lower and higher) as factors evaluated, residuals and p-values obtained. B) Graphical results of Fisher LSD test (95%) to compare the variability between the groups belonging to each factor involved on the co-exposition assay.

Compound	Precursor Ion (m/z)	Transitions (m/z)		Collision Energy (V)	Retention Time (min)
		Quantification	Confirmation		
Aflatoxin B1	313.1	241	285	38	6.8
Aflatoxin G1	329.1	243	199.9	26	6.2
Ochratoxin A	404.8	239	193	30	10.1
Sterigmatocystin	325.3	281	310	30	10.6

Table S1. Precursor ion, quantification and confirmation transitions, collision energies and retention times selected for AFB1, AFG1, OTA and STG on HPLC-MS/MS analysis.

IX. DISCUSIÓN
INTEGRADORA

IX. DISCUSIÓN INTEGRADORA

En esta sección se integran los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, y que se recogen en los artículos presentados en los capítulos anteriores. En la presente Tesis Doctoral, el tema de las micotoxinas se ha abordado desde distintos puntos de vista: no solamente se han desarrollado metodologías analíticas para su determinación en muestras complejas (arroz y bebidas vegetales), sino que se ha evaluado el efecto que el cocinado ejerce sobre las aflatoxinas, su bioaccesibilidad (qué ocurre una vez ingeridas, cómo les afecta el proceso de digestión y la composición de la matriz alimentaria, qué fracción de micotoxinas está disponible para ser absorbida por el organismo) y su neurotoxicidad empleando modelos *in vitro*. Este enfoque integral constituye una novedad con respecto a los trabajos relacionados con las micotoxinas existentes en la bibliografía, donde se abordan las distintas temáticas de forma separada, dedicándose la mayoría de los trabajos al desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de estas toxinas naturales en una gran variedad de muestras. Todo ello confirma la necesidad de aplicar un enfoque transversal para evaluar los dos principales aspectos involucrados en el riesgo asociado a micotoxinas, la exposición y la toxicidad derivada de la exposición.

Los alimentos de origen vegetal constituyen la base de una dieta saludable y sostenible contribuyendo a la seguridad alimentaria global. Sin embargo, y en relación con las micotoxinas, la elevada prevalencia de las aflatoxinas en este tipo de alimentos y su elevada toxicidad en comparación al resto de micotoxinas justifica el interés hacia todos los aspectos relacionados con la presencia, exposición y efectos tóxicos de estas micotoxinas a través de este tipo de alimentos. Por este motivo, durante las últimas décadas, el interés de muchos investigadores se ha centrado en el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de aflatoxinas en una amplia gama de alimentos de origen vegetal como los cereales, los frutos secos, las semillas oleaginosas y productos derivados, entre otros. Estos métodos implican, en la mayoría de los casos, la optimización de procesos de extracción y limpieza de los extractos para la posterior determinación de las aflatoxinas mediante HPLC-MS/MS. Idealmente estos métodos deben cumplir una serie de requisitos como son buenos valores de recuperación y precisión, bajo coste, bajos tiempos de análisis y facilidad de ejecución con el fin de

llevar a cabo un control eficaz que asegure el cumplimiento de los límites legislados establecidos para este tipo de analitos.

En este contexto, se desarrolló una metodología analítica para la determinación simultánea de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 a partir de diferentes variedades de arroz.

El análisis de los extractos obtenidos en las pruebas de optimización se realizó mediante cromatografía líquida capilar acoplada a un detector de fotodiodos UV/Visible y a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple (cHPLC-DAD/MS, Agilent), mientras que para la validación del método y el análisis de muestras reales se empleó la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (HPLC-QqQ, Shimadzu). En ambos casos, la separación cromatográfica se efectuó mediante una columna Sinergi™ Fusion C-18 (diámetro interno de 0.3 y 3 mm, respectivamente), para lo cual se optimizó un gradiente cromatográfico formado por dos eluyentes (A: Agua con HCOOH al 0.05% y B: ACN) en modo gradiente. Para la detección de las aflatoxinas mediante DAD/MS, se seleccionaron las longitudes de onda de 360 nm y 375 nm para la cuantificación y la confirmación por DAD (Agilent, modelo G6860A), y los iones moleculares de las aflatoxinas (cuadrupolo simple de Agilent, modelo 6120) utilizando una fuente de ionización ESI en modo positivo. Los análisis mediante MS/MS (Shimadzu, modelo LC-MS-8030) utilizando un triple cuadrupolo se realizaron también en modo ESI positivo y se optimizaron tres transiciones por compuesto (una transición para la cuantificación y dos para la confirmación).

Debido al empleo inicial de la técnica cHPLC-DAD/MS para el análisis de aflatoxinas, la optimización de la etapa de extracción se llevó a cabo empleando arroz blanco fortificado con una cantidad conocida de una sola aflatoxina (la AFB1), asumiendo la similitud estructural entre ellas y, por tanto, su comportamiento. Para ello, el arroz se incubó con la disolución patrón de aflatoxina durante 1 h, en oscuridad, con el objeto de favorecer la interacción entre la toxina y el cereal. Se evaluaron tres disolventes como agentes extractantes: agua, ACN y MeOH, estos dos últimos puros o en disolución ACN:H₂O (80:20, v/v) y MeOH:H₂O (80:20, v/v). La selección de los disolventes se llevó a cabo en base a los datos disponibles en la bibliografía. El elevado volumen de extractante (100 mL) se justifica con el fin de favorecer la extracción cuantitativa de la AFB1, teniendo en cuenta la capacidad absorbente del arroz y la cantidad inicial de muestra inicial (20 g). Los extractos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 15 min.

Posteriormente, se tomó 1 mL del sobrenadante para su evaporación, reconstitución y posterior análisis. La disolución ACN:H₂O (80%:20%) fue la que proporcionó los mejores valores de recuperación para la AFB1 (76%) en comparación con MeOH puro (69%), ACN puro (66%), la mezcla MeOH:H₂O (48%) y agua (20%). Sin embargo, en general las recuperaciones obtenidas son bajas y lejos de ser cuantitativas. Las desviaciones estándar resultaron inferiores al 10% en todos los casos.

Con el fin de mejorar la eficiencia de extracción de la disolución ACN:H₂O (80:20, v/v) se adicionaron sales QuEChERS que provocan la separación de las dos fases, favoreciendo la extracción de las aflatoxinas en la fase orgánica y los interferentes más polares en la fase acuosa. La mezcla específica de sales QuEChERS estaba constituida por 4 g de sulfato de magnesio, 1 g de cloruro de sodio, 1 g de citrato de sodio y 0.5 g de citrato de hidrogeno disódico hexahidratado. Desafortunadamente, la adición de estas sales disminuyó la eficiencia de extracción de la AFB1 hasta un 20%. Asimismo, se aplicaron diferentes modos de agitación (magnética y orbital) y tiempos de incubación (30 min y 1 h), pero no se observaron diferencias en la recuperación final del analito, por lo que se seleccionó la agitación magnética y durante una hora de incubación.

Una vez determinadas las condiciones que proporcionaban las mejores condiciones de extracción, se procedió a optimizar la etapa de limpieza de los extractos con el fin de reducir, en la medida de lo posible, la presencia de los interferentes de la matriz (fundamentalmente el almidón). El carácter ligeramente polar de este polisacárido favorece su coextracción con las aflatoxinas empleando disolventes polares y, en menor medida, disolventes apolares. Por otra parte, el almidón una vez extraído no puede eliminarse por centrifugación ni por filtración (puede atravesar filtros de tamaño de poro de hasta 0.22 µm de diámetro) y además se retiene de manera inespecífica en los cartuchos de SPE. Por otro lado, los tratamientos de hidrólisis ácida y enzimática empleados para la degradación del almidón pueden provocar la degradación de las aflatoxinas y contribuyen a incrementar la complejidad de los extractos (especialmente por adición de enzimas).

Por todo lo expuesto, para la eliminación de interferencias se probaron, en primer lugar, filtros de distinta naturaleza y tamaño de poro. Para ello se empleó una disolución patrón de AFB1 preparada tanto en agua como en MeOH. Se emplearon dos filtros, uno formado por GMF/A, con un tamaño de poro de 1.6 µm, y otro por formado por PVDF,

con un tamaño de poro de 0.22 μm . Estos filtros se seleccionaron en base a su elevado uso en el análisis de aflatoxinas. La recuperación de la AFB1 en MeOH fue del 100% tras su paso por ambos filtros, mientras que la recuperación en disolución acuosa fue del 98% en GMF/A y del 92% en PVDF, con desviaciones estándar inferiores al 3% en todos los casos. A pesar de los elevados valores de recuperación proporcionados por ambos tipos de filtros, se seleccionó el filtro de PVDF debido a su menor tamaño de poro (que posibilita la retención de interferentes de matriz de tamaños menores), y por su mayor facilidad de uso (el filtro de PVDF se puede utilizar de manera directa mediante inyección de la muestra con jeringa, mientras que el filtro de GMF/A empleado requiere de filtración a vacío con placa porosa y kitasato). Sin embargo, para la limpieza de los extractos se seleccionó la metodología SPE empleando tanto sorbentes de naturaleza polimérica como inmunosorbentes. Se evaluaron rellenos poliméricos de distinta composición: fase polimérica no polar como el Extrabond EBH y de polaridad mixta como el Extrabond EB2 (Scharlab), así como polímeros de intercambio catiónico como el MCX (Waters) y aniónico como el MAX (Waters) y el EAX (Scharlab). Todos estos cartuchos contienen un sorbente basado en el estirenodivinilbenceno, un polímero de carácter apolar modificado con pirrolidona para aumentar su polaridad basal (lo que le confiere una polaridad de carácter mixto). Esta estructura basal también se complementa con urea en el cartucho EB2 (dotándolo de una mayor polaridad), o con grupos de carga positiva o negativa en los cartuchos de intercambio iónico (como la dimetilbutilamina en el MAX y el EAX o el sulfito en el MCX). Para evaluar la eficiencia de retención se empleó una disolución acuosa de la AFB1. La elución de la aflatoxina retenida en el cartucho SPE se llevó a cabo con ACN. Posteriormente, el eluato obtenido se evaporó y resuspendió en agua pura para su análisis por cHPLC-DAD/MS. Los valores de recuperación para cada uno de los sorbentes poliméricos evaluados fueron los siguientes: MAX (99%), MCX (84%), EBH (79%), EB2 (72%) y EAX (69%), con una desviación estándar inferior al 4% en todos los casos. A pesar de que en algunos de los casos se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para la AFB1, uno de los problemas de este tipo de sorbentes es su inespecificidad en relación con el tipo de aflatoxina. Por ello, y con el objeto de mejorar la selectividad del proceso, se probaron sorbentes de inmunoafinidad (IAC), en concreto el proporcionado por la marca LCtech GmbH. Durante esta prueba se evaluaron las cuatro aflatoxinas de manera simultánea para confirmar que la selectividad del anticuerpo de la IAC no se veía afectada por el tipo de aflatoxina y se utilizó la técnica HPLC-MS/MS. En este caso, la IAC proporcionó los siguientes valores de recuperación

para las cuatro aflatoxinas: 86% (AFB1); 90% (AFB2); 87% (AFG1); 92% (AFG2), con desviaciones estándar inferiores al 11% en todos los casos. Los valores de recuperación se obtuvieron a partir de extractos de arroz previamente fortificados con las cuatro aflatoxinas, con el fin de considerar el efecto de las interferencias de la matriz. Las recuperaciones obtenidas fueron similares e incluso superiores a las obtenidas a partir de los cartuchos SPE poliméricos estudiados, por lo que los inmunosorbentes fueron seleccionados para los posteriores estudios.

No obstante, la elección de las IAC como método de limpieza de los extractos implica llevar a cabo una reformulación de la composición del extractante empleado en la etapa previa. Partiendo de la premisa de que los anticuerpos presentes en la IAC son altamente susceptibles a la desnaturalización causada por disolventes orgánicos, la concentración de disolvente orgánico debe reducirse tanto como sea posible con el fin de asegurar la integridad del anticuerpo durante la carga del cartucho, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se evaluaron dos procedimientos para reducir la concentración de disolvente orgánico: la evaporación parcial del disolvente de extracción, o bien la dilución del extracto con agua hasta una concentración de disolvente que no provoque la desnaturalización del anticuerpo de la IAC. Se descartó la evaporación porque requeriría la adición previa de sales QuEChERS para separar ambas fases (lo cual había quedado anteriormente demostrado que empeoraba la recuperación de la AFB1) y un elevado tiempo de evaporación (volumen de extractante de 80 mL aproximadamente). Por otra parte, la dilución del extracto (100 mL) supondría el paso por la IAC de un volumen excesivo para este tipo de sorbentes. Finalmente, se optó por tomar una alícuota de 7 mL del extracto y diluirla en 43 mL de PBS para así reducir el contenido orgánico inicial desde un 80% hasta un 13%, tal y como recomienda el fabricante de la IAC. Es bien sabido que el poder desnaturalizante varía en función de la naturaleza del disolvente orgánico, siendo algunos como el ACN o la acetona más agresivos que el MeOH y el EtOH. Por tanto, se comparó la eficacia de retención de la AFB1 en la IAC a partir de extractos diluidos tanto en un 13% de MeOH como en un 13% de ACN. Estos extractos fueron diluidos tras aplicar ACN y MeOH al 80% como disolventes para la extracción de la AFB1 a partir de arroz fortificado. La recuperación de la AFB1 fue del $(86 \pm 1)\%$ en presencia de MeOH y del $(65 \pm 34)\%$ en presencia de ACN, lo que confirma que el ACN, a pesar de su mayor poder extractante, interfiere con la capacidad de retención de la IAC, proporcionando resultados poco reproducibles. Por el contrario, el MeOH sí es

compatible con la IAC y permite una mayor recuperación de AFB1, a pesar de proporcionar una menor eficiencia de extracción que el ACN. Para concluir la optimización del método, se comparó la eficiencia de diferentes disolventes para la resuspensión final de la AFB1 a partir de los extractos de MeOH eluidos y evaporados. Para ello, la AFB1 pura fue evaporada y resuspendida en agua pura y en disoluciones acuosas que contienen ACN o MeOH al 10%, 20% y 30%. Mientras que la recuperación de la AFB1 fue del 100% al reconstituirla con agua, los valores de recuperación con disoluciones acuosas de ACN y MeOH a distintos porcentajes fueron los siguientes: 64%, 57%, 61% (ACN al 10%, 20% y 30%, respectivamente), y 80%, 73%, 61% (MeOH al 10%, 20% y 30%, respectivamente), en todos los casos con un rango de desviación inferior al 4%. Por tanto, las muestras finales se resuspendieron en 0.1 mL de agua pura con el objetivo de preconcentrar los analitos tanto como fuera posible. En resumen, la metodología analítica optimizada para la determinación de aflatoxinas en las muestras de arroz consistió en el empleo de 100 mL de MeOH:H₂O (80:20, v/v) como extractante, seguido de diferentes etapas de centrifugación, filtración mediante PVDF, dilución de una alícuota de 7 mL del filtrado con tampón fosfato salino (PBS), carga y retención de las aflatoxinas en los anticuerpos de la IAC, y elución de las aflatoxinas retenidas con 2 mL de MeOH. Los eluatos obtenidos fueron posteriormente evaporados y resuspendidos en agua para su posterior análisis

Para la validación del método y el análisis de las muestras se empleó la técnica HPLC-MS/MS. El análisis por HPLC-MS/MS proporcionó una buena separación de las aflatoxinas con los siguientes tiempos de retención: AFG2 (5.06 min), AFG1 (5.26 min), AFB2 (5.31 min) y AFB1 (5.49 min). La metodología analítica desarrollada fue validada en términos de exactitud y precisión (repetibilidad) mediante estudios de recuperación de las aflatoxinas a partir de arroz fortificado a un nivel de concentración de 1.5 µg/kg con cada aflatoxina. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del 86% para la AFB1, del 90% para la AFB2, del 87% para la AFG1 y del 92% para la AFG2, con un rango de desviación estándar intra-réplica entre el 5%-11% en todos los casos. Las recuperaciones obtenidas superan el valor mínimo de recuperación establecido al 70% por el Reglamento Europeo 401/2006 para la validación de metodologías para el análisis de micotoxinas en alimentos fortificados en un intervalo de concentración entre 1-10 µg/kg. El método presenta un intervalo lineal entre 1-25 µg/L y un coeficiente de correlación cuadrático superior a 0.999 para todas las aflatoxinas, empleando un calibrado en matriz efectuado

a partir de extractos de arroz purificados y fortificados con las aflatoxinas previo a su análisis. Por otra parte, se calcularon los LOD y LOQ del procedimiento (empleando HPLC-MS/MS) a partir del punto más bajo del calibrado preparado en la matriz de la muestra con una relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente. Los LOD obtenidos oscilaron en un rango entre 0.09-0.32 µg/kg y los LOQ en un rango entre 0.31-1.06 µg/kg para todas las aflatoxinas, inferiores en todos los casos a los límites máximos establecidos por el Reglamento Europeo 915/2023 para la AFB1 y para la suma de todas las aflatoxinas B y G en cereales como el arroz.

El método optimizado y validado se empleó para el análisis de un conjunto de nueve muestras diferentes de arroz adquiridas en supermercados de Madrid. A la hora de seleccionar las muestras se incluyeron arroces de diferentes marcas comerciales, de diferentes variedades (redondo, largo, basmati y Thai), orígenes (España, Italia, Pakistán, India y Tailandia), así como obtenidos a partir de diferentes técnicas de cultivo (sometidos a fitosanitarios y ecológicos) y sometidos a diferentes tratamientos de procesado (descascarillados e integrales). El objetivo de esta selección fue el análisis de un conjunto de muestras lo más representativa posible de las tendencias de consumo actuales. De las nueve muestras totales que se analizaron, dos de ellas resultaron positivas por contaminación con AFB1. En ambos casos se trataba de arroces basmati originarios de Pakistán y de la misma marca comercial y lote, lo que podría suponer un factor de riesgo específico en los arroces de dicha marca comercial con estas características. La AFB1 fue cuantificada en ambas muestras a concentraciones de (1.62 ± 0.08) µg/kg y de (0.77 ± 0.03) µg/kg, respectivamente. En ambos casos se encontraba a niveles inferiores al límite máximo tolerado de 2 µg/kg para la AFB1 en cereales por el Reglamento Europeo 915/2023 vigente. Por tanto, las muestras analizadas en este estudio cumplen con la legislación vigente.

Aunque las muestras positivas no exceden los límites legales, la mera presencia de la AFB1 en hasta dos muestras de arroz procedentes de una selección tan reducida se podría considerar como un riesgo relevante para la salud del consumidor, dado que es una de las micotoxinas más tóxicas. No obstante, el nivel real de exposición a la aflatoxina dependerá en última instancia de su bioaccesibilidad y de su absorción intestinal, puesto que la fracción que realmente ejerce la toxicidad sobre el organismo es la que ha sido extraída del alimento (fracción bioaccesible) y absorbida por el epitelio intestinal (fracción biodisponible). La fracción bioaccesible depende en gran medida del tipo de

interacciones químicas establecidas previamente entre la aflatoxina y la composición nutricional del arroz, así como de la capacidad de los diferentes fluidos digestivos (salivar, gástrico, sales biliares y pancreáticas) para romper estas interacciones y solubilizar la aflatoxina. Además, algunas propiedades de estos fluidos también pueden provocar la modificación estructural de la aflatoxina original e incluso degradarla como, por ejemplo, el pH fuertemente ácido aplicado durante la digestión estomacal.

También se debe tener en cuenta que el arroz no se ingiere crudo, sino que debe cocinarse. El cocinado puede alterar la concentración inicial de aflatoxina en el arroz, incluso provocar una detoxificación parcial. Este potencial efecto detoxificante dependerá del tipo de cocinado aplicado sobre el arroz (generalmente con agua a aproximadamente 100 °C). Aunque el efecto detoxificante de la cocción es altamente variable en función de la temperatura, tiempo y presencia de ingredientes adicionales, está demostrado que la termoestabilidad estructural de las aflatoxinas puede verse reducida en presencia de agua, ya que, aunque es un disolvente con una baja afinidad por este tipo de micotoxinas, puede favorecer reacciones químicas de hidrólisis e hidroxilación sobre las aflatoxinas en presencia de calor.

Teniendo en cuenta todo esto se procedió a evaluar el efecto detoxificante de un tratamiento por cocción a 100 °C durante 12 min, así como la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 presentes en el arroz cocinado tras la aplicación de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Ambos estudios se realizaron en dos tipos de arroces (blanco e integral), que se diferencian entre sí según la eliminación o mantenimiento de la capa externa de salvado del arroz durante su procesado, respectivamente. Tras comprobar la ausencia de aflatoxinas en ambos tipos de arroz con el método de análisis anteriormente optimizado, se procedió a fortificarlos con los cuatro tipos de aflatoxinas a concentraciones de 5 µg/kg y de 10 µg/kg para el ensayo de cocinado, y a 10 µg/kg y de 20 µg/kg para el ensayo de digestión *in vitro*; en todos los casos los niveles ensayados eran superiores a los permitidos por la legislación. Los niveles de aflatoxinas empleados para la fortificación fueron mayores en la simulación digestiva para así compensar los elevados factores de dilución y la presencia de interferentes debido a la adición de reactivos que simulan los fluidos digestivos. No se emplearon los arroces basmati positivos en AFB1 detectados en el trabajo anterior debido a la ausencia del resto de aflatoxinas en estos arroces, así como los bajos niveles de la AFB1, que imposibilitarían la detección final de la micotoxina tras la aplicación del cocinado y de

los fluidos digestivos. La inclusión de un arroz integral se consideró fundamental para comparar los efectos del cocinado y de la digestión en función de las diferencias nutricionales entre arroz blanco e integral.

Tras el cocinado, se analizaron las aflatoxinas tanto en el arroz cocinado como en el agua de cocción. Para ello las aflatoxinas fueron extraídas, purificadas y concentradas a partir de cada fracción para su posterior análisis por HPLC-MS/MS, aplicando diferentes metodologías previamente optimizadas. Los experimentos se realizaron por triplicado y las desviaciones estándar obtenidas fueron inferiores al 8% para todos los datos obtenidos. El arroz experimentó una disminución importante del contenido inicial de aflatoxinas tras el cocinado, entre el 45%-63% en el arroz blanco fortificado, y entre el 49%-83% en el arroz integral fortificado. En el caso del arroz blanco, esta reducción del contenido de aflatoxinas en el arroz fue ligeramente superior para aflatoxinas G1 y G2 (37% y 39% del contenido inicial recuperado en el arroz, respectivamente) que para las aflatoxinas B1 y B2 (55% y 47% del contenido inicial recuperado, respectivamente). Mientras que, en el caso del arroz integral, la reducción del contenido de aflatoxinas presentes en el arroz tras el cocinado fue inferior en el caso de la AFB1 (51% recuperada) con respecto a las restantes B2, G1 y G2 (31%, 29% y 17% recuperadas, respectivamente).

El análisis de aflatoxinas en el agua de cocción confirmó la capacidad del agua caliente como disolvente capaz de extraer entre el 25%-38% de las aflatoxinas inicialmente presentes en el arroz blanco y entre el 36%-56% sobre las aflatoxinas del arroz integral. Estos resultados muestran una mayor capacidad de extracción del agua de cocción sobre las aflatoxinas presentes en el arroz integral con respecto al arroz blanco, lo que podría deberse a que las interacciones establecidas entre las aflatoxinas y el arroz integral son de naturaleza más débil que las establecidas con el arroz blanco. La mayor capacidad de extracción del agua de cocción sobre las aflatoxinas del arroz integral coincide además con la mayor reducción aflatoxigénica provocada por el tratamiento de cocinado sobre este tipo de arroz. En cuanto a las diferencias entre aflatoxinas, la capacidad de extracción del agua de cocción fue similar entre las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en el arroz blanco (30%, 38%, 25% y 29%, respectivamente), y algo menos uniforme en el arroz integral (49%, 56%, 36% y 40%, respectivamente).

Cuando se realiza el balance de masas se detecta una cantidad de aflatoxinas que no aparecen ni en el arroz cocinado ni en el agua de cocción. Este porcentaje de aflatoxinas no detectadas fue mayor para las aflatoxinas G1 y G2 en ambos tipos de arroz blanco (38% y 32%, respectivamente) e integral (35% y 43%, respectivamente) que para las aflatoxinas B1 y B2 (15% en arroz blanco para ambas, así como 13% para la AFB2 y sin pérdidas para la AFB1 en el integral). La causa de la desaparición de estas fracciones de aflatoxina podría explicarse, o bien por una modificación de la estructura química original de la aflatoxina, o bien por una completa degradación de la aflatoxina propiciada por la combinación de la temperatura y el agua. Para confirmar que el tratamiento térmico era la única causa de que desapareciesen estas fracciones, el tratamiento de cocinado se aplicó de nuevo en las mismas condiciones sobre disoluciones patrón para cada tipo de aflatoxina previamente diluidas en el agua de cocción en ausencia de arroz. Las medidas se realizaron con un HPLC-MS/QTOF en modo barrido (*scanning*) en un rango m/z de 100-1200. Se compararon los espectros de las disoluciones patrón de las aflatoxinas sin tratar con los espectros de las disoluciones patrón tras aplicar el tratamiento de cocción (100 °C, 12 minutos) y no se observó ningún pico adicional, por tanto, la ausencia de nuevos fragmentos nos permitió confirmar que el tratamiento de cocción no tuvo ningún efecto en la formación de nuevas especies como consecuencia de la degradación de las aflatoxinas G. En este caso, las recuperaciones obtenidas en el agua de cocción tras el tratamiento fueron las siguientes (asumiendo que el 100% de la aflatoxina inicial se aplicó directamente en esta fase): (102 ± 6)% para la AFB1, (101 ± 3)% para la AFB2, (67 ± 1)% para la AFG1 y (65 ± 3)% para la AFG2. No se observaron diferencias apreciables entre el tratamiento aplicado a las cuatro aflatoxinas solas o combinadas. Estos resultados confirman la degradación que el tratamiento térmico de cocinado provoca sobre las aflatoxinas G1 y G2, cuyas pérdidas del 33% y del 35% coinciden con las pérdidas observadas para las mismas aflatoxinas en ambos tipos de arroz, mientras que no ejerce efecto alguno sobre las aflatoxinas B1 y B2.

Por tanto, los resultados obtenidos tras el tratamiento de cocción del arroz a 100 °C confirman la elevada capacidad detoxificante de este cocinado para reducir el contenido en aflatoxinas en más de la mitad de su contenido inicial, la reducción de la termoestabilidad de las aflatoxinas G1 y G2 en presencia de agua, la capacidad extractiva del agua de cocción y, finalmente, la mayor eficacia de detoxificación del cocinado sobre arroz integral con respecto al blanco.

La determinación de la bioaccesibilidad de las aflatoxinas mediante la aplicación de un procedimiento de simulación digestiva *in vitro* se realizó en cada tipo de arroz (blanco e integral) previamente cocinado mediante el método anteriormente evaluado. En este caso la fortificación del arroz se efectuó después de cocinarlo para evitar cualquier tipo de pérdida o transformación adicional de las aflatoxinas previa a la aplicación del modelo digestivo. La simulación digestiva se efectuó aplicando tres etapas consecutivas (salivar, gástrica y duodenal) y los extractos obtenidos tras cada etapa se purificaron y se analizaron por triplicado para hallar el porcentaje de bioaccesibilidad en cada una de las etapas con respecto a la cantidad de aflatoxina presente inicialmente en el arroz. Las desviaciones estándar obtenidas entre réplicas fueron inferiores al 8% en todos los casos, demostrando la repetibilidad del ensayo.

Los resultados de la simulación digestiva evidenciaron una elevada bioaccesibilidad final para las aflatoxinas presentes en el arroz blanco, con un comportamiento similar para las cuatro aflatoxinas con relación a los porcentajes de aflatoxina solubilizados a lo largo de las etapas salivar, gástrica y duodenal: AFB1 (16%, 38% y 60%, respectivamente); AFB2 (26%, 53% y 83%, respectivamente); AFG1 (22%, 43% y 60%, respectivamente); y AFG2 (33%, 56% y 75%, respectivamente). Por el contrario, la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas a partir del arroz integral resultó inferior, mientras que en este caso las diferencias de bioaccesibilidad entre diferentes aflatoxinas fueron superiores y destacó la disminución de concentración de aflatoxina liberada en la etapa gástrica en comparación con la etapa salivar inicial. A continuación, se detallan los porcentajes de bioaccesibilidad obtenidos para cada aflatoxina a partir del arroz integral tras cada etapa digestiva: AFB1 (18%, 15% y 36%, respectivamente); AFB2 (46%, 29% y 47%, respectivamente); AFG1 (30%, 16% y 60%, respectivamente) y AFG2 (33%, 56% y 75%, respectivamente).

La interpretación de los resultados obtenidos mediante un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial confirmó que todos los factores involucrados en el ensayo (tipo de aflatoxina, nivel de contaminación, tipo de arroz y etapa digestiva) ejercían una influencia estadísticamente significativa sobre la varianza de los datos obtenidos (p -valores <0.05 a un nivel de confianza del 95%), así como diferencias estadísticamente significativas entre todos los factores. También se observaron diferencias significativas entre distintos grupos pertenecientes a cada factor. En concreto, entre ambos tipos de arroz, entre los dos niveles de contaminación, entre las etapas digestivas salivar, gástrica

y duodenal y entre las aflatoxinas de tipo 1 y las de tipo 2, no así entre las B y las G (únicos grupos homogéneos). Las diferencias entre grupos fueron confirmadas también mediante una prueba LSD Fisher.

La aplicación de un análisis de componentes principales (PCA) permitió interpretar la variabilidad de los datos promedio del nivel superior de contaminación en base a las diferentes etapas digestivas (salivar, gástrica y duodenal), evaluadas con respecto a dos componentes finales cuya combinación explicaría hasta el 98% de la variabilidad (un 65% por el componente 1 y un 33% por el componente 2). Los resultados de este análisis demostraron que las etapas gástrica y duodenal tenían una mayor influencia sobre la bioaccesibilidad de las aflatoxinas durante la simulación digestiva (gran influencia sobre el componente 1), mientras que la etapa salivar tuvo una baja influencia sobre la bioaccesibilidad (gran influencia sobre el componente 2). La representación bigráfica también demostró que la bioaccesibilidad de todas las aflatoxinas presentes en el arroz blanco se hallaba influenciada fundamentalmente por las etapas gástrica y duodenal, mientras que la bioaccesibilidad de las aflatoxinas del arroz integral lo estaba mayoritariamente por la etapa salivar (particularmente las aflatoxinas B2 y G2).

La bioaccesibilidad final claramente inferior de las aflatoxinas presentes en el arroz integral en comparación al arroz blanco podría deberse a la importante reducción de su bioaccesibilidad durante la etapa gástrica. El hecho de que la aflatoxina extraída hacia la fracción soluble digestiva durante la etapa salivar se vea reducida tras la incubación gástrica implica que la estructura original de las aflatoxinas se ha visto alterada e incluso degradada, circunstancia que podría ser causada por el bajo pH aplicado sobre las aflatoxinas durante esta etapa digestiva. En consecuencia, la bioaccesibilidad inicial lograda tras la etapa salivar (superior incluso a la obtenida a partir del arroz blanco en esta misma etapa) se vería reducida durante la etapa gástrica y, a pesar de aumentar de nuevo tras la etapa duodenal, la pérdida de aflatoxina original causada durante la etapa gástrica reducirá la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas del arroz integral con respecto al blanco. El hecho de que solamente se reduzca la bioaccesibilidad gástrica a partir del arroz integral puede deberse a las diferencias en composición entre ambos arroces, lo que favorece la alteración estructural de las aflatoxinas solamente a partir del arroz integral. Una posible hipótesis para explicar esta diferencia de comportamiento podría basarse en el hecho de que la composición superficial del arroz blanco (mayoritariamente almidón, un alfa-polisacárido altamente ramificado con capacidad adsorbente) podría ejercer un

efecto adsorbente sobre las aflatoxinas, limitando así su contacto directo con el medio de la etapa gástrica de pH ácido, lo que las protegería de la degradación mediante una liberación más progresiva que limitase su contacto prolongado con el pH gástrico. Sin embargo, la composición estructural superficial del arroz integral (recubierto por una capa de salvado que se compone fundamentalmente de celulosa, un beta-polisacárido más lineal y, por tanto, con menor capacidad adsorbente) podría adsorber en menor grado las aflatoxinas, que serían más rápidamente extraídas por los fluidos digestivos y, por tanto, más susceptibles a la acción del pH ácido estomacal. Por tanto, la inferior retención de las aflatoxinas sobre la superficie del arroz integral aumentaría su exposición al bajo pH gástrico, explicando la modificación de su estructura original tras la digestión gástrica del arroz integral. Sin embargo, en cualquier caso, esta hipótesis debe ser explorada y confirmada mediante estudios adicionales para determinar la naturaleza específica de las interacciones establecidas entre las aflatoxinas, el almidón y la celulosa.

En conclusión, la simulación digestiva *in vitro* de las aflatoxinas demostró importantes diferencias entre la bioaccesibilidad de las aflatoxinas según la composición del arroz blanco y el integral, con una elevada bioaccesibilidad a partir del arroz blanco, lo cual supone una mayor disponibilidad gastrointestinal de las aflatoxinas presentes en arroces de este tipo (superior al 60%). Este hecho pone en valor aún más si cabe el efecto del cocinado por cocción para reducir los niveles de aflatoxinas previo a su ingestión. Finalmente, la reducción de la bioaccesibilidad observada a partir del arroz integral también demostró el potencial detoxificante que podría ejercer el pH ácido estomacal sobre las aflatoxinas ingeridas.

Los resultados obtenidos permiten establecer una aproximación hacia la exposición a aflatoxinas presentes en el arroz (uno de los cereales más importantes en la dieta global), mediante un doble enfoque: análisis de estas micotoxinas en arroces comerciales y estimación *in vitro* de su bioaccesibilidad digestiva. La detección de aflatoxinas en varias muestras comerciales, unido a su elevada bioaccesibilidad en este cereal ponen de manifiesto el potencial riesgo que la presencia de estas toxinas en el arroz supone para la salud humana., Hay que tener en cuenta que el arroz no solamente está en la base de la pirámide alimenticia, sino que también se utiliza ampliamente como materia prima para la fabricación de una amplia variedad de alimentos derivados.

Durante los últimos años se ha asistido a un importante auge del desarrollo de nuevos tipos de alimentos a base de cereales y vegetales con diferentes características a niveles nutricional y organoléptico. Estos alimentos han surgido como una alternativa de consumo altamente demandada por aquellos consumidores que, o bien no pueden tomar ciertos alimentos de origen animal por cuestiones de salud (alergias, intolerancias alimentarias, hipercolesterolemia, etc.), o bien no quieren consumir ningún tipo de alimento que provenga de origen animal (veganismo). Por otra parte, los alimentos basados en cereales y vegetales constituyen un importante factor para el futuro de una alimentación saludable y sostenible. Uno de los alimentos con mayor aceptación entre los consumidores son las bebidas vegetales. Se trata de bebidas de base acuosa obtenidas a partir de la maceración de diferentes materias primas de origen vegetal en agua previamente trituradas para facilitar la extracción de sus nutrientes (carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y minerales fundamentalmente) y de su flavor. El extracto acuoso obtenido se enriquece posteriormente con nutrientes adicionales y otros aditivos naturales y químicos para mejorar su sabor y homogeneizar su textura. El éxito comercial de este tipo de bebidas ha impulsado el desarrollo de diferentes variantes derivadas de cereales (arroz, avena, trigo, etc.), de semillas oleaginosas (soja, cacahuete) y de frutos secos (almendra, nuez, avellana...). Todas estas materias primas de origen vegetal son altamente susceptibles a la contaminación aflatoxigénica. Además, desde una perspectiva legal, la presencia de micotoxinas en estos nuevos productos carece de una regulación propia mediante el establecimiento de límites específicos y concisos como los que regulan las materias primas. Por tanto, los factores de riesgo anteriormente descritos justifican el desarrollo de estudios que permitan el control de la presencia de aflatoxinas en este tipo de alimentos de origen vegetal.

En este sentido, se evaluó la presencia de aflatoxinas a partir de muestras comerciales de bebidas vegetales. Se seleccionaron las bebidas de arroz, avena, almendra y soja, por tratarse de las más consumidas. El estudio se focalizó en la optimización de una metodología analítica única que pudiera aplicarse a todas las bebidas seleccionadas, y que permitiera además la extracción y posterior limpieza de los extractos para la determinación simultánea de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 por HPLC-MS/MS. Esto supone un reto analítico si se consideran las importantes diferencias nutricionales entre estas bebidas. Mientras que las bebidas de arroz y de avena tienen un elevado contenido en carbohidratos (93-110 g/L), las bebidas de almendra y de soja tienen un contenido

superior en grasas (10-22 g/L) y la bebida de soja tiene un contenido proteico muy superior al del resto de bebidas (35 g/L). Además, la composición nutricional puede variar ligeramente entre bebidas vegetales del mismo tipo según el método de elaboración empleado por cada fabricante.

Para el desarrollo de esta nueva metodología se tomó como punto de partida el protocolo optimizado anteriormente para la extracción y limpieza de los extractos de aflatoxinas en arroces, que se adaptó a las leches vegetales considerando también otras metodologías recogidas en la bibliografía. Partiendo de esta información, se seleccionó un volumen inicial de leche vegetal de 20 mL que se fortificó con las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 a un nivel de concentración de 2.5 µg/kg y se incubó en agitación durante 30 min. Para la extracción de las aflatoxinas a partir de las muestras enriquecidas se emplearon 10 mL de MeOH y la mezcla se incubó bajo agitación orbital durante 30 min (el MeOH se seleccionó en previsión del uso posterior de IAC). La disolución resultante se centrifugó, se tomó una alícuota de 15 mL que se diluyó con agua pura (para reducir el MeOH inicial al 10%) y se ajustó el pH a 7, en caso de ser necesario. Posteriormente se pasó por el cartucho de SPE una alícuota de 25 mL del extracto diluido, y las aflatoxinas se eluyeron con MeOH. Los extractos resultantes se evaporaron y reconstituyeron en las mismas condiciones del protocolo optimizado para arroces.

Una vez establecidas estas condiciones iniciales, se procedió a optimizar la purificación de los extractos empleando SPE. Para ello se emplearon muestras de bebida vegetal de arroz. Se compararon distintos tipos de cartuchos de SPE: C-18 (N-octadecilo, Scharlab), HLB (poliestireno-divinilbenceno sustituido con pirrolidona, Waters), EB2 (poliestireno-divinilbenceno sustituido sustituido con pirrolidona y urea, Scharlab) e IAC (inmunosorbente, LCtech), en los cuáles se cargaron volúmenes de 25 mL y 50 mL de extractos previamente preparados como se describió anteriormente. La aplicación de 25 mL de extracto proporcionó mejores recuperaciones que el empleo de 50 mL, debido esto último a una mayor presencia de interferentes. El intervalo de valores de recuperación obtenido para cada una de las aflatoxinas a partir de 25 mL de extracto para los distintos sorbentes fue el siguiente: C-18 (87%-94%); EB2 (107%-112%); HLB (108%-118%); e IAC (34%-65%). A pesar de las buenas recuperaciones obtenidas para los cartuchos C-18, EB2 y HLB, las desviaciones estándar fueron elevadas en todos los casos (7%-21%), lo que se atribuyó al exceso de grasas presentes en los extractos. Por este motivo, se realizó una prueba previa de desgrasado de los extractos sometiendo el extracto a una

extracción líquido-líquido con 12.5 mL de hexano. Sin embargo, la reducción de la materia grasa del extracto no mejoró la repetibilidad de ninguno de los cartuchos, con la excepción del HLB (cuya desviación se redujo por debajo del 4%), y también se mejoró la recuperación final de las aflatoxinas (98%-106%) empleando este cartucho. Por tanto, el cartucho HLB fue seleccionado como la mejor opción para la purificación de los extractos previamente desgrasados. Esta diferencia de resultados entre el cartucho HLB y los cartuchos C-18 / EB2 podría estar ligada a la polaridad intermedia del cartucho HLB con respecto a la interacción apolar establecida por el cartucho C-18 y a la polaridad superior del EB2 (derivada de la presencia adicional de urea). Para concluir la optimización de la metodología, también se comprobó que el hexano no tuviese ninguna capacidad de extraer las aflatoxinas y que el volumen de agua empleado para el lavado del cartucho HLB no impidiera la retención de las aflatoxinas (al contrario, se demostró que el lavado del cartucho cargado con 20 mL de agua era imprescindible para eliminar impurezas remanentes de carácter polar).

La metodología final fue validada en términos de exactitud (recuperación del analito) y de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) en bebidas de arroz, avena, almendra y soja. Para este propósito, la metodología optimizada se aplicó sobre muestras de cada tipo de bebida previamente enriquecidas con cada aflatoxina a un nivel de concentración de 2.5 µg/kg, en ensayos realizados por triplicado en dos días diferentes. La exactitud se evaluó mediante el cálculo de la recuperación de cada aflatoxina tras la aplicación de la metodología desarrollada. Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada aflatoxina a partir de cada tipo de bebida (arroz, avena, almendra y soja) fueron los siguientes: AFB1 (85%, 82%, 87% y 86%); AFB2 (98%, 79%, 96% y 83%); AFG1 (83%, 73%, 84% y 80%); y AFG2 (93%, 46%, 90% y 74%). Las recuperaciones obtenidas superan el valor mínimo del 70% necesario para que la metodología sea apta según lo establecido en el Reglamento Europeo 401/2006, salvo para la AFG2 en la bebida de avena (<50% de recuperación). Esta micotoxina fue la única que proporcionó bajos valores de recuperación en la bebida de avena debido a alguna interacción entre algún componente nutricional específico de esta bebida y esta aflatoxina. Para evaluar la precisión del método se calcularon las desviaciones estándar a niveles intra-réplica (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad). En todos los casos se obtuvo un intervalo de valores entre el 1%-8%.

De manera adicional, se evaluó el efecto de los potenciales interferentes presentes en los extractos limpios sobre la medida de HPLC-MS/MS. Para este propósito, se aplicó la metodología detallada con anterioridad a las muestras de leche vegetal, que en este caso se fortificaron justo antes del análisis por HPLC-MS/MS. La intensidad de la señal de cada aflatoxina se comparó con las proporcionadas por una disolución patrón que contenía una mezcla de aflatoxinas en la misma concentración final. En este caso, la señal analítica de las aflatoxinas se recuperó en diferentes proporciones según el tipo de bebida vegetal: 127%-137% (arroz); 42%-66% (avena); 72%-94% (almendra); y 46%-73% (soja). Como se puede apreciar, la composición nutricional específica de cada tipo de bebida tiene una gran influencia sobre la sensibilidad de la señal analítica detectada, con pérdidas notables de señal de los analitos a partir de las bebidas de avena y soja, que se reducen a partir de la bebida de almendra, mientras que las elevadas recuperaciones de aflatoxinas a partir de la bebida de arroz implicarían un posible efecto matriz por sobrecompensación de señal.

El método desarrollado presentó un intervalo lineal de 25-250 $\mu\text{g/L}$ (equivalente a un rango inicial de contaminación entre 0.5-5 $\mu\text{g/kg}$ en la bebida). Los LOD y LOQ, se calcularon a partir de la relación S/N (relación igual 3 para el LOD y de 10 para el LOQ), tanto del método de preparación como de la técnica analítica. En el primer caso se empleó una muestra de cada bebida fortificada con las aflatoxinas sobre la que se aplicó la metodología de extracción y limpieza, mientras que en el segundo caso se empleó una disolución patrón de las aflatoxinas. Los LOD del método oscilaron entre los siguientes rangos para cada aflatoxina (calculados sobre la concentración inicial de la aflatoxina en la bebida): AFB1 (10-26 ng/kg); AFB2 (4-28 ng/kg); AFG1 (5-39 ng/kg); AFG2 (11-21 ng/kg). A su vez, los rangos de LOQ para el método fueron los siguientes: AFB1 (32-88 ng/kg); AFB2 (14-93 ng/kg); AFG1 (16-131 ng/kg); AFG2 (37-71 ng/kg). En todos los casos estos valores se hallarían muy por debajo de los límites establecidos para la AFB1 y para la suma de las cuatro AFs en cereales (2000 y 4000 ng/kg), semillas oleaginosas (2000 y 4000 ng/kg), almendras (8000 y 10000 ng/kg) y sus derivados según el Reglamento Europeo 915/2023 de la Comisión Europea. Los LOD y LOQ de la técnica para cada aflatoxina pura fueron los siguientes: AFB1 (0.4 $\mu\text{g/L}$ y 1.35 $\mu\text{g/L}$); AFB2 (1.53 $\mu\text{g/L}$ y 5.09 $\mu\text{g/L}$); AFG1 (0.21 $\mu\text{g/L}$ y 0.69 $\mu\text{g/L}$); y AFG2 (0.56 $\mu\text{g/L}$ y 1.87 $\mu\text{g/L}$).

La metodología optimizada se empleó para determinar la presencia de aflatoxinas en un conjunto de muestras comerciales adquiridas en diferentes supermercados de

Madrid, con el fin de evaluar la exposición del consumidor a las aflatoxinas a través de estas bebidas. Para ello, se analizaron un total de 20 muestras, cinco muestras de cada tipo de bebida vegetal (arroz, avena, almendra y soja), procedentes cada una de ellas de cuatro marcas comerciales diferentes. Los extractos se analizaron mediante HPLC-MS/MS. Los resultados obtenidos confirmaron la ausencia de aflatoxinas en todas las muestras salvo en una muestra de bebida de soja, que resultó positiva en relación con las aflatoxinas B1, B2 y G1 a niveles detectables, pero no cuantificables. Teniendo en cuenta que los LOQ para estas aflatoxinas (36 ng/kg, 15 ng/kg y 16 ng/kg) se hallan muy por debajo de los límites establecidos por la legislación vigente para las materias primas que integran estas bebidas, se podría considerar que los niveles de aflatoxinas encontrados no incumplen los límites establecidos para aflatoxinas presentes en las materias primas de la bebida, de acuerdo con el Reglamento Europeo 915/2023.

Las bebidas vegetales son un alimento derivado de las materias primas cuyo contenido en aflatoxinas está regulado (cereal, semilla oleaginosa o fruto seco). Estos límites pueden aplicarse a productos derivados si dicha materia prima está presente al menos en un 80% o superior en la composición del producto final, lo que no se cumple en las bebidas vegetales (las bebidas a base de frutos secos suelen contener un 3-6%, y las de cereales y semillas entre un 5-20% como máximo del contenido final, según el fabricante). En este caso, el Reglamento Europeo 915/2023 no establece un contenido máximo de aflatoxinas específico para este tipo de bebidas. En su lugar la legislación se limita a marcar unos criterios para que sea la autoridad pertinente quien establezca el nivel aceptable de aflatoxinas para cada derivado específico, considerando para este propósito el grado de dilución y/o concentración de la materia prima inicial, su proporción final en el alimento elaborado, e incluso los LOQ de la técnica analítica empleado para establecer el límite final de presencia de aflatoxinas en el derivado en cuestión. Simultáneamente, esta legislación también prohíbe la mezcla o dilución de cualquier materia prima regulada que exceda los niveles máximos establecidos para que dicha materia prima cumpla con los límites legales de la aflatoxina, lo que implica que las materias primas iniciales empleadas para la elaboración de bebidas vegetales tampoco deben exceder los niveles máximos tolerables de aflatoxinas. Sin embargo, el nivel final de aflatoxina detectada en la bebida elaborada será, en cualquier caso, difícil de interpretar como aceptable o excesivo, dada la ambigüedad de los límites legales establecidos para la presencia de aflatoxinas en las bebidas vegetales.

Por otra parte, la presencia de aflatoxinas en una de las muestras analizadas, independientemente de su nivel de contaminación, confirma la exposición a estas toxinas a través de la ingesta de estos alimentos, actualmente muy demandados por los consumidores. Esta exposición implica un riesgo para la salud (especialmente la exposición a la AFB1) que dependerá en gran medida de la bioaccesibilidad gastrointestinal de las aflatoxinas a partir de cada tipo de bebida vegetal. Además, la complejidad nutricional de las bebidas vegetales podría tener una influencia decisiva sobre la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas. Por otra parte, al ser alimentos líquidos son ingeridos sin necesidad de cocinado, lo que puede afectar también a la bioaccesibilidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a evaluar la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 a partir de las bebidas vegetales, mediante la aplicación del mismo tipo de simulación digestiva que se empleó anteriormente para los arroces. Sin embargo, en este caso se decidió evaluar únicamente la bioaccesibilidad duodenal, al ser considerada como la de mayor relevancia para facilitar la absorción intestinal de las aflatoxinas, cuya absorción ocurre fundamentalmente en el primer tramo del intestino delgado. Para este ensayo se seleccionó una muestra de cada tipo de bebida vegetal (arroz, avena, almendra y soja), las cuales fueron fortificadas con una concentración conocida de aflatoxinas y se incubaron bajo agitación y oscuridad durante 1 hora para facilitar la interacción entre las toxinas y los componentes nutricionales de cada bebida. A continuación, se aplicó el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante la adición secuencial de los fluidos salivar, gástrico y duodenal. Los extractos duodenales finales fueron purificados y analizados por triplicado, con la finalidad de detectar y cuantificar únicamente la fracción de aflatoxina que se hallase en su forma original libre presente en la fracción líquida soluble, considerándose ésta como la única fracción susceptible de absorción intestinal, mientras que la fracción de la toxina que pudiera permanecer conjugada a cualquier componente de la bebida o de los fluidos digestivos no se tuvo en cuenta para el análisis. Por tanto, la fracción libre detectada finalmente como bioaccesible podría ser aquella fracción aflatoxigénica inicial presente de forma libre en la bebida, o conjugada inicialmente con los componentes de la bebida vegetal y posteriormente liberada en su forma original hacia el quimo mediante la acción química o enzimática de los fluidos digestivos.

Los resultados obtenidos evidenciaron grandes diferencias de bioaccesibilidad entre los diferentes tipos de aflatoxina. Sin embargo, entre las diferentes bebidas vegetales no se observaron diferencias tan notables, al contrario de lo que cabía esperar dadas las importantes diferencias de composición entre bebidas. A continuación, se muestran los porcentajes finales de bioaccesibilidad obtenidos para cada tipo de aflatoxina a partir de las diferentes bebidas (arroz, avena, almendra y soja): AFB1 (50%, 34%, 28%, 40%, respectivamente); AFB2 (85%, 82%, 92%, 86%, respectivamente); AFG1 (15%, 22%, 26%, 30%, respectivamente); y AFG2 (32%, 64%, 76%, 57%, respectivamente). Las desviaciones estándar entre réplicas no superaron el 8% en ningún caso, confirmando la repetibilidad del proceso. Los resultados fueron interpretados mediante un ANOVA multifactorial para establecer la contribución individual de los dos factores implicados en el tratamiento a la variabilidad de los resultados (es decir, el tipo de aflatoxina y el tipo de bebida vegetal). El ANOVA confirmó que ambos factores tenían una influencia significativa sobre la variabilidad de los resultados, y también se establecieron diferencias significativas entre ambos factores, así como entre todos los grupos pertenecientes a cada factor, aunque estas diferencias fuesen más evidentes entre las aflatoxinas que entre las bebidas vegetales. De manera más específica, se obtuvieron diferencias significativas entre todos los tipos de aflatoxinas, así como entre las bebidas de almendra/soja, almendra/arroz, y avena/arroz, mientras que se establecieron grupos homogéneos entre las bebidas de almendra/avena, avena/soja y soja/arroz. Estos resultados también se confirmaron mediante una prueba LSD Fisher.

Especialmente destacables fueron la elevada bioaccesibilidad de la AFB2 y los valores reducidos de la AFG1 (en ambos casos con una tendencia similar entre las diferentes bebidas), que contrastó con la disparidad de valores obtenidos para la AFB1 y la AFG2 entre las diferentes bebidas. Los resultados ponen de manifiesto que la composición nutricional de la bebida vegetal no afecta por igual a todas las aflatoxinas ensayadas. Esto contrasta con la homogeneidad de comportamiento entre aflatoxinas con relación a su bioaccesibilidad en las muestras de arroz. Todo ello pone de manifiesto el efecto conjunto del tipo de aflatoxina y matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad, y, por tanto, la necesidad de profundizar en la naturaleza específica de las interacciones establecidas entre las aflatoxinas y los diferentes componentes nutricionales de estos alimentos (fundamentalmente con proteínas, lípidos y carbohidratos, entre otros).

Una vez concluidos los respectivos estudios pertenecientes al bloque mayoritario de la Tesis Doctoral sobre la exposición humana a aflatoxinas (presencia alimentaria y bioaccesibilidad), se procedió a ampliar el conocimiento de la toxicidad de las aflatoxinas, en particular, de su potencial neurotoxicidad.

A pesar de que los estudios toxicológicos *in vivo* posibilitan una evaluación de la toxicidad aflatoxigénica más global a nivel de organismo que los estudios *in vitro* (limitados a un tejido o grupo celular específico), en la práctica, el desarrollo de estudios *in vivo* suele ser menos viable, dadas sus importantes limitaciones a nivel logístico (instalaciones especiales y personal cualificado), al aumento de los tiempos de ensayo, así como importantes dilemas éticos. Por estos motivos, los estudios *in vitro* suponen una alternativa de desarrollo rápida, simple, asequible y libre de implicaciones éticas para evaluar la toxicidad de las aflatoxinas. Los efectos tóxicos de las aflatoxinas que más se han estudiado a nivel *in vitro* se han centrado fundamentalmente a niveles hepático, intestinal e incluso renal, dada la exposición directa de estos tejidos a las aflatoxinas, en tanto que éstas penetran en el organismo por absorción intestinal, se metabolizan en el hígado y se excretan fundamentalmente a través de las sales biliares y de la orina. Además, el rol detoxificante que ejerce el tejido hepático sobre las aflatoxinas también se ha demostrado como la causa de la especial vulnerabilidad de este órgano a la carcinogenicidad de las aflatoxinas.

Sin embargo, el potencial neurotóxico de las aflatoxinas es poco conocido, pese a haberse demostrado su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y las membranas celulares, así como para generar ROS e intercalarse en proteínas y ácidos nucleicos. También se desconoce si estas micotoxinas pudieran tener algún tipo de influencia en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas comunes como el Alzheimer o el Parkinson, que se originan por la agregación de péptidos β amiloides ($A\beta$), entre otros muchos factores. En este sentido, aunque algunos estudios han demostrado la estimulación de la síntesis neuronal de péptidos $A\beta$ amiloides por parte de ciertas micotoxinas, nada se sabe aún sobre la capacidad de agregación directa que podrían tener las aflatoxinas sobre estos péptidos. Por estos motivos, en la presente Tesis Doctoral se desarrolló un estudio para evaluar dos aspectos diferentes de la neurotoxicidad *in vitro* ocasionada por las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, a las que fueron añadidas también la OTA y la STG: la capacidad de agregación del péptido $A\beta_{1-42}$ y la citotoxicidad celular sobre la línea celular indiferenciada de neuroblastoma humano SH-SY5Y. La OTA y la

STG se añadieron al estudio de la neurotoxicidad por diferentes motivos. En primer lugar, la OTA está considerada como una micotoxina de gran potencial neurotóxico (sus efectos neurológicos han sido estudiados y demostrados en mayor profundidad que los de las aflatoxinas) pese a sus diferencias estructurales con respecto a las aflatoxinas. Además, sus efectos neurotóxicos perduran durante más tiempo por su persistencia en el organismo y por su tendencia a bioacumularse en determinadas partes del encéfalo. En relación con la STG, ésta presenta una elevada similitud estructural con las aflatoxinas (lo que podría derivar en una respuesta neurotóxica similar a éstas), pero apenas se conoce su metabolismo y efectos tóxicos, y su presencia en alimentos aún no se halla regulada por la legislación vigente.

Una vez evaluada la capacidad de agregación del péptido A β ₁₋₄₂ y la citotoxicidad de las micotoxinas, se procedió a evaluar la posible mitigación o reducción de la neurotoxicidad inducida por cada tipo de micotoxina por la coexposición con los polifenoles curcumina y/o cafeína. Estas dos moléculas fueron seleccionadas por sus propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y, en el caso de la cafeína, por su facilidad para atravesar la BBB.

En primer lugar, se evaluó el efecto agregante *in vitro* que podrían ejercer estas micotoxinas sobre el fragmento 1-42 del péptido A β mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Para ello, el péptido A β ₁₋₄₂ (50 μ M) se incubó individualmente con las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, la OTA y la STG (3 μ M) a 37 °C en oscuridad y agitación orbital durante 48 h. Transcurrido el periodo de exposición las muestras se analizaron por TEM y se midió la anchura media (n=100) de las fibras generadas por la agregación del péptido tras la exposición con cada micotoxina. Los resultados obtenidos se compararon con la anchura media de las fibras del péptido sin agregar (control negativo de agregación), así como con la anchura media del péptido en condiciones de agregación inducida por Fe₂SO₄ a 50 μ M (control positivo de agregación). En principio, la anchura media del péptido A β sin agregar (control negativo) fue de (8.2 \pm 0.7) nm, mientras que la anchura media de las fibras en contacto con el Fe₂SO₄ agregante fue de (10.2 \pm 0.5) nm (la agregación aumenta en torno a 2 nm). Teniendo en cuenta estos resultados, así como la información cualitativa obtenida de la observación de las micrografías proporcionadas por TEM, las aflatoxinas B1 y G1, la OTA y la STG provocaron un incremento notable de la agregación del péptido A β , que fue superior en todos los casos a la agregación causada por el control positivo de Fe₂SO₄. El orden de agregación entre estas micotoxinas

fue el siguiente: AFB1 (15 ± 1 nm) > AFG1 (14 ± 1 nm) > STG (13.9 ± 0.9 nm) > OTA (11.5 ± 0.8 nm). Sin embargo, las aflatoxinas B2 y G2 no tuvieron ninguna capacidad de agregación sobre el péptido, con anchuras de fibra de (8.6 ± 0.8) nm y de (9 ± 1) nm, respectivamente. Las agregaciones producidas por las aflatoxinas B1, G1 y por la STG fueron muy elevadas en comparación con el péptido no agregado e incluso con el control positivo de agregación con el Fe₂SO₄ (6-7 nm con respecto al péptido sin agregar y 4-5 nm con respecto al péptido agregado por Fe₂SO₄), mientras que la agregación producida por la OTA fue ligeramente inferior (3.5 nm con respecto al péptido sin agregar y 1.5 nm con respecto al péptido agregado por Fe₂SO₄).

El análisis de estos datos mediante un ANOVA y mediante varias pruebas LSD Fisher (95% de significancia) confirmaron diferencias significativas observadas entre la anchura de las fibras del péptido sin agregar con respecto al de las fibras originadas tras la exposición a todas las micotoxinas salvo la AFB2, y también se establecieron diferencias significativas entre las fibras tratadas con todas las micotoxinas con respecto a las fibras del control tratado con Fe₂SO₄. La elevada capacidad de agregación del péptido A β ₁₋₄₂ causado por las aflatoxinas B1, G1 y la STG con respecto la OTA y a las aflatoxinas B2 y G2 podría estar relacionada con el elevado nivel de similitud estructural que comparten estas micotoxinas (derivadas de furanocumarina) con respecto a la OTA, mientras que las aflatoxinas B2 y G2, pese a su similitud estructural con las micotoxinas agregantes, carecen de insaturación en la posición 6,7, lo que podría justificar su nula capacidad de agregación sobre el péptido A β ₁₋₄₂. Una posible hipótesis para explicar la capacidad de agregación de estas micotoxinas podría ser su moderada polaridad (ligeramente superior a la de las aflatoxinas B2 y G2, y muy superior a la polaridad de la OTA). Este carácter ligeramente polar podría facilitar su interacción con ambas regiones polar y apolar del péptido A β ₁₋₄₂ (constituido por una región aminoacídica polar entre los aminoácidos 1-28 y por otra región apolar entre los aminoácidos 29-42), facilitando así la agregación del péptido mediante estructuras secundarias de tipo lámina beta.

Una vez confirmada la capacidad de agregación *in vitro* de las aflatoxinas B1 y G1, la STG y la OTA sobre el péptido A β ₁₋₄₂, se procedió a evaluar si la coadministración de la curcumina y de la cafeína junto con estas micotoxinas podría reducir dicho efecto, dado el potencial antioxidante y antiagregante que han demostrado estos dos polifenoles en otros estudios. Para ello, se comprobó previamente que cada agente neuroprotector no produjera agregación del péptido A β ₁₋₄₂ mediante su incubación con el péptido a una

concentración final 6 μM , que fue seleccionada de acuerdo con los datos bibliográficos de exposición del organismo a la cafeína, así como a su facilidad para atravesar la BBB. Los resultados obtenidos mostraron una anchura de fibra de (8.4 ± 0.5) nm (exposición a curcumina) y de (8.2 ± 0.4) nm (exposición a cafeína) sin diferencias significativas con respecto a la anchura de las fibras del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ sin tratar (8.2 ± 0.7 nm). A continuación, cada agente fue coadministrado junto con cada micotoxina en las mismas concentraciones y condiciones de incubación empleadas anteriormente (relación molar 2:1). Las micrografías obtenidas por TEM evidenciaron una disminución de la agregación producida por las aflatoxinas B1, G1 y la STG por parte de ambos polifenoles, si bien es cierto que la reducción de la anchura de las fibras fue mayor para la AFB1 ((12.0 ± 0.7) nm con curcumina y (11.0 ± 0.7) nm con cafeína, con una reducción de 3-4 nm del grosor inicial causado por la AFB1); la AFG1 ((10.7 ± 0.8) nm con curcumina y (11.0 ± 0.8) nm con cafeína, que supone una reducción de 3 nm aproximadamente); y la STG ((10.0 ± 1.0) nm con curcumina y (10.1 ± 0.6) nm con cafeína, que supone una reducción de unos 3 nm). Por el contrario, los polifenoles no disminuyeron la agregación causada inicialmente por la OTA, e incluso la cafeína incentivó aún más su capacidad de agregación del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ ((11.8 ± 0.9) nm con curcumina y (14 ± 1) nm con cafeína, un grosor hasta 2.5 nm superior).

El tratamiento de los datos mediante ANOVA confirmó que no existían diferencias significativas entre la anchura de la fibra del péptido sin tratar y tratada con curcumina y cafeína, mientras que sí se establecieron diferencias entre la anchura de las fibras tratadas con cada micotoxina individual con respecto al cotratamiento con la curcumina y con la cafeína. De nuevo, los resultados obtenidos apuntan a que el efecto antiagregante de la curcumina y de la cafeína podrían estar relacionados con la similitud estructural entre las aflatoxinas B1, G1 y la STG, puesto que ambos agentes neuroprotectores redujeron la agregación causada por estas tres micotoxinas de manera similar, al contrario que su nulo efecto sobre la agregación de la OTA (cuyo efecto de agregación incluso se incentiva en presencia de la cafeína).

Una vez confirmado el efecto de las aflatoxinas B1 y G1, la STG y la OTA sobre la agregación de las fibras del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ mediante TEM, se procedió a cuantificar el grado de interacción entre las micotoxinas con efecto agregativo y el péptido $\text{A}\beta_{1-42}$. Para este propósito, el ensayo de agregación *in vitro* se repitió en las mismas condiciones, pero en este caso se eliminó el péptido del extracto (y junto al péptido, la fracción

micotoxigénica unida a éste) y se analizó mediante HPLC-MS/MS, con la finalidad de comparar el área de señal de cada micotoxina libre (es decir, no enlazada al péptido) con respecto a la señal de una disolución patrón de la micotoxina a la misma concentración, y establecer así el porcentaje de cada micotoxina libre (no enlazada al péptido). Para este ensayo, las concentraciones iniciales del péptido y de la micotoxina fueron reducidas 10 veces con respecto a los ensayos de TEM, pero la proporción inicial péptido:micotoxina se mantuvo.

Los resultados del ensayo evidenciaron que el 100% de las aflatoxinas B1, G1 y la OTA, y el 93% de la STG estaban en el extracto en su forma libre (y, por tanto, no unidas al péptido). En todos los casos destaca el bajo o nulo porcentaje de micotoxina unida al péptido A β , pero la agregación del péptido observada previamente mediante TEM implicaría algún tipo de interacción entre el péptido y las micotoxinas. Por tanto, la no interacción aparentemente observada en el último ensayo podría ser explicada mediante varias hipótesis: 1) La elevada eficacia de las micotoxinas en la agregación del péptido A β ₁₋₄₂, lo que requeriría de una mínima concentración de micotoxina no detectable por nuestra metodología (valores de concentración inferiores al LOD establecido entre 0.8-2.7 nM); 2) La agregación del del péptido A β ₁₋₄₂ por parte de la micotoxina podría ser causada por algún tipo de mecanismo que no implicara una interacción directa entre la micotoxina y el péptido A β ₁₋₄₂, como por ejemplo, algún tipo de interacción mediante fuerzas de repulsión entre ambos. Además, en el caso específico de la STG, la fracción del 7% de micotoxina no detectada podría hallarse unida al péptido o incluso haberse autoagregado, puesto que la STG es una micotoxina con capacidad única para la autoagregación, según han demostrado otros autores. Estas hipótesis de interacción, a pesar de no haberse podido confirmar en base a los datos obtenidos, establecerían un precedente para nuevos estudios que evalúen la naturaleza de la interacción entre estas micotoxinas y el péptido A β mediante metodologías más específicas.

Una vez concluidos los ensayos de agregación del péptido A β ₁₋₄₂, se procedió a evaluar la citotoxicidad de las micotoxinas que habían demostrado una capacidad de agregación sobre el péptido A β ₁₋₄₂ (AFB1, AFG1, OTA y STG) sobre la línea celular SH-SY5Y, así como el potencial neuroprotector de la curcumina y la cafeína en coexposición con cada micotoxina. Para ello se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, ensayo colorimétrico para medir la actividad metabólica. El MTT, sal de tetrazolio

de color amarillo, es un reactivo capaz de penetrar en las mitocondrias celulares y ser reducido a formazano de color azul solamente en células viables, lo que permite extrapolar el porcentaje de células viables a cada concentración de micotoxina. La línea celular SH-SY5Y empleada procede de un tumor de neuroblastoma humano seleccionado por su fenotipo neuronal indiferenciado, que deriva de neuronas colinérgicas posteriormente mutadas a células cancerosas. A pesar de que su fenotipo neuronal original se perdió parcialmente y de que su homeostasis celular se ha visto alterada por la mutagenicidad, estas células aún conservan parte de las características fisiológicas y morfológicas del fenotipo neuronal colinérgico original. Su carácter indiferenciado posibilita el cultivo y la proliferación continua, lo que facilita y agiliza la realización de ensayos *in vitro*, al contrario que las líneas celulares diferenciadas, que requieren largos tiempos de incubación para ser empleadas en ensayos y no proliferan, lo que impide su cultivo en continuo y prolonga los tiempos significativamente.

Para evaluar la citotoxicidad inicial de cada micotoxina, se expuso una población de 24,000 células a cuatro concentraciones (0.3, 0.8, 1.6 y 3 μM) de micotoxina durante un periodo de 48 h. El intervalo de concentraciones seleccionado fue lo más bajo posible teniendo en cuenta los niveles mínimos de exposición neurológica, así como el tiempo medio que persisten las micotoxinas en la sangre antes de ser excretadas (24-48 h). A continuación, se calculó la concentración letal de micotoxina a la cual muere el 50% de la población celular (LC_{50}) a partir de las concentraciones ensayadas y se estableció el siguiente orden de citotoxicidad de acuerdo con los valores LC_{50} obtenidos: STG (1 μM) > OTA (1.8 μM) > AFG1 (3 μM) > AFB1 (>3 μM). Todas las micotoxinas salvo la AFB1 mostraron un elevado potencial citotóxico sobre la línea celular, teniendo en cuenta las bajas concentraciones aplicadas, en comparación con otros estudios *in vitro* sobre líneas celulares diferentes. Sorprendentemente, la STG fue la que ejerció mayor citotoxicidad, mientras que la AFB1 resultó ser la menos citotóxica, hasta el punto de que su valor LC_{50} no pudo extrapolarse a partir del intervalo de concentraciones evaluado (no se consideró oportuno aumentar el rango de concentraciones ensayadas para esta micotoxina al no considerarse realista a nivel *in vivo*). Destaca a su vez la mayor citotoxicidad de la AFG1 con respecto a la AFB1, si se tiene en cuenta que esta última está considerada como la aflatoxina más tóxica y carcinogénica de las aflatoxinas, mientras que la STG resultó ser la más tóxica, lo cual es relevante dada la ausencia de datos toxicológicos existentes

acerca de esta micotoxina. En cuanto a la OTA, también demostró un efecto citotóxico relevante que viene a confirmar su potencial neurotóxico ya conocido.

Una vez confirmada la elevada citotoxicidad de las micotoxinas agregantes, se procedió a evaluar si la coadministración de la curcumina y de la cafeína podría reducir la citotoxicidad inducida por estas micotoxinas. Para ello, previamente fue necesario determinar el intervalo de inocuidad de cada polifenol para así seleccionar aquellos niveles de exposición que no induzcan una toxicidad adicional sobre la línea celular durante su posterior coadministración con las micotoxinas. En ambos casos se evaluó un amplio intervalo de concentraciones que variaron según la exposición alimentaria, la absorción intestinal y la facilidad de paso a través de la BBB de cada sustancia. Para la curcumina, se seleccionaron las siguientes concentraciones (0.03, 0.14, 0.3, 1.4, 3.0, 6.8 y 13.6 μM) manteniéndose la viabilidad celular hasta 3 μM (viabilidad celular del 100%), mientras que para la cafeína se evaluó un rango notablemente más elevado de concentraciones por su elevada frecuencia de exposición, absorción y por su facilidad de paso a través de la BBB, manteniéndose la viabilidad celular al 100% a todas las concentraciones ensayadas (0.5, 1.3, 2.6, 5, 13, 26, 52 y 103 μM).

Una vez delimitado el rango de inocuidad de cada agente neuroprotector, se procedió a evaluar la citotoxicidad de las micotoxinas en presencia de cada agente neuroprotector. Para ello, se seleccionó un nivel de concentración próximo a la LC_{50} de cada micotoxina: 0.8 μM para la STG; 2.0 μM para la OTA; 3 μM para la AFG1; y 3 μM para la AFB1 (ante la imposibilidad de calcular su LC_{50} , se seleccionó la concentración más elevada que fue capaz de provocar hasta un 30% de mortalidad celular). Cada agente neuroprotector fue coadministrado junto a cada micotoxina a dos niveles diferentes (0.3 y 3 μM para la curcumina, así como 5 μM y 26 μM para la cafeína). El ensayo fue repetido en las mismas condiciones, de tal manera que tanto la micotoxina como el agente neuroprotector estuvieron simultáneamente en contacto con la población celular durante 48 h, tras lo cual se comparó la viabilidad celular obtenida tras la coexposición con respecto a la viabilidad obtenida para la micotoxina aplicada sola a la misma concentración durante el ensayo. De esta manera, se calcularon las diferencias en la viabilidad celular en forma de incrementos de viabilidad o de mortalidad celulares (en caso de que el agente neuroprotector aumentase o redujese la citotoxicidad celular basal causada por la micotoxina en solitario, cuyo valor fue considerado como el 0%).

La curcumina administrada a ambos niveles (0.3 y 3 μM) provocó los siguientes efectos sobre la citotoxicidad basal de cada micotoxina: aumento de la viabilidad celular en un $(35 \pm 3)\%$ a 0.3 μM y en un $(11 \pm 1)\%$ a 3 μM sobre el efecto de la AFB1; sin efecto sobre la viabilidad celular a 0.3 μM e incremento de la mortalidad celular en un $(49 \pm 6)\%$ a 3 μM provocada por la AFG1; no tuvo ningún efecto en la citotoxicidad de la OTA; y, finalmente, un aumento del $(35 \pm 1)\%$ de la viabilidad celular al nivel más bajo de concentración de curcumina con respecto a la citotoxicidad basal de la STG. Estos resultados ponen de manifiesto el efecto dispar de la curcumina. Aparece un claro efecto neuroprotector de la curcumina capaz de contrarrestar la citotoxicidad causada por la AFB1 y la STG en hasta un 35%, aunque este efecto solamente se logró a la concentración más baja de curcumina (0.3 μM), mientras que la concentración más alta (3 μM) no tuvo un efecto positivo. Sin embargo, la capacidad neuroprotectora de la curcumina se torna en citotóxica cuando se coadministra a 3 μM junto con la AFG1, llegando a potenciar su citotoxicidad hasta en un 50%. Estos resultados, si bien confirman el potencial neuroprotector de este polifenol al menos frente a la AFB1 y la STG (y a baja concentración de aplicación), también muestran un efecto neurotóxico en coadministración con la AFG1 al nivel superior (3 μM), lo que confirma que su capacidad neuroprotectora será dependiente de los mecanismos de citotoxicidad específicos que ejerza cada micotoxina e incluso de la concentración de curcumina aplicada. No obstante, en general el efecto de la curcumina se podría considerar beneficioso a 0.3 μM , mientras que su efecto perjudicial sobre la citotoxicidad de la AFG1 ocurrió solamente a 3 μM , una concentración que no sería realista a niveles neuronales fisiológicos. Finalmente, sus efectos positivo o negativo en presencia de las aflatoxinas B1 y G1, respectivamente también apuntarían a que ambas micotoxinas podrían ejercer mecanismos citotóxicos de diferente tipo sobre las células SH-SY5Y, pese a su elevada similitud estructural y a sus rutas de detoxificación comunes (al menos a nivel hepático).

La administración de la cafeína a ambos niveles (5 μM y 26 μM) generó los siguientes efectos sobre la citotoxicidad basal de las micotoxinas: incremento de la viabilidad celular en un $(2 \pm 3)\%$ y un $(15 \pm 3)\%$ sobre el efecto de la AFB1; aumento de la mortalidad celular en un $(-8 \pm 1)\%$ y un $(-10 \pm 3)\%$ provocada por la AFG1; incremento del $(26 \pm 1)\%$ y del $(17 \pm 2)\%$ de la viabilidad celular en coadministración con la OTA; y aumento de la viabilidad celular en un $(6 \pm 2)\%$ y un $(24 \pm 2)\%$ sobre la citotoxicidad de la STG. Este polifenol generó un efecto neuroprotector frente a las mismas micotoxinas

que la curcumina (AFB1 y STG), y de forma adicional también sobre la OTA, aunque fue necesario aplicar mayores concentraciones del agente neuroprotector. Además, el efecto de neuroprotector fue más aleatorio en relación con la concentración administrada, siendo más neuroprotectora al nivel superior (26 μM) frente a la AFB1 y la STG, así como al nivel inferior (5 μM) frente a la OTA. Al igual que la curcumina, la cafeína también aumentó la citotoxicidad provocada por la AFG1, aunque en menor extensión en comparación a la curcumina. Los resultados obtenidos para la cafeína confirmaron su efecto neuroprotector al menos frente a tres de las micotoxinas (AFB1, OTA y STG).

Los incrementos de la viabilidad y de la mortalidad obtenidos para ambos agentes neuroprotectores fueron analizados mediante un ANOVA, que confirmó que todos los factores implicados en el ensayo (tipo de micotoxina, agente neuroprotector y nivel de exposición al agente) resultaron estadísticamente significativos. El análisis también estableció diferencias estadísticamente significativas entre micotoxinas (concretamente entre la AFG1 y la OTA, así como entre estas dos micotoxinas con respecto a la AFB1 y la STG, que resultaron como grupos homogéneos); entre la curcumina y la cafeína; así como entre ambos niveles del agente neuroprotector aplicados. Estas diferencias fueron confirmadas mediante una prueba LSD Fisher.

Teniendo en cuenta todos los resultados descritos, este último trabajo ha evidenciado el potencial efecto neurotóxico de las micotoxinas (agregación del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ y citotoxicidad neuronal), y el efecto neuroprotector de determinados polifenoles como la curcumina y la cafeína. Aunque los resultados obtenidos son muy preliminares, abren una puerta para establecer los efectos neurotóxicos de las micotoxinas (teniendo en cuenta la ausencia de información existente en la bibliografía sobre este aspecto).

Como se ha podido comprobar, los distintos estudios descritos a lo largo de esta Tesis Doctoral han seguido un hilo conductor en torno a la exposición y los efectos de las aflatoxinas sobre la salud humana (a las cuales se añadieron también la OTA y la STG en el estudio de neurotoxicidad), a través de diferentes enfoques (exposición alimentaria, detoxificación mediante cocinado, bioaccesibilidad gastrointestinal o neurotoxicidad). Se han desarrollado metodologías analíticas empleando el HPLC-MS/MS que han permitido determinar las micotoxinas en una gran variedad de muestras de elevada complejidad: arroz, bebidas vegetales, extractos procedentes de los ensayos de bioaccesibilidad. Por otra parte, se han llevado a cabo ensayos para determinar el potencial neurotóxico de las

micotoxinas empleando líneas celulares *in vitro*, microscopía de transmisión electrónica y viabilidad celular mediante MTT. De este modo, la versatilidad de enfoques y de técnicas aplicados ha permitido aportar una visión transversal de la problemática de las micotoxinas que abarcaría desde la adquisición del alimento comercial (optimización de metodologías para la monitorización de la presencia de aflatoxinas en alimentos de origen vegetal), pasando por los efectos detoxificantes del cocinado de ciertos alimentos sobre las aflatoxinas (efecto de la cocción sobre aflatoxinas presentes en arroces) así como la bioaccesibilidad de las aflatoxinas a partir de alimentos vegetales de distinta composición (mediante simulación digestiva *in vitro* sobre arroces y bebidas vegetales contaminados) y evaluación del efecto neurotóxico de las micotoxinas (poco conocido) mediante ensayos *in vitro* de agregación del péptido A β y citotoxicidad celular. A su vez, la aplicación de herramientas estadísticas para la interpretación de los resultados obtenidos también ha sido útil para establecer patrones comunes de comportamiento entre diferentes micotoxinas, matrices alimentarias, niveles de contaminación micotoxigénica e incluso entre etapas digestivas, capacidad de agregación del péptido A β_{1-42} y agentes neuroprotectores.

X. CONCLUSIONES

X. CONCLUSIONES.

Las metodologías analíticas optimizadas durante esta Tesis Doctoral han permitido analizar la presencia de aflatoxinas B y G en un conjunto de muestras comerciales de arroz, por un lado, y de bebidas vegetales de arroz, avena, almendra y soja, por otro lado, para así evaluar el riesgo de exposición a las aflatoxinas a partir de estos tipos de alimentos vegetales. Paralelamente, también se ha evaluado el potencial detoxificativo de un tratamiento de cocinado por cocción del arroz, así como la bioaccesibilidad *in vitro* de estas aflatoxinas a partir de arroz blanco e integral y de bebidas vegetales de cada tipo. Finalmente, también se han explorado algunos aspectos específicos del potencial neurotóxico de las aflatoxinas B y G, la OTA y la STG mediante la evaluación *in vitro* de su capacidad para agregar el péptido β amiloide y de su citotoxicidad sobre la línea celular de origen neuronal SH-SY5Y, así como la reducción de estos efectos por la curcumina y la cafeína. Para realizar la mayoría de los estudios ha sido necesaria la optimización previa de metodologías para facilitar el análisis de los diferentes tipos extractos obtenidos tras los ensayos, así como el uso de diferentes técnicas analíticas instrumentales. A partir de los resultados obtenidos en estos trabajos se pueden establecer las siguientes conclusiones generales:

1. El control de la presencia de aflatoxinas en alimentos implica la necesidad continua de desarrollar nuevos métodos para la extracción, limpieza y preconcentración de aflatoxinas que se adapten a las características nutricionales específicas de cada tipo de alimento y que se adecuen a los requisitos de exactitud, linealidad y precisión exigidos por la legislación vigente.
2. La detección de aflatoxinas en algunas de las muestras comerciales de arroz y de bebidas vegetales analizadas, si bien no excede los límites establecidos por la legislación europea para aflatoxinas, implica un riesgo de exposición ocasional del consumidor a estas micotoxinas que debe ser tenido en cuenta a efectos de salud pública.
3. Algunos tratamientos de cocinado como la cocción poseen un elevado potencial detoxificante sobre arroces contaminados con aflatoxinas. Por otra parte, la digestión humana es el factor limitante que determina la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas

y, por tanto, la exposición fisiológica real a estas toxinas alimentarias. Considerando lo anterior, la bioaccesibilidad final de las aflatoxinas se encuentra estrechamente relacionada con 1) las características fisicoquímicas y la composición nutricional del alimento (en el caso del arroz y las bebidas vegetales) y 2) la estructura química de la aflatoxina (en el caso de las bebidas vegetales).

4. Algunas micotoxinas como la AFB1, la AFG1, la OTA y la STG causan efectos neurotóxicos derivados de su capacidad agregativa sobre el péptido β amiloide 1-42 ($A\beta_{1-42}$) y de su citotoxicidad sobre la línea celular neuronal SH-SY5Y, que pueden ser contrarrestados por la curcumina y la cafeína.

A continuación, se exponen las conclusiones más específicas que se han extraído a partir de los trabajos relacionados con la determinación de aflatoxinas en alimentos comerciales y la evaluación de su bioaccesibilidad a partir de dichos alimentos:

5. Se ha optimizado una metodología de extracción, limpieza y preconcentración de los extractos para el análisis simultáneo de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en distintas variedades de arroz mediante HPLC-MS/MS. Para ello, el empleo de MeOH: H₂O (4:1) como extractante junto con la aplicación de inmunosorbentes para la limpieza de los extractos y la preconcentración de las aflatoxinas proporcionó una metodología analítica que se ajusta en términos de exactitud, linealidad y precisión a las exigencias requeridas por la legislación para este tipo de metodologías analíticas. La aplicación del método optimizado al análisis de muestras de arroz comerciales confirmó la presencia de la AFB1 en al menos dos muestras diferentes, que no excedieron los límites establecidos por la legislación vigente en materia de limitación de la presencia de aflatoxinas en cereales. La eficiencia del método, su aplicabilidad al análisis de múltiples tipos de arroz y la fiabilidad de la técnica instrumental HPLC-MS/MS como método analítico de referencia para micotoxinas valorizan el potencial de aplicación de este método como alternativa para la monitorización de aflatoxinas en este tipo de cereal.
6. El cocinado del arroz por cocción supuso una notable disminución de la concentración de las aflatoxinas B y G presentes en arroz blanco e integral, evidenciando el elevado potencial de este método de cocinado para reducir el contenido aflatoxigénico, siendo esta disminución superior en el arroz integral que en el blanco. Este hecho puede estar motivado por una menor interacción entre las aflatoxinas y la superficie (cáscara) del

arroz integral. Por otro lado, la evaluación de la bioaccesibilidad de las aflatoxinas mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* sobre arroz blanco e integral previamente fortificados con cantidades conocidas de aflatoxinas confirmó una tendencia similar entre aflatoxinas, pero diferente entre ambos tipos de arroz, con un rango de bioaccesibilidad final del 60%-83% para las aflatoxinas presentes en el arroz blanco, muy superior al rango final obtenido a partir del arroz integral (28%-47%). Los datos obtenidos en las etapas salivar y gástrica apuntaban a que la reducida bioaccesibilidad final de aflatoxinas a partir del arroz integral podría deberse a una reducción parcial del contenido de aflatoxina bioaccesible durante la etapa gástrica que ocurrió solamente en este tipo de arroz. Dicha reducción podría ser causada por el bajo valor de pH de esta etapa digestiva que afecta en mayor medida al arroz integral debido a la débil interacción de las aflatoxinas con la cáscara de este tipo de arroz.

7. Se ha optimizado una metodología de extracción, limpieza y preconcentración de los extractos para la determinación simultánea de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 mediante HPLC-MS/MS en cuatro tipos de bebidas vegetales (arroz, avena, almendra y soja) de diferente composición nutricional. En este caso, la adecuación de la metodología a los estándares de exactitud, precisión y linealidad exigidos se logró mediante el empleo de MeOH al 33% como agente extractante, en combinación con una extracción líquido-líquido adicional con hexano para desgrasar el extracto y una etapa final de limpieza mediante la utilización de un cartucho SPE con estructura polimérica y balance hidrofílico-lipofílico (tipo HLB). La metodología optimizada se aplicó en el análisis de un conjunto de muestras comerciales de cada tipo de bebida, detectándose las aflatoxinas B1, B2 y G1 en una muestra de bebida de soja por debajo del LOQ, por lo que cumplía los límites legales establecidos. Adicionalmente, la evaluación de la bioaccesibilidad final *in vitro* de las aflatoxinas a partir de cada tipo de bebida vegetal demostró importantes diferencias de comportamiento según el tipo de aflatoxina y, en menor medida, de acuerdo con las diferencias de composición entre bebidas vegetales. Por tanto, la disparidad del comportamiento digestivo entre las aflatoxinas, sumado al incipiente auge de estas bebidas como alternativa alimentaria frente a los lácteos de origen animal, refuerzan la importancia de determinar la bioaccesibilidad de estos compuestos con el fin de estimar de forma correcta la exposición real a aflatoxinas a partir de estos tipos de alimentos.

En relación con el trabajo para la evaluación de la neurotoxicidad de las aflatoxinas, la OTA y la STG, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

8. Se confirma el potencial neurotóxico de determinadas micotoxinas, que hasta ahora resultaba desconocido en lo que respectaba a sus efectos a un nivel neuronal. Las aflatoxinas B1 y G1, la STG y, en menor medida, la OTA provocaron la agregación del péptido A β ₁₋₄₂, mientras que la curcumina y la cafeína lograron reducir parcialmente el efecto agregativo de, al menos, la AFB1, la AFG1 y la STG. Paralelamente, todas las micotoxinas con efecto agregativo resultaron ser altamente citotóxicas para la línea celular neuronal SH-SY5Y en comparación a otros estudios, siendo la STG la más tóxica y la AFB1 la menos nociva. La curcumina y la cafeína lograron reducir ligeramente la citotoxicidad de la AFB1, la OTA y la STG. De esta manera, no solo se confirman dos efectos neurotóxicos específicos de estas micotoxinas (minimizando la toxicidad de la AFB1 con respecto a otras micotoxinas), sino también el potencial de la curcumina y de la cafeína como agentes neuroprotectores frente a la neurotoxicidad micotoxigénica.

XI. CONCLUSIONS

XI. CONCLUSIONS.

The analytical methodologies optimized during this Doctoral Thesis have enabled the analysis of aflatoxins B and G in a set of commercial rice samples and plant-based beverages made from rice, oat, almond and soy, to evaluate the risk of exposure to aflatoxins from these types of foods. Additionally, the detoxifying potential of cooking treatment by boiling rice has also been tested, as well as the *in vitro* bioaccessibility of these aflatoxins in both white and brown rice and plant-based beverages of each type. Finally, specific aspects of the neurotoxic potential of aflatoxins B and G, OTA, and STG have also been explored through *in vitro* evaluation of their ability to aggregate the amyloid β peptide and their cytotoxicity on the SH-SY5Y neuronal cell line, as well as the reduction of these effects by curcumin and caffeine. To carry out most of the studies, it was necessary to optimize additional methodologies to facilitate the analysis of different types of extracts obtained after the experiments, as well as the use of different instrumental analytical techniques. Based on the results obtained in these studies, the following general conclusions can be established:

1. Controlling the presence of aflatoxins in foods requires the continuous development of new methods for the extraction of aflatoxins and clean-up of the extracts. These methods must be adapted to the specific nutritional characteristics of each type of food and meet the accuracy, linearity and precision required by current legislation.
2. The detection of aflatoxins in some of the commercial samples analyzed of rice and plant-based beverages, although not exceeding the limits set by European legislation for aflatoxins, implies a risk of occasional exposure to the consumer, which should be considered from a public health perspective.
3. Some cooking treatments, such as boiling, have a significant detoxifying potential for rice contaminated with aflatoxins. On the other hand, human digestion is the limiting factor that determines the final bioaccessibility of aflatoxins and, therefore, the real physiological exposure to these food toxins. Considering this, the final bioaccessibility of aflatoxins is closely related to 1) the physicochemical characteristics and nutritional composition of the food (in the case of rice and plant-

based beverages); and 2) the chemical structure of the aflatoxin (in the case of plant-based beverages).

4. Some mycotoxins, such as AFB1, AFG1, OTA, and STG, exert neurotoxic effects due to their aggregative capacity on the amyloid β peptide ($A\beta_{1-42}$) and their cytotoxicity on the SH-SY5Y neuronal cell line. These effects can be counteracted by curcumin and caffeine.

Below are the more specific conclusions derived from the work related to the determination of aflatoxins in commercial foods and the assessment of their bioaccessibility from these foods:

5. A methodology for extraction, clean-up and preconcentration of the extracts for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 has been optimized in different types of rice using HPLC-MS/MS. For this purpose, the use of MeOH: H₂O (4:1) as an extraction solvent, combined with immunosorbents for the clean-up and preconcentration of the extracts provided an analytical methodology that meets the requirements, in terms of accuracy, linearity, and precision, required by legislation for this type of methodologies. The application of the optimized method to the analysis of commercial rice samples confirmed the presence of AFB1 in at least two different samples, which did not exceed the limits established by current legislation about the presence of aflatoxins in cereals. The efficiency of the method, its applicability to the analysis of different rice types and the reliability of the HPLC-MS/MS technique as a reference analytical method for mycotoxins highlight the potential of this method as an alternative for monitoring aflatoxins in this type of cereal.
6. Cooking rice by boiling resulted in a significant decrease in the concentration of aflatoxins B and G present in white and brown rice, demonstrating the high potential of this cooking method to reduce aflatoxigenic content. This decrease was greater in brown rice than in white rice, which may be motivated by a lower interaction between aflatoxins and the surface (husk) of brown rice. On the other hand, the evaluation of the bioaccessibility of aflatoxins using an *in vitro* gastrointestinal digestion model on white and brown rice previously spiked with known amounts of aflatoxins confirmed a similar trend between aflatoxins, but different between both types of rice, with a final bioaccessibility range of 60%-83% for aflatoxins present in white rice, much higher than the final range obtained from brown rice (28%-47%). Data obtained at the

salivary and gastric stages indicated that the reduced final bioaccessibility of aflatoxins from brown rice could be due to the low pH value of the digestive gastric stage that affects brown rice to a greater extent due to the weak interaction of aflatoxins with the husk of this type of rice.

7. A methodology for the extraction, clean-up and preconcentration of the extracts has been optimized for the simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in four types of plant-based beverages (rice, oat, almond and soy) with different nutritional compositions. In this case, compliance with the required accuracy, precision and linearity was achieved using 33% MeOH as the extracting agent, combined with an additional liquid-liquid extraction step with hexane for defatting the extract and a final clean-up step using an SPE cartridge with a polymeric structure and hydrophilic-lipophilic balance (HLB type). The optimized methodology was applied to a set of commercial samples of each beverage type, detecting aflatoxins B1, B2, and G1 in a soy beverage sample below the LOQ, thus complying with the established legal limits. In addition, the evaluation of the final *in vitro* bioaccessibility of aflatoxins from each type of plant beverage showed significant differences in composition between the beverages. Thus, the disparity in the digestive behavior between the different aflatoxins, added to the growing popularity of these beverages as an alternative to animal-derived dairy products, underscores the importance of determining the bioaccessibility of these compounds to accurately estimate real exposure to aflatoxins from these type of foods.

Regarding the work related to the evaluation of the neurotoxicity of aflatoxins, OTA, and STG, the following conclusions can be drawn:

8. The neurotoxic potential of certain mycotoxins is confirmed, which until now was unknown regarding their neuronal-level effects, is confirmed. Aflatoxins B1 and G1, STG, and, to a lesser extent, OTA caused aggregation of the amyloid β peptide, while curcumin and caffeine partially reduced the aggregative effect of at least AFB1, AFG1, and STG. Additionally, all mycotoxins with an aggregating effect were found to be highly cytotoxic for the neuronal cell line SH-SY5Y compared to other studies, with STG being the most toxic and AFB1 the least harmful. Curcumin and caffeine slightly reduced the cytotoxicity of AFB1, OTA, and STG. In this way, not only two specific neurotoxic effects of these mycotoxins are confirmed (minimizing the

toxicity of AFB1 compared to other mycotoxins) but also the potential of curcumin and caffeine as neuroprotective agents against mycotoxin-induced neurotoxicity.

XII. ANEXO

XII. Anexo-Producción Científica

A.1. Artículos científicos incluidos en la Tesis Doctoral.

- **Romero-Sánchez I**, Vicente-Zurdo D., Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Neurotoxic effect of mycotoxins on human neuroblastoma cell line and amyloid β aggregation. Protective effect of curcumin and caffeine*. Toxicology (enviado).
- **Romero-Sánchez I**, Alonso-Núñez I., Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Analysis and evaluation of in vitro bioaccessibility of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in plant-based milks*. Food Chemistry, Vol 460 (2024), Part 1, 140538. doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140538
- **Romero-Sánchez I**, Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of in vitro bioaccessibility from white and brown rice*. Food Chemistry, Vol 436 (2023); 137738. doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137738
- **Romero-Sánchez I**, Ramírez-García L., Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS*. Food Chemistry, Vol 395 (2022); 133611. doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133611

A.2. Otros artículos científicos.

- Vicente-Zurdo D., Gómez-Gómez B., **Romero-Sánchez I**, Rosales-Conrado N., León-González M. E., Madrid Y. *Cytotoxicity, uptake and accumulation of selenium nanoparticles and other selenium species in neuroblastoma cell lines related to Alzheimer's disease by using cytotoxicity assays, TEM and single cell-ICP-MS*. Analytica Chimica Acta Vol 1249 (2023); 340949. doi.org/10.1016/j.aca.2023.340949
- Rousis N., Bade R., **Romero-Sánchez I**, Mueller J. F., Thomaidis N. S., Thomas K. V., Gracia-Lor E. *Festivals following the easing of COVID-19 restrictions: Prevalence of new psychoactive substances and illicit drugs*. Environment International, Vol 178 (2023); 108075. doi.org/10.1016/j.envint.2023.108075.

- Fandos R., Rodríguez-Delgado A., Rodríguez A., **Romero I.**, Organero J. A., Álvarez E. *Pathways to Metal-Ligand Cooperation in Quinoline-Based Titanium(IV) Pincers: Nonelectrophilic N-methylation, Deprotonation, and Dihydropyridine Formation.* *Organometallics*, Vol 40, 12 (2021); 1838-1847. doi.org/10.1021/acs.organomet.1c00105
- Vicente-Zurdo D., Romero-Sánchez I., Rosales-Conrado N., León-González M.E., and Madrid I. *Ability of selenium species to inhibit metal-induced A β aggregation involved in the development of Alzheimer's disease.* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol 412 (2020); 6485–6497. doi.org/10.1007/s00216-020-02644-2

A3. Comunicaciones a Congresos.

- Gracia-Lor E., **Romero-Sánchez I.**, Madrid-Albarrán Y. Análisis y evaluación de la bioaccesibilidad in vitro de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en leches vegetales. XXIV Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. Zaragoza, julio de 2024. Tipo de comunicación: Póster.
- **Romero-Sánchez I.**, Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Aflatoxin detoxification by thermal cooking treatment and evaluation of in vitro bioaccessibility from white and brown rice.* 1º International Workshop of the Spanish network on mycotoxins, toxigenic fungi and their decontamination processes. Valencia, junio de 2023. Tipo de comunicación: Oral.
- **Romero-Sánchez I.**, Vicente-Zurdo D., Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Evaluation of intestinal and neuronal toxicity of mycotoxins by in vitro assays.* 1º International Workshop of the Spanish network on mycotoxins, toxigenic fungi and their decontamination processes. Valencia, junio de 2023. Tipo de comunicación: Póster.
- **Romero-Sánchez I.**, García-Ramírez L., Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Análisis de micotoxinas fúngicas en distintas variedades de arroz.* VI Simposio Anual en Química Avanzada (SAQA), Madrid, julio de 2022. Tipo de comunicación: Oral.
- **Romero-Sánchez I.**, Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *In vitro digestion model for bioaccessibility determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 from spiked rice.*

Congreso de la XXIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. Oviedo, julio de 2022. Tipo de comunicación: Póster.

- **Romero-Sánchez I.**, García-Ramírez L., Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS*. Congreso de la XXXVIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química. Granada, junio de 2022. Tipo de comunicación: Póster.
- **Romero-Sánchez I.**, Gracia-Lor E., Madrid-Albarrán Y. *Análisis de Micotoxinas Fúngicas en distintas variedades de arroz*. V Jornada de Promoción de la Investigación Básica para Estudiantes de Ciencias e Ingenierías. Madrid, septiembre de 2021. Tipo de comunicación: Oral.

A.4. Estancias de investigación y colaboraciones.

Estancia predoctoral internacional en el grupo "*Applied Mycology research*" del Centro de Engenharia Biológica de la Universidade do Minho (Braga, Portugal), entre el 4 de septiembre de 2023 y el 4 de diciembre de 2023 (3 meses), bajo la supervisión del profesor Armando Albino Dias Venâncio. En dicha estancia se colaboró en un estudio para la identificación de especies de hongos micotoxigénicos presentes en un conjunto de muestras de habichuelas y cacahuets procedentes de Angola y Mozambique, con el objetivo de establecer el riesgo de contaminación micotoxigénica de estos alimentos de acuerdo con las especies halladas, que fueron identificadas mediante técnicas moleculares basadas en PCR y secuenciación.