



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA EN MANZANA Y SUS DERIVADOS

Alumno/a: Manuela González Pérez

Junio, 2022



Trabajo Fin de Grado

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA EN MANZANA Y SUS DERIVADOS



Alumno/a: Manuela González Pérez

Jaén, Junio, 2022

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Micotoxinas	2
<i>1.1.1. Concepto y origen</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2. Tipos.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.3. Toxicidad</i>	<i>7</i>
1.2. Patulina.....	11
<i>1.2.1. Concepto y origen</i>	<i>11</i>
<i>1.2.2. Composición química.....</i>	<i>12</i>
<i>1.2.3. Propiedades y aplicaciones</i>	<i>13</i>
<i>1.2.4. Legislación</i>	<i>14</i>
<i>1.2.5. Técnicas de pretratamiento de muestra</i>	<i>15</i>
<i>1.2.6. Técnicas de análisis</i>	<i>18</i>
2. OBJETIVOS	22
3. METODOLOGÍA	23
4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	24
5. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PATULINA EN MANZANAS	25
5.1. Toma de muestra.....	25
5.2. Técnicas de extracción y purificación de patulina	27
5.3. Técnicas analíticas de detección de patulina	36
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas	2
Figura 1.2. Micotoxicosis primaria y secundaria	4
Figura 1.3. Hongo <i>Penicillium</i>	11
Figura 1.4. Manzana con moho	11
Figura 1.5. Estructura química de la patulina	12
Figura 1.6. Ruta biosintética de la patulina.....	13
Figura 1.7. Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) ..	16
Figura 1.8. Esquema del procedimiento de extracción líquido-líquido (LLE)...	17
Figura 1.9. Esquema del procedimiento del método QuEChERS	18
Figura 1.10. Esquema del procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	19
Figura 1.11. Esquema del procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución con espectrofotometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)	20
Figura 1.12. Esquema del procedimiento de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	21
Figura 4.1. Manzana sana y podrida	24
Figura 4.2. Hongo <i>Penicillium</i> microscopio.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales géneros productores de micotoxinas y número de especies micotoxígenas que incluyen	3
Tabla 1.2. Principales tipos de micotoxinas y su estructura.....	5
Tabla 1.3. Tipos de micotoxinas, su toxicidad y alimentos afectados	8
Tabla 1.4. Características necesarias para el crecimiento de hongo y producción de micotoxina	14
Tabla 1.5. Contenido máximo de patulina en alimentos en la Unión Europea .	15
Tabla 5.1. Temperaturas recomendadas para el almacenamiento de manzanas.....	25
Tabla 5.2. Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote	26
Tabla 5.3. Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote	26
Tabla 5.4. Número de muestras elementales que deben tomarse para formar una muestra global si el lote está integrado por envases individuales	26
Tabla 5.5. Investigación bibliográfica de los análisis sobre las diferentes muestras de patulina	29
Tabla 6.1. Técnicas analíticas con menor límite de detección estudiadas.....	40

RESUMEN

Las micotoxinas producen efectos tóxicos en el organismo de seres vivos, es por ello que la determinación de estas en los alimentos es de especial importancia y se han de respetar los valores máximos establecidos por la legislación, en nuestro caso de la Unión Europea, ya que si no fuera así dichos alimentos serían un peligro para la salud pública.

La patulina es la micotoxina en la que se centra dicho Trabajo Fin de Grado. Se encuentra presente mayoritariamente en manzanas y sus derivados como zumos, compotas, sidras o purés. Con lo cual, en este trabajo se recogen los métodos de análisis utilizados para la determinación de patulina en los alimentos antes mencionados.

Se emplean diversas técnicas analíticas, aunque las más empleadas son técnicas cromatográficas (tanto gases como líquidos).

ABSTRACT

The mycotoxins produce toxic effects on the organism of the living beings, is for that the determination of these in the food is very important and the maximum values established by law, in our case of European Union, must be respected; because if it is not those foods would be a danger to public health.

Patulin is the mycotoxin on which this Final Degree Project is focused. It is present mostly in apples and their by-products like juices, compotes, ciders or purées. Therefore, in this Project are the methods of analysis used for the determination of patulin in the previously mentioned foods.

Several analytical techniques are used, although the most commonly used are chromatographic techniques (both gases and liquids).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Micotoxinas

1.1.1. Concepto y origen

La palabra micotoxina deriva del griego “*mycos*” que designa hongo y del latín “*toxicum*”, que denota tóxico o veneno.

Se designan micotoxinas a los metabolitos secundarios creados por hongos, que pueden generar efectos tóxicos tanto en el ser humano como en animales.

La mayoría de las micotoxinas derivan de una cadena del siguiente tipo $R-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-SCoA$. Estas, normalmente, se forman al terminar la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria del crecimiento del moho. (Fig. 1.1.)

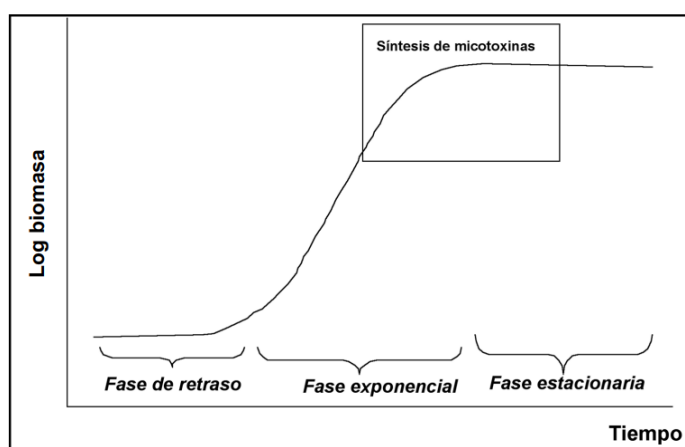


Figura 1.1. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.
(Soriano del Castillo, 2007)

Las micotoxinas habitualmente se suelen generar en harinas y sus derivados, frutas y sus derivados, frutos secos, leche o lácteos. Aunque sobre todo se introducen en la cadena alimentaria mediante los cereales, los cuales son empleados para alimentos y piensos.

Se suelen generar antes o después de la cosecha y, para que se produzcan, debe de haber unas condiciones óptimas tales como:

- *Factores físicos: humedad, agua disponible, temperatura, zonas de microflora (pequeñas zonas del alimento con alto contenido de humedad) e integridad física del grano o alimento.*
- *Factores químicos: composición del sustrato, pH, nutrientes minerales y disponibilidad de oxígeno.* (Instituto de Salud Pública de Chile, 2013)

Una vez presentes en el alimento, ya no se puede descontaminar, resistiendo los procesos de secado, molienda y procesado. Además, debido a su estabilidad térmica, no suelen desaparecer mediante el cocinado. (Servicio de Seguridad Alimentaria, 2021)

Una micotoxina se puede producir concretamente por una o varias especies de hongos o mohos. Incluso, en ocasiones, una especie de hongo genera más de un tipo de micotoxina. (Tabla 1.1)

Tabla 1.1. Principales géneros productores de micotoxinas y número de especies micotoxígenas que incluyen. (Soriano del Castillo, 2007)

Género	Especies micotoxígenas
Penicillium	32
Aspergillus	15
Fusarium	12
Byssochlamys	2
Stachybotrys	2
Trichoderma	2
Alternaria	1
Chaetomium	1
Paecilomyces	1
Rhizopus	1

Las micotoxinas suelen generar enfermedades, las cuales se denominan micotoxicosis. La enfermedad puede ser primaria o secundaria. (Fig. 1.2.)

- La micotoxicosis primaria se contrae por el consumo de micotoxinas presentes en un producto vegetal, al ser ingerido este por una persona o animal doméstico.
- La micotoxicosis secundaria, la puede contraer una persona al consumir la carne, leche o derivados de un animal que previamente haya ingerido un producto vegetal con presencia de micotoxinas.

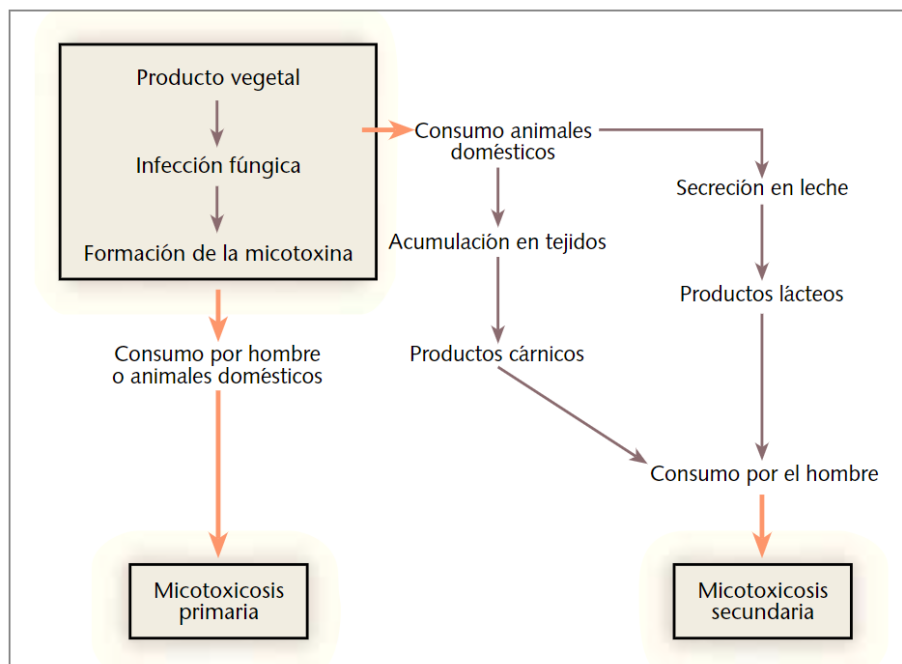


Figura 1.2. Micotoxicosis primaria y secundaria. (Gómez Ayala, 2007)

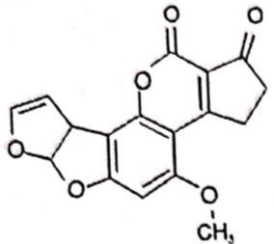
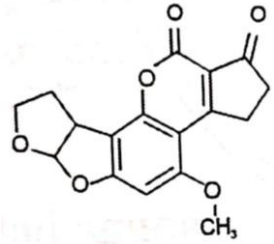
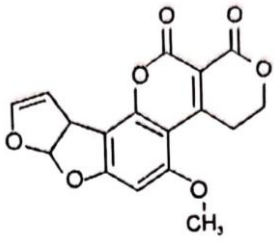
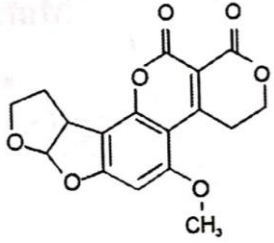
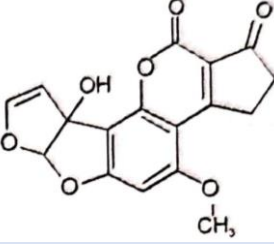
La Organización Mundial de la Salud (OMS), conjuntamente con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se responsabiliza de valorar los peligros para las personas de la contaminación de los alimentos por micotoxinas y de aconsejar una protección conveniente.

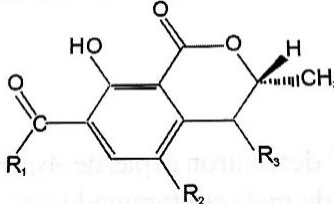
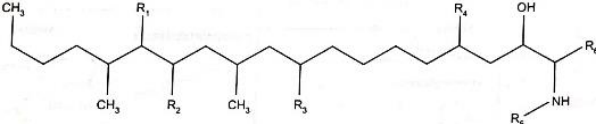
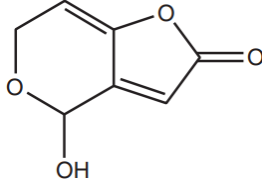
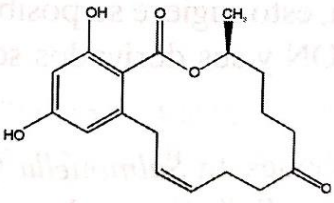
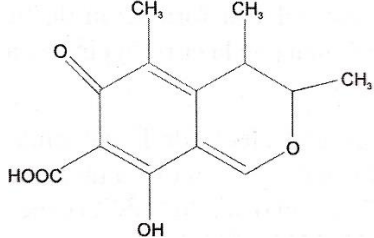
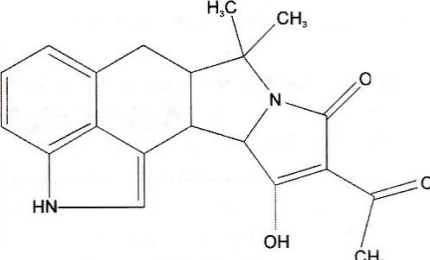
Las micotoxinas son un riesgo para la salud humana y animal, debido a que se ven perjudicadas la seguridad alimentaria y la nutrición. Por tanto, es imprescindible reducir lo máximo posible la exposición a las micotoxinas.

1.1.2. Tipos

En la naturaleza hay numerosos tipos de micotoxinas y dentro de estas hay algunos subtipos. Actualmente, hay más de 400 micotoxinas identificadas. A continuación, se muestra la estructura de las más conocidas. (Tabla 1.2.)

Tabla 1.2. Principales tipos de micotoxinas y su estructura. (Soriano del Castillo, 2007)

MICOTOXINA	TIPO	ESTRUCTURA
Aflatoxina	B1	
Aflatoxina	B2	
Aflatoxina	G1	
Aflatoxina	G2	
Aflatoxina	M1	

Ocratoxina	A	
Fumonisima	-	
Patulina	-	
Zearalenona	-	
Citrinina	-	
Ácido ciclopiazónico	-	

1.1.3. Toxicidad

Las micotoxinas pueden causar diversos efectos tóxicos en las personas, tal y como se muestra en la Tabla 1.3.

A continuación, se explican algunos de dichos efectos:

- Mutagenicidad: Capacidad de introducir o producir cambios en el ADN, es decir, mutaciones.
- Teratogenicidad: *Capacidad potencial para producir malformaciones o defectos en la descendencia.* (WHO, World Health Organization, 1987) (Repetto & Sanz, s.f.)
- Genotoxicidad: *Capacidad de producir un daño en el material genético. El daño puede ser mutagénico o carcinogénico.* (de la Peña, 2012)
- Inmunotoxicidad: Capacidad de alterar al sistema inmunitario.
- Carcinogenicidad: *Capacidad de inducir neoplasias malignas, siendo una neoplasia una transformación celular incontrolada que da como resultado la formación de un tumor.* (de la Peña, 2012)
- Hepatotoxicidad: Capacidad por la que se destruyen o perjudican las células del hígado.
- Nefrotoxicidad: Capacidad para dañar o destruir las células del riñón.
- Neurotoxicidad: *Capacidad para producir químicamente un efecto adverso sobre el sistema nervioso tanto central como periférico.* (Repetto & Sanz, s.f.)
- Estrogenicidad: *Capacidad para actuar como una hormona estrogénica natural en el organismo de un mamífero.* (Juncker, 2019)
- Hematotoxicidad: Capacidad de alterar la sangre.
- Mielotoxicidad: Toxicidad que da lugar a una *mielosupresión, que consiste en la capacidad de disminuir la actividad de la médula ósea y esto hace que haya menos glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.* (Instituto Nacional del Cáncer, s.f.)
- Citotoxicidad: *Capacidad para producir un daño a la función o a la estructura celular.* (Repetto & Sanz, s.f.)
- Cardiotoxicidad: *Capacidad por la que aparece una disfunción del músculo cardíaco y esta puede progresar a una insuficiencia cardíaca.* (Madonna, 2017)

Tabla 1.3. Tipos de micotoxinas, su toxicidad y alimentos afectados. (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, ELIKA, 2018)

HONGO PRODUCTOR	MICOTOXINA	EFFECTOS TÓXICOS EN LAS PERSONAS	ALIMENTOS IMPLICADOS
Aspergillus flavus y A. parasiticus	Aflatoxinas (B1, M1, G1, B2, y G2)	Mutagénicas, teratogénicas, genotóxicas, inmunotóxicas. Carcinogénicas (excepto M1) B1: Hepatotóxica. Grado toxicidad: B1>M1>G1>B2>G2	Maíz, cacahuete y algodón (más afectados). Frutos secos, arroz, trigo, semillas de girasol, higos y otras frutas desecadas, habas de cacao, soja, especias, aceites vegetales crudos. Leche y productos lácteos (M1).
Aspergillus ochraceus y Penicillium verrucosum	Ocratoxina A	Nefrotóxica Inmunotóxica Teratogénica Neurotóxica Mutagénica Posiblemente carcinogénica.	Trigo (más afectado). Maíz, cebada, centeno, avena, arroz y productos derivados (harina, cerveza...). Granos de cacao y café, especias, uvas y productos derivados (vinos y zumos), frutas desecadas, frutos secos, regaliz, queso y carne.
Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. versicolor, y A. nidulans	Esterigmatocistina	Hepatotóxica, nefrotóxica, mutagénica, inmunotóxica, genotóxica y carcinogénica.	Trigo, maíz, cebada, centeno, avena, arroz, productos derivados de los cereales, granos de café, especias, frutos secos, semillas de girasol.
Aspergillus, Penicillium expansum y Monascus purpureus	Citrinina	Nefrotóxica, teratogénica. Riesgo potencial de genotoxicidad y carcinogenicidad (no hay suficiente evidencia científica).	Arroz de levadura roja (más afectado). Cereales (centeno mayoritariamente) y sus productos derivados (harina principalmente). Frutas (manzana mayoritariamente).

Penicillium, Aspergillus y Byssosclamyces	Patulina	Trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos, dolores abdominales). Genotóxica (no hay suficientes datos de carcinogenicidad).	Manzana y sus productos derivados (zumos y sidra).
Fusarium graminearum	Zearalenona	Estrogénica. Inmunotóxica in vitro. No clasificable como carcinogénica.	Trigo y maíz (más afectados). Cebada, centeno, avena, productos derivados de los cereales (harina, cerveza, pan, pasta, bollería, repostería...).
Fusarium graminearum y F. culmorum	Deoxinivalenol	Trastornos gastrointestinales. Teratogénica, inmunotóxica, genotóxica in vitro. No clasificable como carcinogénica.	Trigo y maíz (más afectados). Cebada, centeno, avena, productos derivados de los cereales, y aceites de semillas.
Fusarium graminearum, F. cereales y F. poae	Nivalenol	Inmunotóxica Hematotóxica Genotóxica in vitro No carcinogénica	Trigo y maíz (más afectados). Cebada, avena, productos derivados de los cereales.
Fusarium sporotrichioides	T2 y HT2	Hematotóxica Mielotóxica Inmunotóxica No carcinogénica	Avena y maíz (más afectados). Trigo, cebada, centeno y productos derivados de los cereales.
Fusarium verticillioides y F. proliferatum	Fumonisin (B1,B2)	Inmunotóxica Nefrotóxica Hepatotóxica Posiblemente carcinogénicas	Maíz (más afectado). Trigo, cebada, especias y productos derivados de los cereales.

Fusarium spp.	Beauvericina y eniatina	Citotóxicas Inmunotóxicas y hematotóxicas in vitro	Cereales y productos derivados.
F. avenaceum, F. subglutinans y F. proliferatum	Moniliformina	Hematotóxica y cardiotoxica, alteraciones cromosómicas (in vivo no hay suficiente evidencia científica)	Maíz, trigo, cebada, avena y productos derivados de los cereales.
Claviceps purpurea	Alcaloides ergóticos	Ergotismo, neurotoxicidad, efectos endocrinológicos y alteraciones cardiovasculares y vasoconstrictoras.	Centeno (más afectado). Trigo, cebada, mijo y avena.
Alternaria alternata	Alternariol (AOH) Éter monometílico (AME) Ác. tenuazónico (TeA) Tentoxina (TEN)	AOH y AME son genotóxicas in vitro.	Cereales, semillas oleaginosas, frutas, hortalizas y productos derivados.

1.2. Patulina

1.2.1. Concepto y origen

Durante los años 1940, dicha micotoxina fue descubierta por varios grupos de investigación y fue utilizada como antibiótico. A lo largo de su historia, la patulina ha recibido diversos nombres tales como *claviformina*, *clavacina*, *clavatina*, *expansina* y *miocina C*. (Moake et al., 2005)

La patulina es un metabolito secundario producido por una serie de especies fúngicas de los géneros Penicillium, Aspergillus y Byssochlamys, de las que Penicillium expansum es probablemente la especie más común. (Byrne, 2003)

Actúa como contaminante y se encuentra en diversas frutas, verduras, cereales y otros alimentos que presentan moho. Aunque las fuentes de contaminación fundamentalmente son las manzanas y sus derivados.



Figura 1.3. Hongo Penicillium.
(Mycotoxinsite, s.f.)



Figura 1.4. Manzana con moho.
(Al Wright, 2015)

Esta micotoxina no se acumula en el organismo, pero su consumo en elevada cantidad por la ingesta de zumos de manzana o sidra contaminados puede producir efectos agudos gastrointestinales (hiperemia, distensión, hemorragia y úlcera). (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, GENCAT, 2021)

La presencia de moho en frutas no significa necesariamente que estas contengan patulina, es decir, existe una posibilidad de que sí puedan presentarla, pero pueden no contenerla. En el caso de que una fruta sí tuviera patulina, el hecho de lavar o desechar la parte de esta que presente moho no elimina toda la patulina presente en la fruta, ya que dicha micotoxina se ha podido extender hacia partes de la fruta supuestamente sanas.

Es importante destacar que la entrada de micotoxinas, en este caso de patulina, en el organismo es mucho más rápida si se lleva a cabo por vía respiratoria que si se ingiere, ya que el hecho de ingerirla produce una detoxificación de la sustancia porque esta previamente se tiene que absorber en el intestino delgado.

1.2.2. Composición química

En 1949, Woodward y Singh determinaron la estructura de la patulina. La fórmula química de la patulina es 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona y su estructura aparece a continuación. (Fig. 1.5.)

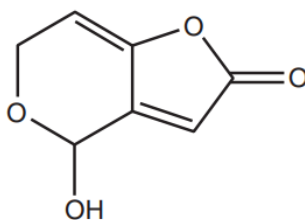


Figura 1.5. Estructura química de la patulina. (Al Wright, 2015)

La síntesis de la patulina se lleva a cabo a partir de los siguientes reactivos: 1 molécula de acetil-coenzima A y 3 moléculas de malonil-coenzima A. Finalmente, siguiendo una serie de reacciones en cadena y catalizadas por enzimas, se obtiene el producto deseado como se puede observar en la siguiente ruta metabólica. (Fig. 1.6.)

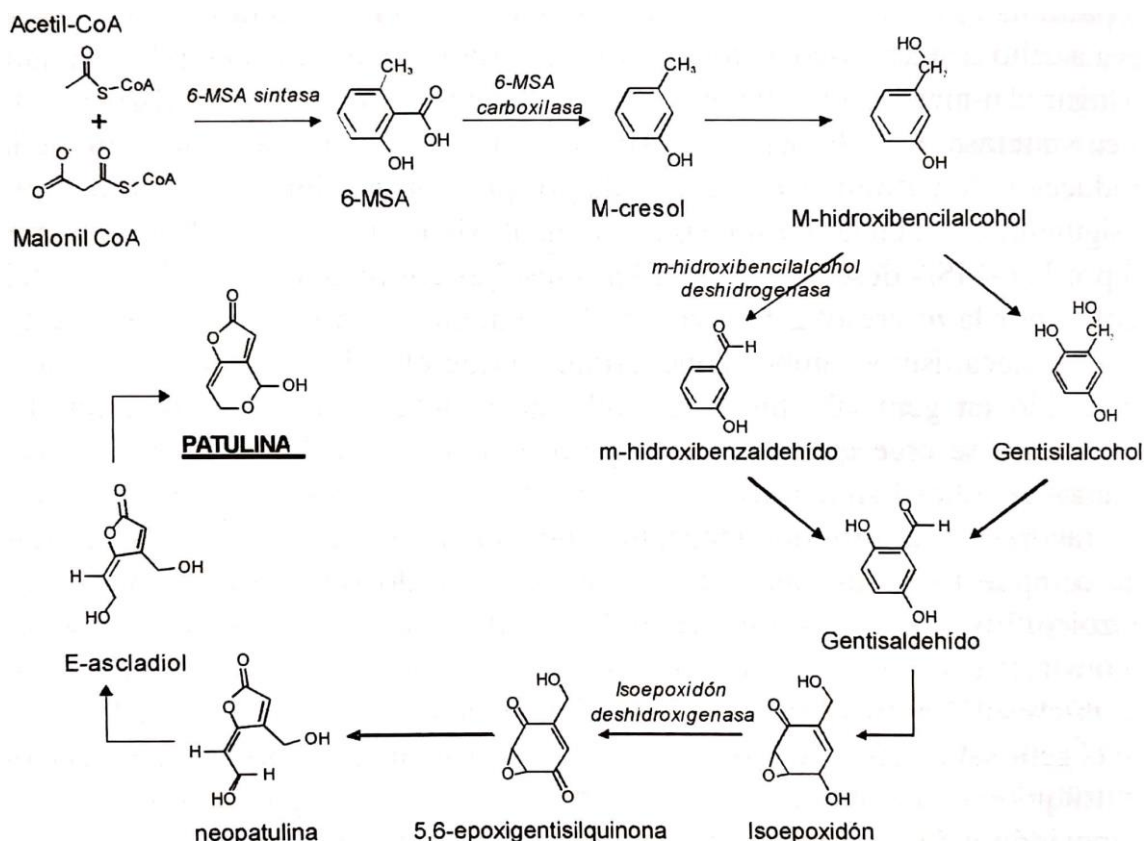


Figura 1.6. Ruta biosintética de la patulina.
(Soriano del Castillo, 2007) (Moake et al., 2005)

1.2.3. Propiedades y aplicaciones

La patulina forma cristales incoloros, su punto de fusión se encuentra entre 105-111°C y sublima entre 70-100°C en alto vacío.

Es soluble en agua, etanol, acetona, cloroformo y acetato de etilo; es ligeramente soluble en benceno y éter etílico; y es insoluble en pentano y hexano. (Química.es, s.f.)

Es estable en medio ácido (aunque puede descomponerse en ciertas circunstancias), en medio alcalino se hidroliza y pierde su actividad biológica; y, además, se reduce en condiciones de fermentación y en presencia de SO₂. (Soriano del Castillo, 2007)

También, presenta un máximo de absorción UV entre 275-276nm que será utilizado en la detección HPLC-UV.

Para el crecimiento del hongo y para la producción de la micotoxina se necesitan diferentes actividades del agua (aw), es decir, la relación entre el agua que presentan los alimentos y la facultad para que los microorganismos proliferen ahí, y diferentes temperaturas. (Tabla 1.4.)

Tabla 1.4. Características necesarias para el crecimiento de hongo y producción de micotoxina. (Adiveter, s.f.)

	TEMPERATURA (°C)	ACTIVIDAD AGUA (aw)
HONGO: <i>Aspergillus clavatus</i>	10	0,85
MICOTOXINA: Patulina	12	0,99

La patulina se ha usado como antibiótico contra bacterias Gram positivas y Gram negativas; además, *se ha demostrado que altera la membrana plasmática, inhibe la síntesis de proteínas, inhibe el transporte de aminoácidos que depende del sodio, interrumpe la traducción y la transcripción, inhibe la síntesis de ADN y al interferón y que produce células T tipo 1.* (Soriano del Castillo, 2007)

1.2.4. Legislación

Según el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, se establecen los siguientes contenidos máximos respecto a la patulina. (Tabla 1.5.)

Tabla 1.5. Contenido máximo de patulina en alimentos en la Unión Europea.
(Comisión de la Unión Europea, 2006)

PRODUCTOS ALIMENTICIOS	CONTENIDOS MÁXIMOS (µg/kg)
Zumos de frutas (normales y concentrados reconstituidos) y néctares de frutas.	50,0
Bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas elaboradas con manzanas o que contengan zumo de manzana.	50,0
Productos sólidos elaborados con manzanas, como compota y puré de manzana destinados al consumo directo (a excepción de los destinados para niños y bebés).	25,0
Zumo de manzana y productos sólidos elaborados a base de manzanas, como compota y puré de manzana destinados a los lactantes y niños de corta edad y vendidos y etiquetados como tales.	10,0
Alimentos infantiles distintos de los alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.	10,0

1.2.5. Técnicas de pretratamiento de muestra

Se recogen, a continuación, varias técnicas cuyo objetivo consiste en extraer y cuantificar la patulina de cualquier muestra, siendo dichas técnicas las más empleadas en los laboratorios de análisis:

- Extracción en fase sólida (SPE)

Se trata de una técnica de tratamiento de muestra para analizar compuestos orgánicos en muestras líquidas.

El procedimiento llevado a cabo es el siguiente: (Fig. 1.7.)

Se debe utilizar un cartucho de vidrio y polietileno donde estará la fase sólida.

Inicialmente, se acondiciona el soporte, activando el sorbente con un disolvente que posee características parecidas a la muestra. Seguidamente, se introduce la muestra en el cartucho y los analitos junto con algunos interferentes quedan retenidos. A continuación, se realiza un lavado para eliminar las interferencias. Finalmente, los analitos se eluyen con un disolvente adecuado y son recogidos.

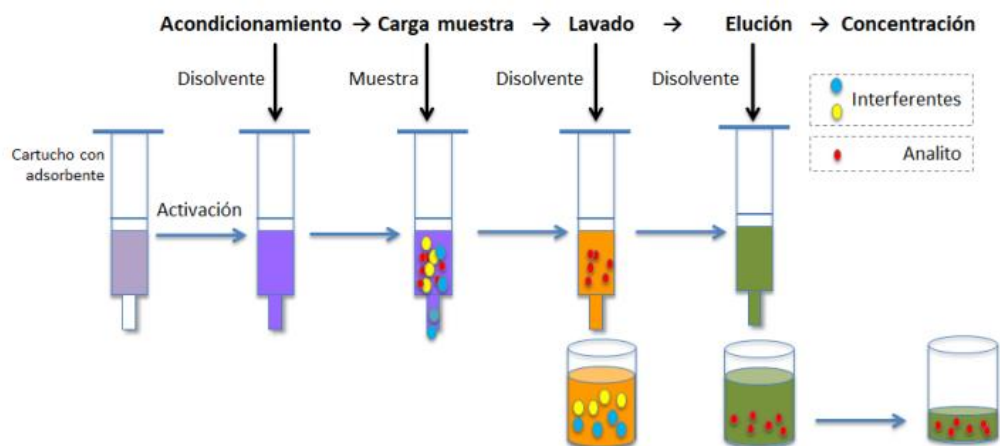


Figura 1.7. Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE).
(Fuentes López et al., 2020)

Por tanto, dicha técnica se basa en la diferencia de afinidad entre el analito por la fase sólida o por la muestra líquida.

La SPE tiene varios inconvenientes, como que es poco selectiva, hay que filtrar la muestra antes de pasarla por el cartucho y hay que evaporar el disolvente; pero su uso tan habitual y efectivo se debe a sus ventajas que son las siguientes:

- Reducido consumo de disolventes.
- Técnica totalmente automática.
- Las muestras se pueden almacenar en los cartuchos.
- Fácil y económico.

· Extracción líquido-líquido (LLE)

Esta técnica extrae, preconcentra y limpia los analitos de las muestras líquidas.

Es importante destacar que los disolventes orgánicos utilizados deben cumplir las siguientes características:

- Tener una alta afinidad por los analitos que queremos separar.
- Ser inmiscibles con la fase acuosa.
- Ser volátiles.

El procedimiento de la técnica es el siguiente: (Fig. 1.8.)

Inicialmente, se añade la muestra líquida a un embudo de decantación y, seguidamente, se añade el disolvente apropiado. A continuación, se agita

dicho embudo de decantación para que las fases entren en contacto. Una vez terminada la agitación, se deja reposar el embudo de decantación sin el tapón para que ambos líquidos se pongan en equilibrio. Finalmente, después del tiempo de reposo, se observarán dos fases en el embudo. Se recogen ambas fases en vasos de precipitados distintos y se utilizará la fase que contenga los analitos.

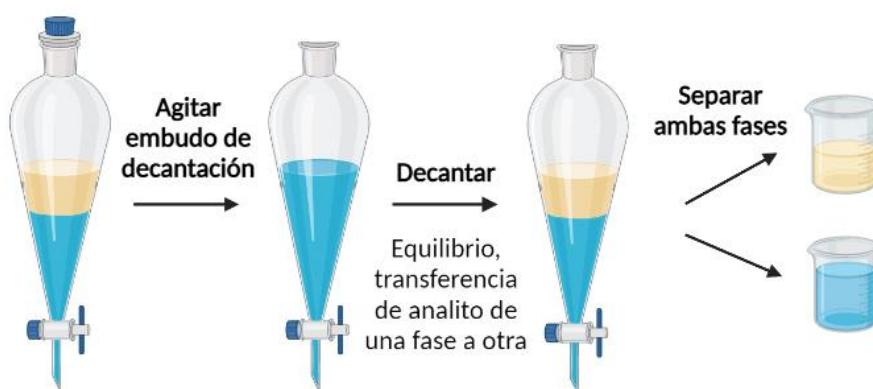


Figura 1.8. Esquema del procedimiento de extracción líquido-líquido (LLE).

(Creación propia) Created with BioRender.com

Con lo cual, esta técnica se basa en la transferencia de un analito desde la muestra a otro disolvente líquido inmiscible con el primero.

La LLE tiene algunos inconvenientes como que es manual, poco selectivo y requiere altos volúmenes de disolvente; pero sus ventajas son:

- Fácil, efectivo y económico.
- Muy altas recuperaciones, con el disolvente adecuado.

· Método QuEChERS

Es una técnica de extracción sólido-líquido, muy utilizada para la extracción de contaminantes en alimentos de origen animal y vegetal. El método se denomina QuEChERS debido a sus características principales “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”, es decir, rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro.

El procedimiento que se lleva a cabo es el siguiente: (Fig. 1.9.)

Inicialmente, se pesa la muestra y se añade a un tubo Falcon, a este se añaden el acetonitrilo (disolvente) y varias sales. Seguidamente, se centrifuga el tubo Falcon y se trasvasa el sobrenadante de este a un tubo

de teflón de extracción en fase sólida dispersiva, al cual se le añade un sorbente y sulfato sódico anhidro. Finalmente, se seca el volumen deseado, si fuera necesario se cambia el disolvente, y se analiza por métodos cromatográficos (HPLC o GC).

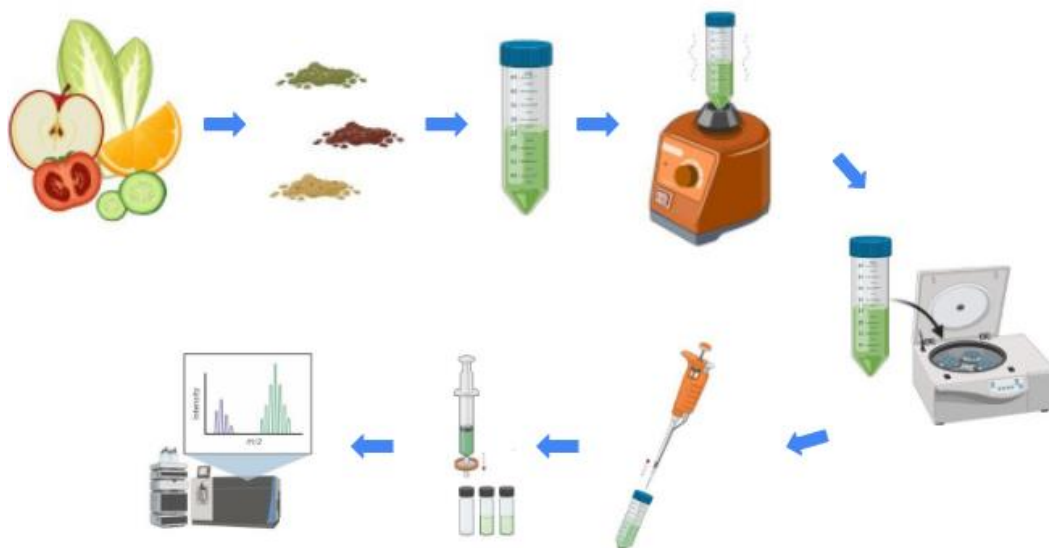


Figura 1.9. Esquema del procedimiento del método QuEChERS.
(Labbox, 2021)

Por tanto, el método QuEChERS *es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE)* que tiene dos etapas principales, inicialmente una extracción simple y, a continuación, una SPE por dispersión para limpiar el extracto. (Fuentes López et al., 2015)

1.2.6. Técnicas de análisis

Las más utilizadas para la determinación de patulina se explican a continuación:

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es una técnica que requiere una instrumentación sofisticada y que relaciona las simples columnas de vidrio, utilizadas en cromatografía clásica, con los procedimientos operativos modernos.

Los componentes básicos de un cromatógrafo HPLC son los siguientes:
(Fig. 1.10.)

Inicialmente, se encuentra la fase móvil, seguida de la bomba. A continuación, está el inyector, que se encuentra a temperatura ambiente, al cual se le inyecta con una jeringa, atravesando un septum, la muestra que se quiere analizar. Seguidamente, se encuentra la columna cromatográfica que alberga la fase estacionaria y, por tanto, es ahí donde se separan los analitos. Finalmente, está el detector adecuado para el análisis y, posteriormente, el registro, que habitualmente es un ordenador donde se almacenan los datos recogidos en el análisis.

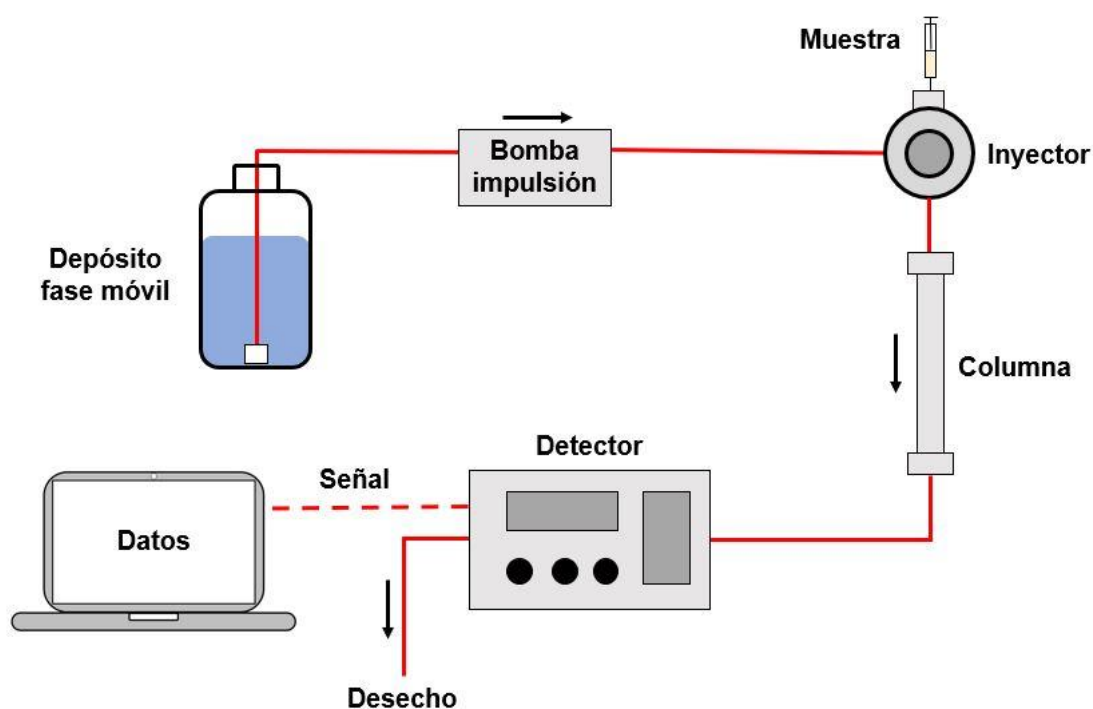


Figura 1.10. Esquema del procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (ApuntesDe, s.f.)

Según el tipo de detector empleado, hay varios tipos de HPLC:

- Cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodo array (HPLC-DAD)

Se utiliza un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector y los datos de absorbancia recogidos se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.

- Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV)

El fundamento de los detectores de absorbancia ultravioleta es la espectrofotometría de absorción y la detección se basa en la ley de Lambert-Beer.

· Cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)

Los espectrómetros de masas están formados por dos o tres analizadores en serie que se encuentran entre la fuente y el detector, facilitando el estudio de las fragmentaciones. Entre dichos analizadores hay una cámara de colisión.

El procedimiento de la técnica es el siguiente: (Fig. 1.11.)

Inicialmente, se inyecta la muestra en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). Seguidamente, la muestra sufre la ionización a presión atmosférica por electrospray (ESI). A continuación, los iones pasan a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Primero, por el analizador de cuadrupolo Q1; después, por el analizador de cuadrupolo Q2, donde se encuentra la cámara de colisión; y, por último, por el analizador de cuadrupolo Q3. Finalmente, la señal llega al detector y los datos son recogidos en el registro del ordenador.

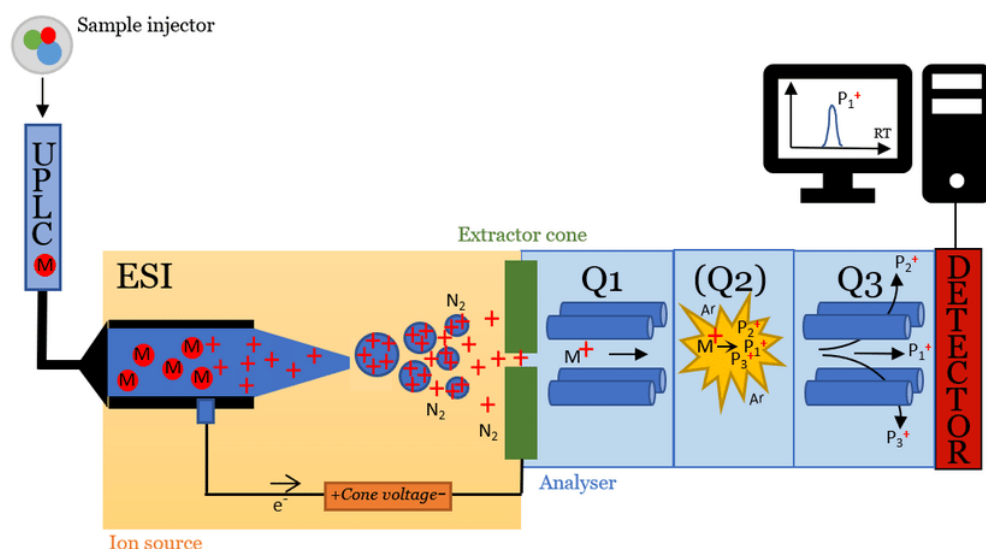


Figura 1.11. Esquema del procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución con espectrofotometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). (Zimdahl Kahlin et al., 2020)

· Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Esta técnica no está a presión atmosférica. La presión en GC es mayor que en MS y es por ello que se utilizan bombas turbomoleculares interiores y bombas mecánicas exteriores. Además, para el paso de GC a MS se utiliza una línea de transferencia calentada para que la muestra no se enfríe y condense.

El procedimiento que se lleva a cabo es el siguiente: (Fig. 1.12.)

Inicialmente, la muestra se inyecta en el cromatógrafo de gases (GC) y pasa por la columna cromatográfica. Seguidamente, las moléculas de analito, en fase gaseosa y en estado neutro, pasan a través de la línea de transferencia calentada que suele estar a 280°C, la cual está conectada a la fuente de ionización que normalmente es de impacto electrónico (EI). A continuación, los analitos pasan por el espectrómetro de masas (MS) y son fragmentados e ionizados. Finalmente, la señal llega al detector y los datos recibidos son almacenados en el registro del ordenador.

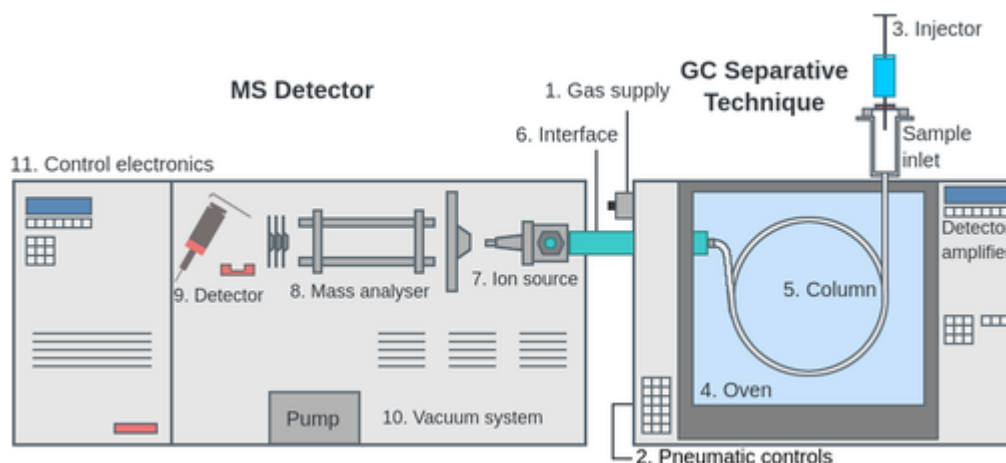


Figura 1.12. Esquema del procedimiento de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). (LABSTER Theory, 2018)

2. OBJETIVOS

Según el Reglamento de los Trabajos Fin de Grado (TFG) en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén *“el TFG supone la realización por parte del alumnado de un proyecto, memoria o estudio en el que se integran y desarrollan contenidos formativos recibidos, y debe estar orientado a la aplicación de competencias asociadas al título de Grado.”* (Universidad de Jaén, 2021)

Además, en la Guía Docente de dicha asignatura se reúnen los principales objetivos a cumplir que tienen que quedar plasmados en dicho trabajo y deben ser los siguientes resultados de aprendizaje:

- Capacidad de integrar creativamente sus conocimientos para resolver un problema químico real.
- Capacidad para estructurar una defensa sólida de los puntos de vista personales apoyándose en conocimientos científicos bien fundados.
- Destreza en la elaboración de informes científicos complejos, bien estructurados y bien redactados.
- Destreza en la presentación oral de un trabajo, utilizando los medios audiovisuales más habituales.

También se recogen en la Guía Docente las distintas competencias que debe tener el alumno, tales como aprendizaje autónomo, razonamiento crítico, conocimiento de una lengua extranjera, capacidad de análisis y síntesis, de organización y planificación, capacidad para gestionar los datos y generar información/conocimiento mediante el uso de las nuevas tecnologías de información y comunicación; así como otras muchas más competencias transversales, generales y específicas.

Con la finalidad de demostrar estos aprendizajes adquiridos durante el Grado en Química, el objetivo fundamental de este TFG es la revisión e investigación bibliográfica de los diferentes métodos de análisis para la determinación de patulina en manzana y sus derivados. Este tema es de especial importancia ya que hay muchos productos alimenticios para lactantes y niños pequeños cuya base principal es la manzana. Por tanto, este trabajo aportará la información necesaria para poder determinar la cantidad de contaminante patulina en dichos alimentos.

3. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo la revisión e investigación bibliográfica sobre los diferentes métodos de análisis para la determinación de contaminantes en alimentos, concretamente de patulina en manzanas, se han utilizado diferentes bases de datos como ScienceDirect, PubMed, Google Académico o Scopus, que han sido una fuente de información veraz y, además, han proporcionado un fácil acceso a los distintos artículos científicos.

Dentro de estas bases de datos hay algunas revistas científicas que han publicado más información sobre los análisis de patulina en manzanas, como son *Food Chemistry*, *Food and Chemical Toxicology*, *Journal of Chromatography A*, o *Toxicology Letters*.

Todo el acceso a dicha información ha sido gracias a la Biblioteca de la Universidad de Jaén, tanto por la información obtenida de libros como de la recopilada de las numerosas bases de datos.

A fin de concretar lo máximo posible la búsqueda de artículos científicos, se han utilizado algunos criterios de selección como el uso de palabras clave, en particular, “*Patulin*”, “*Determination of patulin*” y “*Determination of patulin in apples*”. También se ha especificado la selección de artículos escogiendo tanto el área de química, como los artículos más recientes.

Finalmente, en la Bibliografía (Apartado 7) se recogen todos los artículos científicos, libros y webs que se han empleado para realizar dicho TFG. Esta revisión bibliográfica se ha redactado siguiendo las “Normas de estilo de los TFG de la Facultad de Ciencias Experimentales” de la Universidad de Jaén, y la bibliografía y sus respectivas citas y referencias se han elaborado mediante el uso del gestor bibliográfico de Word.

4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las manzanas son un alimento muy utilizado en nuestro día a día, no solo como fruta, sino también como sus derivados; por ejemplo, compota, zumos o puré. Además, dichos alimentos son muy saludables y recomendados para lactantes y niños de corta edad.

La problemática surge cuando en estos alimentos se produce la proliferación de ciertos hongos que dan lugar a micotoxinas. Concretamente, en las manzanas y sus derivados, la patulina es la micotoxina más abundante, aunque no quiere decir que todas las manzanas que presenten hongos la contengan.

Es de especial importancia resaltar que la presencia de patulina en alimentos no se puede revertir, dicho de otro modo, el alimento no se puede descontaminar, incluso ni mediante el cocinado.



Figura 4.1. Manzana sana y podrida.
(EUROLAB, 2022)



Figura 4.2. Hongo *Penicillium* microscopio.
(Elimina el moho, 2022)

La cantidad permitida por la Unión Europea es ínfima, de 10 a 50 $\mu\text{g/kg}$ dependiendo de para qué y para quién esté destinado el uso del alimento. Esto es debido a que un consumo en mayores cantidades de lo estipulado puede provocar efectos gastrointestinales severos.

En consecuencia, hay que determinar la cantidad de patulina en alimentos compuestos por manzana y desechar los que presenten rangos mayores a los dichos anteriormente ya que son un peligro para la seguridad alimentaria pública.

5. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PATULINA EN MANZANAS

5.1. Toma de muestra

Las manzanas pueden estar presentes en los alimentos de diferentes formas tales como la fruta en sí, zumos, compotas, polvos o purés. Es por ello, que las manzanas que se recogen en los cultivos, algunas se recolectan con maquinaria agrícola y otras se destinan directamente al comercio de fruta fresca.

Una vez que se ha recolectado la cosecha, en las 18 horas posteriores a esta, los productos se deberán refrigerar durante tres a cuatro días a las temperaturas recomendadas por la Comisión de 11 de agosto de 2003 de la Unión Europea: (Tabla 5.1.)

Tabla 5.1. Temperaturas recomendadas para el almacenamiento de manzanas.
(Byrne, 2003)

VARIEDAD	TEMPERATURA (°C)
Bramley	3,0 – 4,0
Cox's orange pippin	3,0 – 3,5
Discovery	1,5 – 2,0
Egremont	3,0 – 3,5
Golden delicious	1,5 – 2,0
Crispin	1,5 – 2,0
Idared	3,5 – 4,0
Jonagold	0,0 – 0,5
Red delicious	0,0 – 1,0
Spartan	0,0 – 0,5
Worcester	0,0 – 1,0

Hay que tener especial cuidado en las magulladuras que pueden provocarse en la fruta ya que eso incrementa la formación de patulina debido a la descomposición del producto.

Habitualmente, los zumos de manzana se tratan térmicamente para eliminar las enzimas y los organismos que llevan a cabo la descomposición. Aunque con dicho tratamiento la patulina no se elimina debido a su estabilidad térmica.

Para realizar el muestreo se necesitan tomar un número mínimo de muestras, tal como nos indica el Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

Concretamente, para los zumos de fruta, bebidas espirituosas y sidra se establece lo siguiente: (Tabla 5.2.)

Tabla 5.2. Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote.
(Kyprianou, 2006)

FORMA DE COMERCIALIZACIÓN	VOLUMEN DEL LOTE (L)	Nº MÍNIMO DE MUESTRAS ELEMENTALES	VOLUMEN MÍNIMO DE MUESTRA GLOBAL (L)
A granel	-	3	1
Botellas/envases	≤ 50	3	1
Botellas/envases	De 50 a 500	5	1
Botellas/envases	> 500	10	1

Y para los productos sólidos a base de manzana y sus zumos, incluyendo aquellos para lactantes y niños de corta edad se establece lo siguiente: (Tabla 5.3.) (Tabla 5.4.)

Tabla 5.3. Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote.
(Kyprianou, 2006)

PESO DEL LOTE (kg)	Nº MÍNIMO DE MUESTRAS ELEMENTALES	PESO DE MUESTRA GLOBAL (kg)
< 50	3	1
De 50 a 500	5	1
> 500	10	1

Tabla 5.4. Número de muestras elementales que deben tomarse para formar una muestra global si el lote está integrado por envases individuales. (Kyprianou, 2006)

Nº DE ENVASES O UNIDADES DEL LOTE	Nº DE ENVASES O UNIDADES QUE DEBEN TOMARSE	PESO DE MUESTRA GLOBAL (kg)
De 1 a 25	1	1
De 26 a 100	(5%) al menos 2	1
> 100	(5%) como máximo 10	1

5.2. Técnicas de extracción y purificación de patulina

Dichas técnicas son utilizadas para adecuar la muestra al método de medida. Por tanto, en el pretratamiento de muestra debe ocurrir lo siguiente:

- Transformación del analito para su uso en un método específico.
- Dilución o concentración de la muestra, para que la concentración del analito se encuentre dentro del rango de la técnica que se utilizará.
- Eliminación de interferencias.
- No perder analito.
- No contaminar la muestra.

Las técnicas de extracción y purificación más empleadas para la determinación de patulina en manzanas, tal y como se ha visto en el apartado 1.2.5., son:

SPE

Dicha técnica fue utilizada en el estudio desarrollado por Dias (Dias et al., 2019). Inicialmente, todas las manzanas fueron molidas y se introdujeron 10 g en un tubo de centrífuga. Seguidamente la muestra se extrajo utilizando acetato de etilo acidificado con ácido acético seguido de una adición de sulfato de sodio. A continuación, se centrifugó la muestra a 4000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, los extractos fueron sometidos a una limpieza en fase sólida dispersiva empleando sulfato de sodio y gel de sílice. Inmediatamente, se agitó la muestra con la mano durante 1 minuto y, después, se centrifugó a 4000 rpm durante 3 minutos. Una vez finalizado dicho procedimiento, se tomó una alícuota de 2 mL que fue evaporada hasta sequedad a 45°C en un concentrador de muestra, y para reconstituir el residuo se utilizaron 0,5 mL de acetonitrilo solución acuosa (25%). Finalmente, la muestra fue analizada por HPLC-MS/MS.

LLE

En el estudio de Al-Hazmi (Al-Hazmi, 2010) se empleó dicha técnica. Inicialmente, a 5 mL de zumo se añadieron 10 mL de acetato de etilo y se agitaron vigorosamente durante 1 minuto en el Vortex, este proceso fue

repetido 3 veces. Seguidamente, se añadieron 2 mL de Na_2CO_3 (1,5%) al envase anterior y se agitó vigorosamente. A continuación, dicho envase fue llevado a sequedad con la adición de 1 g de Na_2SO_4 y, después, fue evaporado bajo la corriente de nitrógeno a 40°C. Posteriormente, el residuo se disolvió en 0,5 mL de ácido acético y, finalmente, esto fue analizado por HPLC con detector UV a 276 nm.

Método QuEChERS

Técnica utilizada por Kharandi (Kharandi et al., 2013). Primero, se vertieron a un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL, 5 mL de la muestra y un volumen conocido de la solución de patulina 10 µg/mL. Se añadieron 15 mL de MeCN y la muestra fue agitada vigorosamente con la mano durante 1 minuto y con el Vortex durante 15 segundos. Seguidamente se añadió una mezcla de $\text{MgSO}_4/\text{NaCl}/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (4:1:0,5 p/p) a la alícuota y se volvió a agitar durante 1 minuto con la mano y durante 15 segundos en el Vortex. Después, la mezcla fue centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. A continuación, en un tubo de polipropileno de 15 mL se añadieron 400 mg de PSA, 1200 mg de MgSO_4 y 11,5 mL de sobrenadante de la anterior disolución; y la muestra se agitó a mano durante 1 minuto y durante 30 segundos en el Vortex. Seguidamente, la mezcla fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, en un vial de cristal se añadieron 9,5 mL de sobrenadante y 150 µL de ácido acético glacial. Finalmente, la muestra fue agitada y evaporada hasta sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno.

A continuación, se presenta una tabla que recoge la investigación bibliográfica llevada a cabo, que comprende un total de 46 artículos científicos. Se recoge principalmente el tratamiento de muestra, técnicas de extracción y purificación, y la técnica analítica empleada, así como el país de procedencia, muestras totales, tipo de muestra, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC): (Tabla 5.5.)

Los artículos están ordenados alfabéticamente por el país de procedencia y, en el caso de varios artículos del mismo país, está ordenado de la fecha de publicación más antigua a la más actual.

Tabla 5.5. Investigación bibliográfica de los análisis sobre las diferentes muestras de patulina.

PAÍS	MUESTRAS TOTALES	TRATAMIENTO	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	TÉCNICA ANALÍTICA	TIPO DE MUESTRA	LD (µg/kg)	LC (µg/kg)	REFERENCIA
Arabia Saudí	51	Almacenar 28°C (5 días)	LLE (acetato de etilo x3 /ácido acético)	HPLC-UV	Zumo	-	-	(Al-Hazmi, 2010)
Australia	-	Almacenar a T ^a ambiente	LLE	GC-MS	Zumo	2 µg/L	5 µg/L	(Xiao & Fu, 2012)
Brasil	19	-	LLE (acetato de etilo/hexano) y evaporar	HPLC-DAD	Zumo	3 µg/L	7 µg/L	(Iha & Sabino, 2006)
Brasil	62	Moler y centrifugar	SPE	HPLC-MS/MS	Fruta Zumo	50 µg/L 12,5	42	(Dias et al., 2019)
Brasil	24	-	LLE (acetonitrilo)	HPLC-MS/MS	Zumo	0,5 µg/L	4 µg/L	(da Silva et al., 2022)
Canadá	-	-	LLE (acetato de etilo) y purificación en columna	GC-ECD-MS*	Zumo	≤ 10 µg/L	-	(Tarter & Scott, 1991)
China	-	-	SPE	HPLC-UV	Zumo	5	-	(Li et al., 2007b)
China	52	Almacenar a 4°C	Añadir acetonitrilo, centrifugar y verter a columna de filtración en fase sólida	HPLC-UV	Zumo	8 µg/L	10 - 23 µg/L	(Li et al., 2007a)

China	-	Almacenar a 4°C	SPE y purificación	MIP-QCM sensor*	Zumo	3,1 µg/L	-	(Fang et al., 2016)
China	7	Zumo: 50 g manzana y 100 mL agua	LLE (acetato de etilo) SD-LLLME*	ID-HPLC-MS/MS*	Zumo	0,5 µg/L	2 µg/L	(Li et al., 2018)
China	-	M. sólida: picar M. líquida: filtrar Almacenar 4°C	MI-SPE*	HPLC-MS/MS	Fruta Zumo	0,09 0,06	0,3 0,2	(Zhao et al., 2019)
China	-	-	LLE (acetato de etilo), centrifugar y filtrar	Fluorescencia AuNCs-MnO ₂ NFs*	Zumo	0,0085 µg/L	-	(Guo et al., 2022)
Corea	13	-	MIP-SPE* y extracción con acetato de etilo	ID-HPLC-MS/MS	Polvo Zumo Puré	0,45 0,33 0,40	1,6 1,10 1,30	(Gab-Allah et al., 2022)
Dinamarca	20	Almacenar a -20°C y 4°C	LLE (acetato de etilo)	MEECK*	Zumo	3,2 µg/L	8,0 µg/L	(Murillo-Arbizu et al., 2008)
España	-	-	LLE (acetato de etilo)	HPLC-DAD	Zumo	8,96 µg/L	-	(Bartolomé et al., 1994)
España	20	Almacenar a 4-5°C	LLE (acetato de etilo)	MEKC-DAD-UV*	Zumo	0,7 µg/L	2,5 µg/L	(Murillo et al., 2008)
España	20	Almacenar a T ^a ambiente (18 - 25°C)	LLE (acetato de etilo)	HPLC	Zumo	0,68 µg/L	1,6 µg/L	(Murillo-Arbizu et al., 2010)

España	-	M. sólida: - M. líquida: diluir y filtrar	M sólida: extracción M. líquida: -	HPLC-MS/MS	Fruta Compota Puré Zumo	2 3 2 15	7 8 6 0,047 mg/L	(Beltrán et al., 2014)
España	-	-	No se realizan	GC-MS/MS	Zumo	0,7	2	(Marsol-Vall et al., 2016)
España	-	Almacenar 4°C Ajustar pH a 7,0	-	Aptasensor FLA*	Zumo	0,36 µg/L	-	(Tang et al., 2022)
Estados Unidos	-	-	LLE (acetato de etilo) y purificación con carbonato de sodio	HPLC-UV (Confirmación resultados con GC/MS)	Zumo	-	-	(Roach et al., 2002)
Francia	31	-	LLE (acetato de etilo/tolueno) y evaporar	HPLC-UV (columna en fase reversa y elución de gradiente)	Zumo	2,4 µg/L	8 - 10 µg/L	(Herry & Lemétayer, 1996)
Francia	-	-	LLE (acetato de etilo) y centrifugar	Aptasensor impedimétrico	Zumo	0,0028 µg/L	0,004 µg/L	(Khan et al., 2019)
Grecia	90	Almacenar a 4°C	LLE y disolución con ácido acético	HPLC-DAD	Zumo	0,23	1,2	(Moukas et al., 2008)
Grecia	90	Almacenar a 4°C	LLE y disolución con ácido acético	GC-MS	Zumo	5,8	13,8	(Moukas et al., 2008)
Irán	-	-	QuEChERS	GC-MS	Zumo	0,4 µg/L	1,3 µg/L	(Kharandi et al., 2013)

Irán	-	-	LLE (acetato de etilo), centrifugar y filtrar	MIP/Fe ₃ O ₄ /GO /GCE*	Zumo	3,33·10 ⁻⁴ nM	0,001 nM	(Afzali et al., 2022)
Israel	-	Esterilizar superficie fruta con 1% NaClO (1 min) y enjuagar en agua destilada estéril. Almacenar 28°C (7-14 días)	No se realizan	HPLC	Fruta	6	18	(Sadhasivam et al., 2021)
Italia	-	-	ELISA*	Fluorescencia NIR*	Fruta	0,06 µg/L	-	(Pennacchio et al., 2015)
Japón	-	-	LLE (acetato de etilo) y SPE	GC-MS	Zumo	0,1	1	(Tabata et al., 2004)
Japón	30	Almacenar a T ^a ambiente Zumo: filtrar	SPME*	HPLC-MS	Zumo	0,0235 µg/L	0,1 µg/L	(Kataoka et al., 2009)
Portugal	33	Almacenar a ± 20°C	Extracción	GC-MS PCR* (P.expansum)	Fruta Zumo	0,4 0,4	1,6	(Cunha et al., 2009)

República Checa	-	Disolver, diluir, centrifugar y filtrar	MI-SPE	CZE-MS/MS*	Zumo	0,3	1	(Moreno-González et al., 2021)
Sudáfrica	-	-	LLE (acetato de etilo) y purificación con carbonato de sodio	HPLC-APCI-MS-MS* (HPLC en fase reversa)	Zumo	4 µg/L	10 µg/L	(Sewram et al., 2000)
Sudáfrica	-	-	-	TLC en fase reversa*	Zumo	100 µg/L	-	(Shephard & Leggott, 2000)
Sudáfrica	-	-	-	GC-MS	Zumo	4-10 µg/L	10 µg/L	(Shephard & Leggott, 2000)
Sudáfrica	-	-	-	HPLC	Zumo	5 µg/L	-	(Shephard & Leggott, 2000)
Sudáfrica	-	-	-	1º) MS alta resolución 2º) GC	Zumo	0,012 µg/L	-	(Shephard & Leggott, 2000)
Turquía	-	-	LLE (acetato de etilo x2) y purificación con carbonato de sodio	HPLC en fase reversa	Zumo	< 5 µg/L	-	(Gökmen & Acar, 1996)
Turquía	-	Diluir	LLE (acetato de etilo x2) y purificación con carbonato de sodio	HPLC en fase reversa	Zumo	< 5 µg/L	-	(Gökmen & Acar, 1999)

Turquía	50	-	Separación en fase reversa y elución	HPLC-UV	Zumo	4,2 µg/L	-	(Dural, 2017)
Turquía	-	Almacenar a 4°C	LLE y centrifugación	DES-UA-LPME*	Zumo	2,2 µg/L	-	(Altunay et al., 2019)
Turquía	-	-	LLE (acetato de etilo x2) y SPE	Nanosensor SPR impreso*	Zumo	0,011 nmol	0,036 nmol	(Çimen et al., 2022)
Washington (EEUU)	10	Zumos sin filtrar: centrifugar	SPE y elución con acetonitrilo en éter etílico anhidro	HPLC-UV (en fase reversa)	Zumo	5 µg/L	-	(Trucksess & Tang, 1999)
Washington (EEUU)	-	Zumos concentrados: diluir con agua	SPE y elución con acetato de etilo en éter etílico	HPLC en fase reversa	Zumo	10 µg/L	-	(Eisele & Gibson, 2003)
Washington (EEUU)	30	Mantener zumo herméticamente tapado y refrigerado	Alcalinizar, LLE (acetato de etilo/hexano), evaporar y resolubilizar con acetonitrilo	GC-MS	Zumo	3 µg/L	10 µg/L	(Marks, 2007)

* **GC-ECD-MS:** GC-MS con detector de captura de electrones. **MIP-QCM sensor:** Quartz Crystal Microbalance sensor based on a sol-gel Molecularly Imprinted Polymer (sensor de microbalance de cristal de cuarzo basado en un polímero sol-gel impreso molecularmente). **SD-LLLME:** Single-Drop Liquid-Liquid-Liquid Microextraction (microextracción líquido-líquido-líquido de una gota). **ID-HPLC-MS/MS:** HPLC-MS/MS with Isotope Dilution (con dilución isotópica). **MI-SPE:** Molecularly Imprinted SPE (SPE impreso molecularmente). **Fluorescencia AuNCs-MnO₂ NFs:** Fluorescencia con nanoclusters de oro. **MIP-SPE:** Molecularly Imprinted Polymer SPE (SPE con polímero impreso molecularmente). **MEECK:** Microemulsion Electrokinetic Chromatography (cromatografía electrocinética de microemulsión). **MEKC-DAD-UV:** Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography method with a Diode-Array Detector using Ultraviolet detection (cromatografía capilar electrocinética micelar con detector de diodo array utilizando detección

ultravioleta). **Aptasensor FLA:** Based Lateral Flow Assay (basado en un ensayo de flujo lateral). **MIP/Fe₃O₄/GO/GCE:** Ionic liquid-based Molecularly Imprinted Polymer and magnetic nanoparticles/Graphene Oxide with a Glassy Carbon Electrode (líquido iónico basado en un polímero impreso molecularmente y nanopartículas magnéticas/ óxido de grafeno con un electrodo de carbono cristalino). **ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). **Fluorescencia NIR:** Fluorescencia en el infrarrojo cercano. **SPME:** Solid-Phase Microextraction (microextracción en fase sólida). **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa. **CZE-MS/MS:** Capillary Electrophoresis coupled with MS/MS (electroforesis capilar acoplada a MS/MS). **HPLC-APCI-MS/MS:** Atmospheric Pressure Chemical Ionization HPLC-MS/MS (HPLC-MS/MS con ionización química a presión atmosférica). **TLC en fase reversa:** Thin-Layer Chromatographic (cromatografía en capa fina con fase reversa). **DES-UA-LPME:** Ultrasound-Assisted Emulsification Liquid Phase Microextraction procedure based on alcohol-based Deep Eutectic Solvent (emulsificación asistida por ultrasonidos con un proceso de microextracción en fase líquida basado en alcohol a base de un disolvente eutéctico profundo). **Nanosensor SPR impreso:** Surface Plasmon Resonance (nanosensor de resonancia superficial del plasmón impreso).

5.3. Técnicas analíticas de detección de patulina

Como se puede observar en la tabla anterior (Tabla 5.5.), hay numerosas técnicas analíticas para la detección de patulina en manzanas y sus derivados. Las más empleadas se detallan, a continuación, con más profundidad.

HPLC

Esta técnica se empleó en el estudio de Sadhasivam (Sadhasivam et al., 2021). Se obtuvo un LD en manzana de 6 µg/kg y un LC de 18 µg/kg. También fue utilizada en España, con un total de 20 muestras de zumo de manzana, por Murillo-Arbizu (Murillo-Arbizu et al., 2010); obteniendo 0,68 µg/L de LD y 1,6 µg/L de LC.

Dependiendo del detector utilizado podemos distinguir entre:

- HPLC-DAD

Técnica utilizada por Bartolomé (Bartolomé et al., 1994). Se obtuvo un LD del zumo de manzana de 8,96 µg/L.

En Brasil, Iha y Sabino (Iha & Sabino, 2006) analizaron 19 muestras de zumo de manzana con esta técnica y lograron un LD de 3 µg/L y un LC de 7 µg/L.

- HPLC-UV

Dicha técnica fue empleada por Li (Li et al., 2007b), consiguiendo un LD del zumo de manzana de 5 µg/L.

Dural (Dural, 2017) analizó 50 muestras de zumo de manzana adquiridos en Turquía empleando esta técnica y consiguió un LD de 4,2 µg/L.

El estudio de Shepard y Leggott (Shephard & Leggott, 2000) se centró en la determinación de patulina con HPLC y compara sus distintos detectores. Llegaron a la conclusión de que el método HPLC con detección UV es rápido y fiable, mientras que el uso del detector de fotodiodo array (DAD) añade confianza al resultado analítico debido a la capacidad de dicho detector para proporcionar la confirmación espectral para la patulina.

HPLC-MS/MS

Técnica empleada por da Silva (da Silva et al., 2022) utilizando 24 muestras de zumo de manzana adquiridas en Brasil. Obtuvo un LD de 0,5 µg/L y un LC de 4 µg/L.

En España también fue utilizada dicha técnica por Beltrán (Beltrán et al., 2014). Se analizaron distintas muestras de manzanas y se consiguieron los siguientes LDs y LCs, respectivamente: en fruta 2 y 7 µg/kg, en compota 3 y 8 µg/kg, en puré 2 y 6 µg/kg, y en zumo 15 µg/kg y 0,047 mg/L.

GC-MS

Esta técnica fue utilizada por Xiao y Fu (Xiao & Fu, 2012) obteniendo un LD del zumo de manzana de 2 µg/L y un LC de 5 µg/L.

También la empleó Marks (Marks, 2007) en un análisis a 30 muestras de zumo de manzana obtenidas en Washington (EEUU), y logró un LD de 3 µg/L y un LC de 10 µg/L.

Li (Li et al., 2017) hizo una comparativa de varias técnicas empleadas para nuestro estudio y concluyó lo siguiente. GC-MS tiene buena selectividad y sensibilidad, mientras que la derivatización adicional puede introducir más desviación. HPLC-UV presenta buena repetibilidad y alta precisión cuantitativa, pero su selectividad puede ser interferida por otros compuestos co-eluyentes. HPLC-MS es potente debido a su combinación de capacidades de separación de cromatografía y a sus capacidades de identificación y confirmación de MS, pero requiere una instrumentación costosa.

En cambio, Moukas (Moukas et al., 2008) hace la comparativa de HPLC-DAD y GC-MS. HPLC-DAD es el método más conveniente para el análisis de rutina y para los fines de investigación, debido a su buena precisión, repetibilidad, reproducibilidad, bajo límite de detección y su bajo coste. GC-MS tiene buena repetibilidad y muy buena resolución de la patulina, por tanto, es útil para resolver los problemas de identificación asociados con el análisis de la patulina en zumos de frutas.

6. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado se recoge la revisión e investigación bibliográfica sobre los métodos de análisis para la determinación de patulina en manzana y sus derivados. Las técnicas analíticas más frecuentemente empleadas en los artículos científicos han sido HPLC, HPLC-MS/MS y GC-MS.

En los artículos expuestos en la Tabla 5.5. se recogen numerosos estudios en los que se introdujeron en la muestra pequeñas concentraciones de patulina para poder determinarla, como en la investigación de Cunha (Cunha et al., 2009), y en otros estudios se dejó la muestra hasta su putrefacción para analizar realmente la cantidad de patulina que contenía la muestra, como sucedió en la investigación de Xiao y Fu (Xiao & Fu, 2012) llevada a cabo en Australia, donde consiguieron cuantificar $1692 (\pm 200)$ $\mu\text{g/L}$ de patulina en zumo de manzana podrido y $828 (\pm 96)$ $\mu\text{g/kg}$ en manzana podrida, mientras que la concentración de patulina en zumo de manzana fresco y envejecido no era detectable. Por tanto, se podría decir que, dependiendo del tipo de muestra, esta puede tener mayor o menor contaminación respecto a la patulina. Con lo cual, en las muestras de zumo de manzana se suele detectar mayor contaminación de patulina que en las propias manzanas.

La mayoría de los artículos utilizados para la realización de este TFG se centran en la puesta a punto de métodos para la determinación de patulina en manzanas y sus derivados, pero 21 de los 46 artículos científicos empleados hacen, además, un análisis real de muestras, siendo así posible saber en qué países se han detectado altos valores de patulina y, por consiguiente, dichos alimentos están contaminados y generan un problema en la salud de los consumidores, especialmente de los lactantes.

En Brasil, Dias (Dias et al., 2019) adquirió manzanas y zumos de manzana en Santa María y les realizó un análisis, el resultado fue que las concentraciones de patulina eran superiores al límite máximo brasileño establecido. Otro estudio, realizado con muestras de Santa María, fue llevado

a cabo por da Silva (da Silva et al., 2022) y ninguna de las 24 muestras analizadas estaba contaminada por patulina.

En China, Zhao (Zhao et al., 2019) realizó un análisis en muestras reales y no detectó presencia de patulina en zumos de manzana. Li (Li et al., 2007a) analizó 52 muestras de zumo de manzana y detectó patulina en 3 de ellas con un rango de concentración entre 63,45 y 88,44 $\mu\text{g/L}$, excediendo, por tanto, los 50 $\mu\text{g/L}$ estipulados por la legislación China.

En España, Murillo-Arbizu (Murillo-Arbizu et al., 2010) analizó 20 muestras de zumo de manzana para niños adquiridas en distintos supermercados y farmacias de Pamplona (Navarra), y el resultado del estudio fue que un 35% de las muestras excedían los valores establecidos por la Unión Europea de 10 $\mu\text{g/L}$ para niños, pero ninguna muestra destinada al consumidor general tenía valores de patulina superiores a 50 $\mu\text{g/L}$. Marsol-Vall (Marsol-Vall et al., 2016) aplicó el análisis a muestras reales y solo 2 muestras contenían concentraciones de patulina de 4,54 y 18,91 $\mu\text{g/kg}$, por tanto, una de ellas estaba por encima del máximo permitido para el consumo infantil.

En Grecia, Moukas (Moukas et al., 2008) analizó 90 muestras de zumo de manzana y el 100% de las muestras contenían patulina, teniendo un rango entre 5,57 y 10,54 $\mu\text{g/kg}$ de patulina. Las muestras más contaminadas fueron 4 zumos concentrados de manzana con un rango de patulina desde 18,10 hasta 36,8 $\mu\text{g/kg}$.

En cuanto a las tres técnicas de extracción y purificación en las que se ha centrado este trabajo (SPE, LLE y método QuEChERS), sin duda, la más empleada en los estudios analizados ha sido LLE, habiéndose utilizado en más de la mitad de las investigaciones. Con dicha técnica se han usado distintos disolventes como ácido acético o acetonitrilo, pero el disolvente más empleado, con diferencia, ha sido el acetato de etilo.

A continuación, se debatirá cual es la mejor técnica analítica para la determinación de la micotoxina patulina en manzanas, zumos, sidras, compotas o purés de la fruta anteriormente mencionada: Para escoger el método más adecuado para la determinación de patulina en

manzana y sus derivados, se han de tener en cuenta los LDs obtenidos en los diferentes estudios científicos plasmados en la Tabla 5.5.

El límite de detección es la mínima cantidad de analito que la técnica puede detectar, por tanto, cuanto menor límite de detección tenga una técnica, esta será más precisa y eficaz.

Seguidamente, se recogen las técnicas de menor a mayor LD empleadas en los artículos estudiados: (Tabla 6.1.)

Tabla 6.1. Técnicas analíticas con menor límite de detección estudiadas.

LÍMITE DE DETECCIÓN	TÉCNICA ANALÍTICA
$3,33 \cdot 10^{-4}$ nM	MIP/Fe ₃ O ₄ /GO/GCE
0,0028 µg/L	Aptasensor impedimétrico
0,0085 µg/L	Fluorescencia AuNCs-MnO ₂ NFs
0,0235 µg/L	HPLC-MS
0,06 µg/kg	HPLC-MS/MS
0,1 µg/kg	GC-MS

Aunque con algunas de estas técnicas se obtenga un LD muy pequeño (tres primeras de la Tabla 6.1.), normalmente las más recientes e innovadoras se emplean menos y se tiende a trabajar con las más comunes, aunque tengan un elevado coste. Por tanto, revisando todas y cada una de las técnicas analíticas que se incluyen en la Tabla 5.5., se ha llegado a la conclusión de que, aunque es ampliamente empleada HPLC-MS/MS debido a los bajos límites de detección obtenidos (ejemplo 0,06 µg/kg para el zumo de manzana y 0,09 µg/kg para la manzana en el estudio de Zhao (Zhao et al., 2019)), la técnica más conveniente para la determinación de patulina en manzana y sus derivados es GC-MS debido a su buena repetibilidad, excelente resolución y sus bajos límites de detección alcanzados (ejemplo 0,1 µg/kg en el estudio de Tabata (Tabata et al., 2004) o 0,4 µg/L en la investigación de Kharandi (Kharandi et al., 2013)).

Aunque se hayan obtenido LDs más bajos en HPLC-MS/MS que en GC-MS, generalmente, se obtienen rangos entre 1 y 6 µg/L e incluso se llega a 50 µg/L. En GC-MS el rango está entre 0,1 y 1 µg/kg, siendo los valores más altos obtenidos 2, 3 y 10 µg/L.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adiveter. (s.f.). *Revisión genérica del problema de los hongos y micotoxinas en alimentación animal*. https://www.adiveter.com/ftp_public/noticia758.pdf
- Afzali, Z., Mohadesi, A., Karimi, M., & Fathirad, F. (2022). A highly selective and sensitive electrochemical sensor based on graphene oxide and molecularly imprinted polymer magnetic nanocomposite for patulin determination. *Microchemical Journal*, 177, 37.
- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, GENCAT. (2021). *Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria: Patulina*. <https://acsa.gencat.cat/es/detall/article/Patulina>
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, AESAN. (2021). *Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición: Micotoxinas*. Ministerio de Consumo, Gobierno de España. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, AESAN. (2021). *Patulina*. Ministerio de Consumo, Gobierno de España.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, AESAN. (s.f.). *Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición: Tipos de micotoxinas*. Ministerio de Consumo, Gobierno de España. <https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subdetalle/micotoxinas.htm>
- Al Wright, S. (2015). Patulin in food. (R. Paterson, Ed.) *Food Science*, 105-109.
- Al-Hazmi, N. (2010). Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, 353-359.

- Altunay, N., Elik, A., & Gürkan, R. (2019). A novel, green and safe ultrasound-assisted emulsification liquid phase microextraction based on alcohol-based deep eutectic solvent for determination of patulin in fruit juices by spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 9.
- ApuntesDe. (s.f.). *ApuntesDe*. <https://apuntesde.es/como-funciona-un-hplc/>
- 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*. Gobierno de España, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid.
- Bartolomé, B., Bengocchca, M., Pérez-Illzarbe, F., Hernández, T., Estrella, I., & Gómez-Cordovés, C. (1994). Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 664, 39-43.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J., & Hernández, F. (2014). Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources. *Food Chemistry*, 142, 400-407.
- Byrne, D. (2003). *Recomendación de la Comisión de 11 de agosto de 2003 relativa a la prevención y la reducción de la contaminación por patulina del zumo de manzana y los ingredientes de zumo de manzana en otras bebidas*. Unión Europea, Comisión de las Comunidades Europeas, Bruselas.
- Çimen, D., Bereli, N., & Denizli, A. (2022). Patulin imprinted nanoparticles decorated surface plasmon resonance chips for patulin detection. *Photonic Sensors*, 12(2), 117-129.
- Comisión de la Unión Europea. (2006). *Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*. Unión Europea, Bruselas.

- Cunha, S., Faria, M., & Fernandes, J. (2009). Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using 13C5–7 patulin as internal standard. *Food Chemistry*, 115, 352-359.
- da Silva, C., Simões, C., Vidal, J., Reghelin, M., de Almeida, C., & Mallmann, C. (2022). Development and validation of an extraction method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine patulin in apple juice. *Food Chemistry*, 366, 7.
- de la Peña, E. (2012). Mutagénesis y Carcinogénesis Química. En M. Repetto (Ed.), *Experto Internacional en Toxicología* (pág. 115). Sevilla.
- Dias, J., da Silva, R., Pizzutti, I., dos Santos, I., Dassi, M., & Cardoso, C. (2019). Patulin in apple and apple juice: Method development, validation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and survey in Brazilian south supermarkets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1-7.
- Dural, E. (2017). Determination of patulin levels in apple juices by HPLC-UV. *Toxicology Letters*, 280, 194.
- Eisele, T., & Gibson, M. (2003). Syringe-cartridge solid-phase extraction method for patulin in apple juice. *Journal of AOAC International*, 86(6), 1160-1163.
- El Sitio Porcino. (2008). *El Sitio Porcino*. (Biomín GmbH, Editor) <https://www.elsitioporcino.com/focus/biomin/2609/compendio-de-micotoxinas-informacion>
- Elimina el moho. (2022). *Elimina el moho*. <https://www.eliminaelmoho.es/penicillium/>
- EUROLAB. (2022). *Servicios de laboratorio de pruebas de confianza*. <https://www.laboratuvar.com/es/gida-analizleri/mikotoksin-analizleri/patulin-tayini-hplc-ve-lc-ms-ms>
- European Food Safety Authority, E. (2021). *EFSA: European Food Safety Authority*. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/mycotoxins>

- Fang, G., Wang, H., Yang, Y., Liu, G., & Wang, S. (2016). Development and application of a quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted sol-gel polymer for rapid detection of patulin in foods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237, 239-246.
- Fuentes López, A., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, C. (2020). *Preparación de muestra mediante la técnica de Extracción en Fase Sólida*. Universitat Politècnica de València, Departamento de Tecnología de los alimentos, Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/145915>.
- Fuentes López, A., García Martínez, E., & Fernández Segovia, I. (2015). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas*. Universitat Politècnica de València, Tecnología de los Alimentos, Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/51363>.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, ELIKA. (2018). *Riesgo de micotoxinas a través del consumo de alimentos*.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, ELIKA. (s.f.). *Contaminantes alimentarios: Micotoxinas*. Gobierno Vasco, Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad.
- Gab-Allah, M., Choi, K., & Kim, B. (2022). Development of isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry as a candidate reference method for the accurate determination of patulin in apple products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414, 1867-1879.
- Gökmen, V., & Acar, J. (1996). Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *Journal of Chromatography A*, 730, 53-58.
- Gökmen, V., & Acar, J. (1999). Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847, 69-74.

- Gómez Ayala, A.E. (2007). Alimentos y micotoxinas. Implicaciones en la seguridad alimentaria. *Farmacia Profesional*, 21(8), 49-53.
- Guo, H., Sun, Y., Ma, P., Khan, I., Duan, N., & Wang, Z. (2022). Sensitive detection of patulin based on DNase I-assisted fluorescent aptasensor by using AuNCs-modified truncated aptamer. *Food Control*, 131, 9.
- Herry, M., & Lemétayer, N. (1996). Liquid chromatography determination of patulin in french apple ciders. *Journal of AOAC International*, 79(5), 1107-1110.
- Iha, M., & Sabino, M. (2006). Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 89(1), 139-143.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2013). *Informe de Resultados de Vigilancia de Laboratorio Micotoxinas en Alimentos*. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud, Chile.
- Instituto Nacional del Cáncer. (s.f.). *NIH: Instituto Nacional del Cáncer*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/mielosupresion>
- Juncker, J.C. (2019). *Reglamento (UE) 2019/1390 de la Comisión de 31 de julio de 2019 que modifica, el anexo del Reglamento (CE) nº 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo*. Unión Europea, Comisión de la Unión Europea, Bruselas.
- Kataoka, H., Itano, M., Ishizaki, A., & Saito, K. (2009). Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3746-3750.
- Khan, R., Aissa, S., Sherazi, T., Catanante, G., Hayat, A., & Marty, J. (2019). Development of an impedimetric aptasensor for label free detection of patulin in apple juice. *Molecules*, 24, 12.

- Kharandi, N., Babri, M., & Azad, J. (2013). A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS. *Food Chemistry*, 141, 1619-1623.
- Kyprianou, M. (2006). *Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios*. Unión Europea, Bruselas.
- Labbox. (2021). *Método QuEChERS para preparación de muestras*. <https://esp.labbox.com/metodo-quechers-para-preparacion-de-muestras/>
- LABSTER Theory. (2018). *Gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)*. <https://theory.labster.com/gcms/>
- Li, F., Zhao, S., Chin, L., Li, Y., Wu, D., Zhao, X., Ji, R. (2007a). Determination of patulin in apple and hawthorn beverages by solid-phase filtration column and liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 90(1), 167-172.
- Li, J., Wu, R., Hu, Q., & Wang, J. (2007b). Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control*, 18, 530-534.
- Li, X., Li, H., Li, X., & Zhang, Q. (2017). Determination of trace patulin in apple-based food matrices. *Food Chemistry*, 233, 290-301.
- Li, X., Li, H., Ma, W., Guo, Z., Li, X., Li, X., & Zhang, Q. (2018). Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 257, 1-6.
- Madonna, R. (2017). Early Diagnosis and Prediction of Anticancer Drug-induced Cardiotoxicity: From Cardiac Imaging to "Omics" Technologies. *Revista Española de Cardiología*, 70(7), 576-582.

- Marks, H. (2007). Rapid gas chromatography/mass spectrometry determination and confirmation of patulin in apple juice. *Journal of AOAC International*, 90(3), 879-883.
- Marsol-Vall, A., Balcells, M., Eras, J., & Canela-Garayoa, R. (2016). A rapid gas chromatography injection-port derivatization method for the tandem mass spectrometric determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1453, 99-104.
- Moake, M., Padilla-Zakour, O., & Worobo, R. (2005). Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 8-21.
- Moreno-González, D., Jáč, P., Riasová, P., & Nováková, L. (2021). In-line molecularly imprinted polymer solid phase extraction-capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry for the determination of patulin in apple-based food. *Food Chemistry*, 334, 1-8.
- Moukas, A., Panagiotopoulou, V., & Markaki, P. (2008). Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food Chemistry*, 109, 860-867.
- Murillo, M., González-Peñas, E., & Amézqueta, S. (2008). Determination of patulin in commercial apple juice by micellar electrokinetic chromatography. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 57-64.
- Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., & Amézqueta, S. (2010). Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for the study of the occurrence of patulin in apple juice intended for infants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2429-2434.
- Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., Hansen, S., Amézqueta, S., & Østergaard, J. (2008). Development and validation of a microemulsion electrokinetic chromatography method for patulin quantification in commercial apple juice. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2251-2257.

Mycotoxinsite. (s.f.). *Micotoxinas: ¿Qué son y qué tipo de micotoxinas existen?*
<https://mycotoxinsite.com/micotoxinas-cuales-son-y-que-tipo-de-micotoxinas-existe/>

Organización Mundial de la Salud, OMS. (2018). *Organización Mundial de la Salud: Micotoxinas.* <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

Pennacchio, A., Varriale, A., Esposito, M., Staiano, M., & D'Auria, S. (2015). A near-infrared fluorescence assay method to detect patulin in food. *Analytical Biochemistry*, 481, 55-59.

Química.es. (s.f.). *Enciclopedia Química: Patulina.*
<https://www.quimica.es/enciclopedia/Patulina.html>

Repetto, M., & Sanz, P. (s.f.). *Glosario de términos toxicológicos IUPAC (Duffus y cols. 1993).* España.

Roach, J., Brause, A., Eisele, T., & Rupp, H. (2002). HPLC detection of patulin in apple juice with GC/MS confirmation of patulin identity. *Mycotoxins and Food Safety*, 135-136.

Ruiz Medina, A. (2022). *Guía docente Trabajo Fin de Grado: Métodos de análisis para la determinación de contaminantes en alimentos.* Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Jaén.

Sadhasivam, S., Barda, O., Zakin, V., Reifen, R., & Sionov, E. (2021). Rapid detection and quantification of patulin and citrinin contamination in fruits. *Molecules*, 26, 8.

Servicio de Seguridad Alimentaria. (2021). *Plan de Control de Peligros Químicos en los Productos Alimenticios*. Junta de Andalucía, Consejería de Salud y Familias.
<https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/plancontrolpeligrosquimicos2021.pdf>

- Sewram, V., Nair, J., Nieuwoudt, T., Leggott, N., & Shephard, G. (2000). Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 897, 365-374.
- Shephard, G., & Leggott, N. (2000). Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 882, 17-22.
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. España: Díaz de Santos.
- Tabata, S., Iida, K., Suzuki, J., Kimura, K., Ibe, A., & Saito, K. (2004). A quantification and confirmation method of patulin in apple juice by GC/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 45(5), 245-249.
- Tang, X., Zhang, Q., Pividori, M., Zhang, Z., Marty, J.-L., & Catanante, G. (2022). A sensitive aptasensor using Biotin-Streptavidin system for patulin detection in apple juice. *Biosensors*, 12, 12.
- Tarter, E., & Scott, P. (1991). Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative. *Journal of Chromatography*, 538, 441-446.
- Trucksess, M., & Tang, Y. (1999). Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. *Journal of AOAC International*, 82(5), 1109-1113.
- Universidad de Jaén. (2017). *Normativa de Trabajos de Fin de Grado, Fin de Máster y otros Trabajos Fin de Título de la Universidad de Jaén*. Jaén.
- Universidad de Jaén. (2021). *Reglamento de los Trabajos Fin de Grado en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén*. Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Jaén.
- WHO, World Health Organization. (1987). *Air Quality Guidelines for Europe* (Vol. 23). Copenhagen: WHO Regional Publications, European Series.

- Xiao, H., & Fu, S. (2012). A sensitive gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of patulin in apple juice. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1709-1712.
- Zhao, M., Shao, H., He, Y., Li, H., Yan, M., Jiang, Z., She, Y. (2019). The determination of patulin from food samples using dual-dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1125, 7.
- Zimdahl Kahlin, A., Helander, S., Wennerstrand, P., Vikingsson, S., Mårtensson, L.-G., & Lindqvist Appell, M. (2021). Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 128, 52-65.