



Universidad de Jaén  
Facultad de Ciencias  
Experimentales

# DETERMINACIÓN DE CITRININA EN CEREALES

Autor: Miguel Ángel Expósito Arenas

Grado: Química

Fecha: 16/07/2024



CEREAL



Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

# DETERMINACIÓN DE CITRININA EN CEREALES

Escaneado con CamScanner

**Alumno/a: Miguel Ángel Expósito Arenas**  
**Jaén, Julio, 2024**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Micotoxinas .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. <i>Concepto y origen</i> .....	2
1.1.2. <i>Tipos</i> .....	4
1.1.3. <i>Toxicidad</i> .....	6
<b>1.2. Citrinina .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. <i>Concepto y origen</i> .....	10
1.2.2. <i>Estructura química</i> .....	11
1.2.3. <i>Propiedades y aplicaciones</i> .....	12
1.2.4. <i>Legislación</i> .....	14
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>16</b>
<b>4. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE CITRININA EN CEREALES .....</b>	<b>18</b>
5.1. <i>Investigación bibliográfica</i> .....	18
5.2. <i>Tratamiento de muestra</i> .....	25
5.3. <i>Técnicas de análisis</i> .....	31
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructura química de la citrinina (Zachetti et al., 2013) .....	11
<b>Figura 1.2.</b> Biosíntesis de citrinina a través de la vía del tetraceto-acetil-CoA en <i>Monascus ruber</i> (de Oliveira Filho et al., 2017) (adaptación de Hajjaj et al., 1999) .....	12
<b>Figura 1.3.</b> Estructuras de citrinina H1 y citrinina H2 (Xu et al., 2006) .....	13
<b>Figura 5.1.</b> Configuración de los cartuchos empleados en la Extracción en Fase Sólida (SPE) (Fuentes López et al., 2020) .....	26
<b>Figura 5.2.</b> Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) (Fuentes López et al., 2020) .....	27
<b>Figura 5.3.</b> Extracción con columnas de inmunoafinidad (Soriano del Castillo, 2007) .....	29
<b>Figura 5.4.</b> Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de HPLC (García de Marina y Yusá, 2016) .....	32
<b>Figura 5.5.</b> Sistema de HPLC (García de Marina y Yusá, 2016) .....	32
<b>Figura 5.6.</b> Esquema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MA) (Vega Bustillos, 2020) .....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Principales tipos de micotoxinas y estructura (Awuchi et al., 2021) ....	4
<b>Tabla 1.2.</b> Principales micotoxinas, hongos productores, efectos tóxicos en personas y alimentos afectados (Awuchi et al., 2021) .....	7
<b>Tabla 1.3.</b> Principales especies productoras de citrinina (Soriano del Castillo, 2007) .....	10
<b>Tabla 1.4.</b> Contenido máximo de citrinina en alimentos establecidos por la Unión Europea (Comisión de la Unión Europea, 2023) .....	14
<b>Tabla 5.1.</b> Investigación bibliográfica sobre la determinación de citrinina (CIT) en cereales (Elaboración propia) .....	19
<b>Tabla 6.1.</b> Técnicas analíticas estudiadas con menor LOD (Elaboración propia) .....	39

## **RESUMEN**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por varias especies de hongos (mohos). Son moléculas de pequeño tamaño que se producen de manera natural e inevitable, por lo que es necesario regular su consumo e identificar diferentes técnicas de análisis para evitar o reducir su toxicidad, ya que causan un efecto negativo sobre la salud pública. Además, se deben cumplir los límites máximos establecidos por la legislación correspondiente, en este caso la Unión Europea. Estas toxinas contaminan los alimentos originando distintas enfermedades sobre la humanidad.

Este Trabajo de Fin de Grado se centra en una micotoxina específica, denominada citrinina. La citrinina tiene efectos nefróticos y mutagénicos, de ahí la importancia para que se estudie. Se encuentra principalmente en cereales y sus derivados, frutas, quesos y café. Este trabajo se centra en recopilar y estudiar los diferentes métodos de análisis para detección y cuantificación de citrinina en cereales, como pueden ser, arroz, arroz fermentado (rojo), maíz o cebada.

## **ABSTRACT**

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by various species of fungi (molds). They are small molecules that occur naturally and inevitable, so it is necessary to regulate their consumption and identify different analysis techniques to avoid or reduce their toxicity, since they cause a negative effect on public health. In addition, the maximum limits established by the corresponding legislation, in this case the European Union, must be complied with. These toxins contaminate foodstuffs, causing different diseases in mankind.

This Final Degree Project focuses on a specific mycotoxin, called citrinin. Citrinin has nephrotic and mutagenic effects, hence the importance of this study. Citrinin is found mainly in cereals and their derivatives, fruits, cheeses and coffee. This work focuses on collecting and studying the different methods of analysis for detection and quantification of citrinin in cereals, such as rice, red fermented rice, corn or barley.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Micotoxinas

### 1.1.1. Concepto y origen

El nombre “micotoxina” combina las palabras griegas “mycos” y toxicum” que significan hongo y veneno/tóxico respectivamente.

Las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas que se definen como metabolitos secundarios tóxicos naturales producidos por diferentes tipos de hongos, conocidos como mohos (Iqbal et al., 2016). Los mohos crecen en una variedad de cultivos y productos alimentarios, como pueden ser cereales, frutos secos, frutas, cacao, frutas desecadas, especias y granos de café. Estos hongos contaminan los cultivos agrícolas durante el cultivo, antes o durante la cosecha, durante el almacenamiento posterior a la cosecha o en el propio alimento cuando se encuentra en entornos cálidos y húmedos. En el mundo, las regiones templadas y tropicales son las más vulnerables a estas micotoxinas, dependiendo de la especie de hongo (Iqbal et al., 2016).

Las micotoxinas pueden contaminar alimentos y piensos, además de las materias primas necesarias para su elaboración. Esto origina una serie de enfermedades tanto para el hombre como para animales en función del hongo que las produce, cuya presencia está condicionada por varios factores como el tipo de alimento, la humedad y la temperatura. Además, el aspecto económico puede verse afectado, ya que sectores como productores de animales, manipuladores y distribuidores de grano, procesadores de cultivos y consumidores pueden sufrir pérdidas económicas (Iqbal et al., 2016).

Los principales géneros que producen micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Es importante tener en cuenta que la presencia de estas micotoxinas en alimentos puede ser individual o simultánea con otras, es decir, puede provocar un aumento de toxicidad debido a la producción de efectos conjuntos en su acción sobre el organismo (Soriano del Castillo, 2007). Una vez que se encuentran en el alimento, éste no se puede descontaminar. Esto es debido a que los alimentos resisten varios procesos como son los de secado, molienda y procesado. Además, no suelen desaparecer mediante el cocinado debido a su estabilidad térmica.

Como ya se ha comentado anteriormente, la humedad y la temperatura son factores cruciales para el desarrollo de hongos productores de micotoxinas. Las condiciones óptimas varían según el tipo de hongo y la micotoxina específica, aunque generalmente, factores físicos, niveles elevados de humedad relativa (por encima del 70-80%) y temperaturas templadas cálidas favorecen el crecimiento fúngico. Existen también factores químicos que afectan a la contaminación, entre los que se incluyen el pH, la cepa de hongos, nutrientes, disponibilidad de oxígeno y la composición del sustrato.

Las enfermedades causadas por micotoxinas pueden ser de carácter agudo (intoxicación) o crónico (inmunodeficiencia y cáncer). La OMS (Organización Mundial de la Salud) en colaboración con el Comité Mixto FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) de Expertos en Aditivos Alimentarios, es el organismo internacional que se encarga de determinar los peligros sanitarios de estos hongos, además de proporcionar una serie de recomendaciones para una protección adecuada.

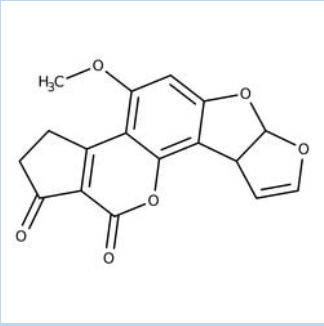
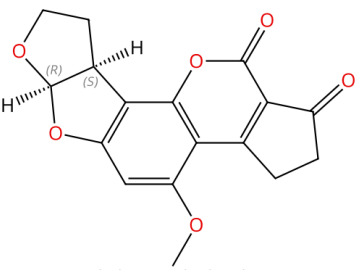
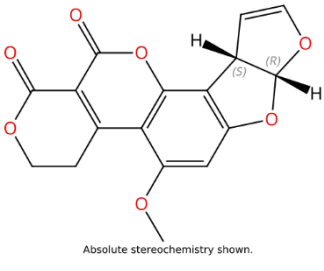
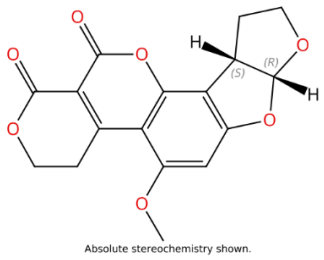
Las enfermedades causadas por intoxicación con micotoxinas se denominan micotoxicosis. Se distinguen dos tipos:

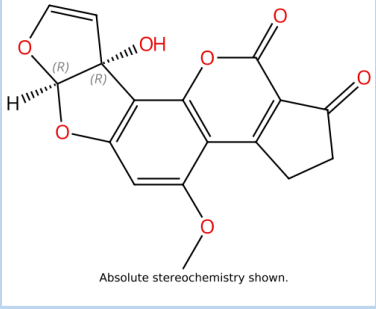
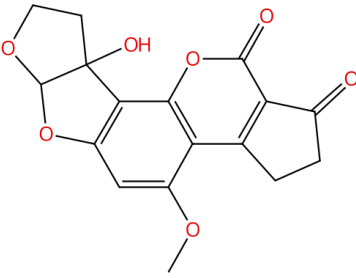
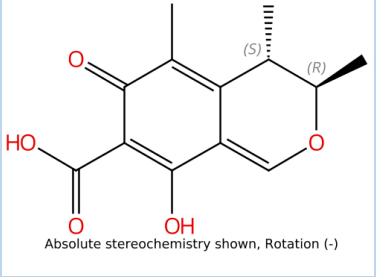
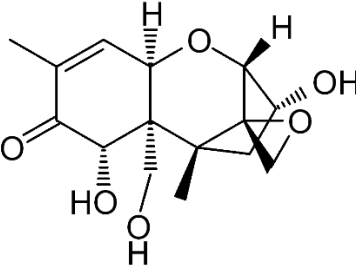
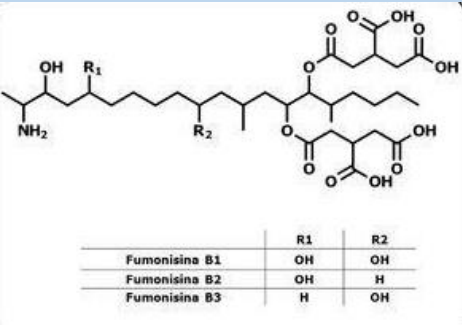
- Micotoxicosis primaria: Enfermedad causada por la directa ingestión, inhalación o contacto directo con las micotoxinas. Es decir, la exposición directa de las micotoxinas presentes en los alimentos, forrajes u otros sustratos contaminados puede provocar este tipo de micotoxicosis.
- Micotoxicosis secundaria: Enfermedad causada por la ingestión humana de productos (leche, carne, huevos, etc) derivados de animales contaminados que previamente han ingerido micotoxinas.

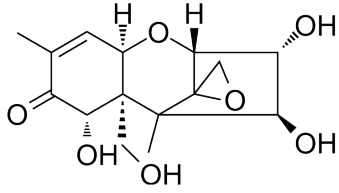
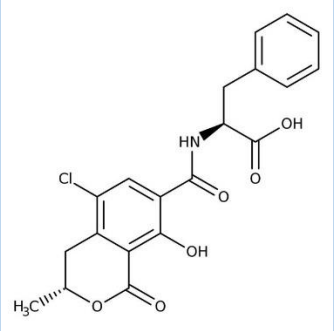
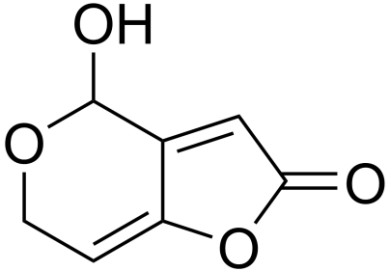
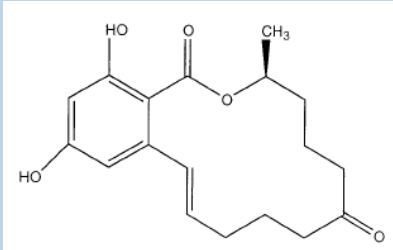
### 1.1.2. Tipos

Se han descubierto miles de metabolitos secundarios fúngicos, pero en la actualidad se han identificado y caracterizado 450 clases de micotoxinas. En la Tabla 1.1 se muestran algunas de las micotoxinas más importantes junto a sus diferentes tipos (si existen).

**Tabla 1.1.** Principales tipos de micotoxinas y estructura (Awuchi et al., 2021)

MICOTOXINA	TIPO	ESTRUCTURA
Aflatoxina	B1	 The structure of Aflatoxin B1 is a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring fused to a five-membered furan ring and a six-membered dihydroisocoumarin ring. A methoxy group (H3C-O) is attached to the furan ring. The dihydroisocoumarin ring has a lactone ring fused to it, which is further substituted with a cyclopentenone ring.
Aflatoxina	B2	 The structure of Aflatoxin B2 is similar to B1 but with a different stereochemistry at the C8 and C9 positions of the dihydroisocoumarin ring. The absolute stereochemistry is shown with (R) and (S) labels. The text "Absolute stereochemistry shown." is present below the structure. Absolute stereochemistry shown.
Aflatoxina	G1	 The structure of Aflatoxin G1 is similar to B1 but with a different stereochemistry at the C8 and C9 positions of the dihydroisocoumarin ring. The absolute stereochemistry is shown with (R) and (S) labels. The text "Absolute stereochemistry shown." is present below the structure. Absolute stereochemistry shown.
Aflatoxina	G2	 The structure of Aflatoxin G2 is similar to B1 but with a different stereochemistry at the C8 and C9 positions of the dihydroisocoumarin ring. The absolute stereochemistry is shown with (R) and (S) labels. The text "Absolute stereochemistry shown." is present below the structure. Absolute stereochemistry shown.

Aflatoxina	M1	 <p>Absolute stereochemistry shown.</p>												
Aflatoxina	M2													
Citrinina	-	 <p>Absolute stereochemistry shown, Rotation (-)</p>												
Deoxinivalenol	-													
Fumonisin	-	 <table border="1" data-bbox="911 1899 1251 1980"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Fumonisin B1</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Fumonisin B2</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Fumonisin B3</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>		R1	R2	Fumonisin B1	OH	OH	Fumonisin B2	OH	H	Fumonisin B3	H	OH
	R1	R2												
Fumonisin B1	OH	OH												
Fumonisin B2	OH	H												
Fumonisin B3	H	OH												

<p><b>Nivalenol</b></p>	<p>-</p>	
<p><b>Ocratoxina</b></p>	<p>A</p>	
<p><b>Patulina</b></p>	<p>-</p>	
<p><b>Zearalenona</b></p>	<p>-</p>	

### 1.1.3. Toxicidad

Las micotoxinas son compuestos químicos altamente tóxicos producidos por hongos y pueden tener consecuencias negativas significativas en la salud humana

y animal. La toxicidad de las micotoxinas varía según el tipo específico de micotoxina, la dosis, duración y la susceptibilidad individual.

Los principales hongos causantes de la problemática de alimentos y piensos con micotoxinas son los miembros de los géneros fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Mientras que las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* crecen con frecuencia en alimentos y piensos en condiciones de almacenamiento, las especies de *Fusarium* suelen infectar cultivos como el trigo, cebada y maíz en el campo y se propagan en la planta (Alshannaq y Yu, 2017).

En la siguiente tabla (Tabla 1.2) se muestran las principales micotoxinas causantes de enfermedades en humanos, hongos productores de las mismas, toxicidad que producen en las personas y alimentos afectados.

**Tabla 1.2.** Principales micotoxinas, hongos productores, efectos tóxicos en personas y alimentos afectados (Awuchi et al., 2021)

MICOTOXINAS	HONGOS PRODUCTORES	EFFECTOS TÓXICOS EN LAS PERSONAS	ALIMENTOS AFECTADOS
<b>Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2)</b>	<i>Aspergillus parasiticus</i> . <i>Aspergillus flavus</i> . <i>Aspergillus nonius</i>	Carcinogénicos Teratogénicos Hepatotóxicos Mutagénicos Genotóxicos Inmunosupresores	Arroz Maíz Cacahuete Legumbres Frutas Semillas de algodón Verduras Frutos secos
<b>Aflatoxina M1</b>	Metabolito de aflatoxina B1	Carcinogénicos	Leche Productos lácteos
<b>Ocratoxinas (A, B, C)</b>	Especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> ( <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> )	Inmunotóxicos Teratogénicos Neurotóxicos Hepatotóxicos Nefrotóxicos Genotóxicos	Trigo Maíz Cebada Harina Cebada Centeno Cacao Queso Frutas Semillas Verduras Frutos secos

<p><b>Tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol)</b></p>	<p>Especies de <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium graminearum</i>, <i>Fusarium culmorum</i>, <i>Fusarium cereales</i>)</p>	<p>Pueden difundirse hacia las células y bloquear la traducción al interactuar con los ribosomas eucariotas. Retención de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, peroxidación lipídica, inhibición de funciones mitocondriales, cambios de neurotransmisores y activación de citosinas.</p>	<p>Arroz Avena Centeno Cebada Maíz Trigo Legumbres Huevos Leche</p>
<p><b>Fumonisin (B1, B2, B3)</b></p>	<p>Especies de <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium verticilloides</i>, <i>Fusarium proliferatum</i>)</p>	<p>Inmunotóxicos Nefrotóxicos Cáncer de esófago y de hígado. Inhibición de la síntesis de esfingolípidos.</p>	<p>Maíz Espárragos Cerveza Arroz Sorgo Soja Frijoles</p>
<p><b>Esterigmatocistina</b></p>	<p>Especies de <i>Aspergillus</i> (<i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aspergillus parasiticus</i>, <i>Aspergillus versicolor</i>)</p>	<p>Teratogénicos Mutagénicos Carcinogénicos</p>	<p>Cacahuets Maíz Cebada Arroz Trigo Productos derivados de cereales</p>
<p><b>Patulina</b></p>	<p><i>Penicillium expansum</i>, <i>Aspergillus clavatus</i>, <i>Penicillium patulum</i>, <i>Penicillium crustosum</i></p>	<p>Mutagénicos Teratogénicos Carcinogénicos Inmunotóxicos Neurotóxicos Hemorragias Úlceras Vómitos Nauseas</p>	<p>Manzana Productos derivados de manzana Frutas Verduras Cereales Legumbres Semillas Frutos secos</p>
<p><b>Zearalenona</b></p>	<p>Especies de <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium graminearum</i>, <i>Fusarium culmorum</i>, <i>Fusarium semitectum</i>)</p>	<p>Estrogénicos Fibromas uterinos Adenomas hipofisarios Inmunotóxicos in vitro</p>	<p>Maíz Soja Arroz Centeno Sorgo Avena Cebada Trigo</p>

			Productos derivados de cereales
<b>Citrinina</b>	<i>Aspergillus, Penicillium expansum y Monascus purpureus</i>	Nefrotóxicos Teratogénicos Genotóxicos	Arroz de levadura roja Centeno Harina Frutas Cereales Café

A continuación se explican algunos de los efectos mencionados en la Tabla 1.2:

- Carcinogénesis: Se refiere a la capacidad que presentan ciertas sustancias de inducir agentes malignos para causar o aumentar el riesgo de cáncer en organismos vivos.
- Teratogenicidad: Capacidad de una sustancia de producir un cambio estructural en el feto.
- Hepatotoxicidad: Capacidad que presentan ciertos medicamentos o suplementos químicos de causar daño o lesiones en el hígado.
- Mutagenicidad: Es la capacidad que tienen agentes externos de causar cambios constantes (normalmente negativos) en el material genético de un organismo. Estos cambios pueden alterar la función y estructura de los genes. Se centra específicamente en la capacidad de inducir mutaciones.
- Genotoxicidad: Capacidad relativa que presenta un agente de producir deterioro en el material genético dentro de una célula, originando efectos biológicos adversos como cáncer, mutaciones y otras enfermedades genéticas.
- Inmunosupresores: Capacidad de ciertas sustancias o medicamentos para reducir la actividad del sistema inmunológico.
- Inmunotoxicidad: Capacidad para afectar negativamente al sistema inmunitario.
- Neurotoxicidad: Alteración sufrida por el sistema nervioso producida por sustancias tóxicas o nocivas (Centro de Medicina Neuro-Regenerativa, 2022).
- Nefrotoxicidad: Afectación renal por tóxicos, que provoca modificaciones funcionales o estructurales.
- Cardiotoxicidad: Capacidad por la que aparece una disfunción del músculo cardíaco, que puede evolucionar a una insuficiencia cardíaca (Madonna, 2017).

## 1.2. Citrinina

### 1.2.1. Concepto y origen

La citrinina se define como un producto secundario del metabolismo fúngico, aislado por primera vez en 1931 por Hetherington y Raistrick. Esta micotoxina fue aislada como una sustancia de color amarillo de un cultivo de *Penicillium citrinum*.

Además, otras especies de hongos de los tres géneros, *Penicillium* (*Penicillium expansum*, *Penicillium verrucosum*), *Aspergillus* (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus niveus*) y *Monascus* (*Monascus ruber*) también producen esta micotoxina (Flajs y Peraica, 2009).

Fue caracterizado como antibiótico en 1941. Sin embargo, debido a sus propiedades tóxicas no puede ser utilizado para aplicaciones terapéuticas. Suele encontrarse junto con otra micotoxina nefrotóxica, la ocratoxina A.

En la siguiente tabla (Tabla 1.3) se muestra las principales especies productoras de citrinina:

**Tabla 1.3.** Principales especies productoras de citrinina (Soriano del Castillo, 2007)

Género	Especie
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus candidus</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus flavipes</i>
<i>Monascus</i>	<i>Monascus purpureus</i> <i>Monascus ruber</i>
<i>Pythium</i>	<i>Pythium ultimum</i>

La citrinina provoca la contaminación de ciertos productos agrícolas, como el maíz, el trigo, la cebada, el arroz y sus productos. Además, se encuentra en otros alimentos aparte de los cereales, que son utilizados en la alimentación animal. Los países occidentales limitan el uso de colorantes alimentarios sintéticos debido a su toxicidad y mutagenicidad.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó la citrinina en el Grupo 3 de carcinógenos debido a las escasas pruebas de su

carcinogenicidad en animales de experimentación y ninguna evidencia en humanos (Flajs y Peraica, 2009).

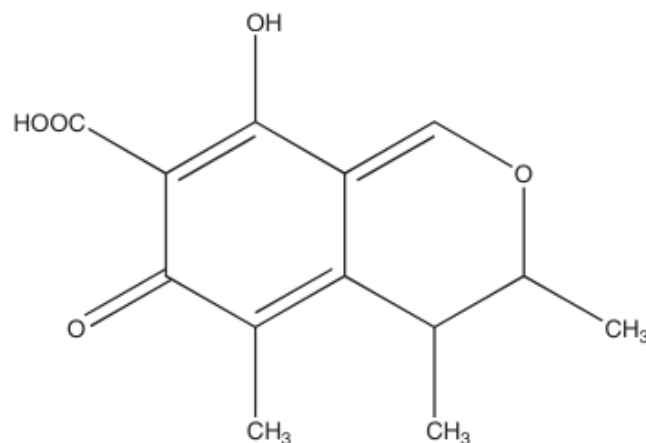
La producción de citrinina está influenciada por varios factores nutritivos como son el suministro de oxígeno, ácidos grasos, fuentes de nitrógeno y carbono, factores ecológicos (como la actividad del agua), temperatura, métodos de conservación y técnicas de almacenamiento de los productos básicos (Zhang et al., 2021).

### 1.2.2. Estructura química

Como ya se ha comentado anteriormente, la citrinina fue aislada originalmente en 1931 por Hetherington y Raistick como una sustancia cristalina de color amarillo. Se identificó como antibiótico y se confirmó su capacidad antifúngica, antiprotozoica y bacteriostática (Soriano del Castillo, 2007).

Su estructura química es compleja y se caracteriza por tener varios grupos funcionales, los cuáles contribuyen a su toxicidad. Su fórmula empírica es  $C_{13}H_{14}O_5$ , cuya nomenclatura proporcionada por la IUPAC es (3R, 4S)-8-hidroxi-3,4,5-trimetil 6-oxo-4,6-dihidro-3H-isocromano-7-ácido carboxílico.

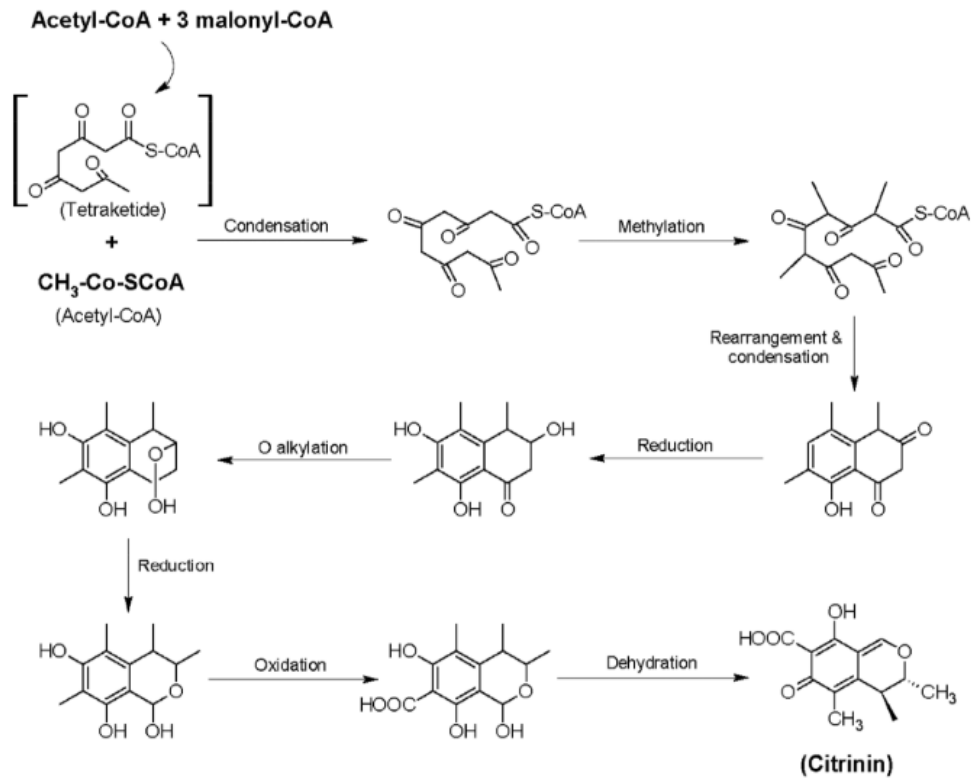
A continuación, se puede observar una figura (Figura 1.1) de la estructura de una molécula de citrinina:



**Figura 1.1.** Estructura química de la citrinina (Zachetti et al., 2013)

La síntesis de la citrinina se lleva a cabo a partir de los siguientes reactivos: 1 molécula de Acetil-coenzima A y 3 moléculas de malonil-coenzima A. En la siguiente figura (Figura 1.2) se puede observar una ruta metabólica constituida por

una sucesión de reacciones en cadena catalizadas por sus correspondientes enzimas, con el fin de sintetizar el producto deseado, en este caso citrinina:



**Figura 1.2** Biosíntesis de citrinina a través de la vía del tetraceto-acetil-CoA en *Monascus ruber* (de Oliveira Filho et al., 2017) (adaptación de Hajjaj et al., 1999)

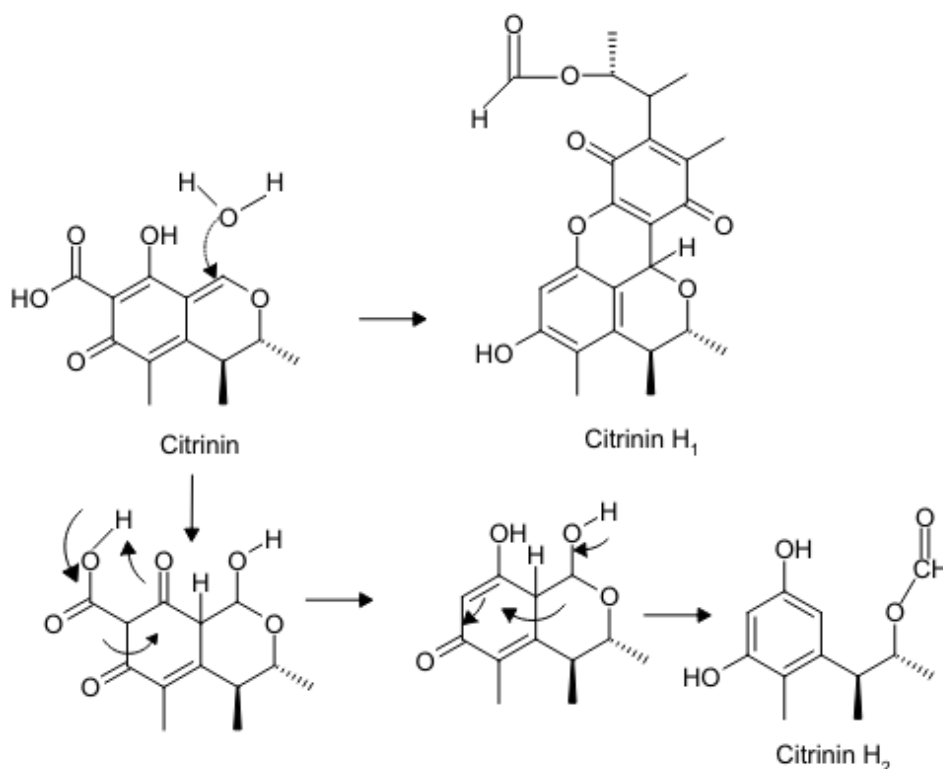
### 1.2.3. *Propiedades y aplicaciones*

La citrinina es un compuesto cristalino de color amarillo limón con un pH de 4,6. Cambia de color a rojo cereza a pH 9,9. Tiene un punto de fusión a una temperatura que alcanza los 175-178°C. Esta micotoxina es prácticamente insoluble en agua fría y poco soluble en agua caliente. Además, es poco soluble en dietiléter y éter de petróleo. Sin embargo, es soluble en hidróxido de sodio acuoso, carbonato de sodio o acetato de sodio, así como en disolventes orgánicos polares como metanol, etanol, cloroformo entre otros (de Oliveira Filho et al., 2017).

Se descompone a 175°C por calentamiento en seco, pero la temperatura de descomposición disminuye a 140°C en presencia de una pequeña cantidad de agua (Flajs y Peraica, 2009). Los productos de descomposición obtenidos son "citrinina H1" y "citrinina H2". El primero de ellos está formado por dos moléculas

de citrinina, el cual muestra un aumento de la citotoxicidad en comparación con el compuesto original, mientras que el segundo de ellos, no muestra citotoxicidad significativa.

En la siguiente figura (Figura 1.3) se pueden observar las estructuras de “citrinina H1” y “citrinina H2”, obtenidas tras calentar la citrinina en agua a una determinada temperatura:



**Figura 1.3.** Estructuras de citrinina H1 y citrinina H2 (Xu et al., 2006)

Su peso molecular es de 250,25 g/mol. La citrinina tiene propiedades antibióticas contra las bacterias grampositivas, sin embargo, nunca se ha utilizado como fármaco debido a su elevada nefrotoxicidad (Flajs y Peraica, 2009), es decir, no puede ser utilizado para aplicaciones terapéuticas.

Además, puede formar complejos de quelatos y degradarse en solución ácido o alcalina, por calentamiento. Estructuralmente, la citrinina es una quinona con dos enlaces de hidrógeno intramoleculares (de Oliveira Filho et al., 2017).

La citrinina tiene carácter fuertemente ácido con dos máximos de absorción ultravioleta a 250 y 333 nm en metanol (Soriano del Castillo, 2007).

#### 1.2.4. Legislación

El límite máximo de citrinina en alimentos varía en función de la región y el alimento a tratar. Actualmente, el principal alimento de exposición a la citrinina es el arroz de levadura roja, que se moldea intencionadamente para fabricar diversos suplementos dietéticos y colorantes alimentarios, principalmente en Asia. Hoy en día, es el único tipo de matriz que se incluye en la legislación de la Unión Europea.

Según el Reglamento (UE) nº 2023/915 de la Comisión del 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1881/2006, se establece el siguiente contenido máximo respecto a la citrinina (Tabla 1.4):

**Tabla 1.4.** Contenido máximo de citrinina en alimentos establecidos por la Unión Europea (Comisión de la Unión Europea, 2023)

<b>PRODUCTOS ALIMENTICIOS</b>	<b>CONTENIDO MÁXIMO DE CITRININA (µg/kg)</b>
<b>Complementos alimenticios a base de arroz fermentado con levadura roja</b> <i>Monascus purpureus</i>	<b>100</b>

Actualmente, este producto alimenticio es el único alimento específico para el cuál se ha establecido un límite máximo de citrinina en la Unión Europea. Por otro lado, China y Japón tienen un límite máximo de 50 y 200 µg/kg de citrinina en arroz de levadura roja, respectivamente (Urraca et al., 2016).

## 2. OBJETIVOS

De acuerdo con el Reglamento de los Trabajos Fin de Grado de la Facultad de Ciencias Experimentales: *“El TFG supone la realización por parte del alumnado de un proyecto, memoria o estudio en el que se integran y desarrollan los contenidos formativos recibidos, y debe estar orientado a la aplicación de competencias asociadas al título de Grado”*, en este caso, Grado en Química (Reglamento de los Trabajos de Fin de Grado en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, 2017).

*“El TFG es una materia del módulo de Proyecto y Trabajo Fin de Grado de formación obligatoria propio del Grado en Química de la Universidad de Jaén. Está orientado a la evaluación de competencias adquiridas a lo largo del Grado y consiste, en esencia, en la realización de un trabajo individual, autónomo y original, bajo la orientación de un/a tutor/a”* (Guía Docente Trabajo Fin de Grado, 2023-2024).

Además, en la Guía Docente se recogen las distintas competencias que debe tener el alumnado, así como los resultados de aprendizaje tras haber realizado el TFG.

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Grado es llevar a cabo una revisión e investigación bibliográfica de las diferentes técnicas de análisis para la determinación de contaminantes y sustancias tóxicas en alimentos. En este caso, la sustancia tóxica a tratar es la citrinina, por tanto, la revisión bibliográfica va a estar enfocada en la presencia de ésta principalmente en cereales, como pueden ser el arroz, arroz fermentado (comúnmente conocido como arroz rojo), maíz, cebada y trigo.

Previamente se hará una revisión bibliográfica de los diferentes aspectos de la micotoxina a tratar, entre los que se encuentran el concepto y origen, estructura química, propiedades y aplicaciones, legislación y técnicas de tratamiento de muestra.

Es muy importante conocer los efectos que puede provocar en la salud humana la presencia de citrinina en cereales ya que son alimentos que se consumen habitualmente, por tanto, es esencial su investigación para proteger la salud pública, garantizar la seguridad alimentaria, cumplir con las regulaciones y normativas y preservar la calidad del producto.

### 3. METODOLOGÍA

La metodología para llevar a cabo la revisión e investigación bibliográfica de los diferentes contaminantes y sustancias tóxicas en alimentos, concretamente de citrinina en arroz, ha sido realizar una búsqueda de artículos científicos publicados en diferentes bases de datos como pueden ser Google Académico, ScienceDirect, SciFinder o Scopus. Estas bases de datos han sido de gran ayuda y han proporcionado la búsqueda sencilla de información suficiente para poder llevar a cabo este TFG, y así poder cumplir los objetivos buscados.

El acceso a dichas bases de datos se ha realizado mediante el servicio digital de Biblioteca de la Universidad de Jaén, ya que gracias a dicho servicio se ha podido acceder a diferentes artículos científicos, revistas y libros que han proporcionado la información propuesta.

Con el objetivo de concretar y delimitar la búsqueda de artículos lo máximo posible, se han utilizado algunos criterios de selección, como puede ser el uso de palabras clave. En particular, se ha utilizado *“Citrinin”*, *“Citrinin and rice”*, *“Determination of citrinin”* y *“Determination of citrinin in rice”*. Además, para realizar la búsqueda se ha estrechado el intervalo de tiempo, seleccionando los artículos generalmente de los últimos 10 años (aproximadamente desde 2014 hasta hoy). Siempre me he centrado en el área de Química, con el objeto de limitar igualmente la búsqueda. No obstante, se han seleccionado algunos artículos de años anteriores a 2014, debido a la dificultad de la búsqueda con respecto a las técnicas de análisis de citrinina en alimentos y con el objetivo de tener una amplia variedad de información sobre diferentes técnicas.

Todos los artículos científicos, páginas webs, revistas y libros que se han empleado para esta revisión bibliográfica, así como sus respectivas citas, quedan recogidos en el apartado de *“Bibliografía”* (Apartado 7), haciendo uso del gestor bibliográfico de Word. Por último, este TFG ha sido redactado siguiendo el documento de *“Normas de estilo de los TFG de la Facultad de Ciencias Experimentales”* de la Universidad de Jaén.

#### **4. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Los cereales son alimentos muy utilizados en nuestra vida debido a los grandes beneficios que pueden aportar, además se incorporan en la dieta con gran regularidad, siendo una fuente muy importante de energía. Por ello, son utilizados prácticamente en el día a día, ya sea en forma de arroz, trigo, maíz, etc. Por tanto, tienen una gran variedad de aplicaciones, como puede ser alimentación, industria e incluso aspectos culturales.

La problemática surge cuando en los cereales aparecen ciertos hongos que pueden dar lugar a la producción de micotoxinas, las cuáles pueden provocar graves efectos negativos tanto en la salud humana como animal debido a su toxicidad y a su gran capacidad para generar enfermedades de distintos tipos, lo que resulta un aspecto a tener en cuenta y por consiguiente, la necesidad de buscar soluciones para evitar o reducir estos problemas. Además de los problemas de salud causados por la presencia de micotoxinas en cereales, éstas pueden provocar también problemas en el comercio internacional y en la economía, pues se producen pérdidas tanto en producción como en costos de control, al no garantizar una cierta seguridad en su consumo.

En los cereales, una micotoxina que predomina es la citrinina, la cual puede provocar graves problemas de seguridad alimentaria, reduciendo la calidad nutricional de estos alimentos y por tanto disminuyendo su seguridad. Por tanto, es esencial determinar la cantidad de citrinina presente en cereales, con objeto de garantizar una gran seguridad y eficiencia en estos alimentos.

Para garantizar esta seguridad y además cumplir con las normativas internacionales propuestas, muchos países han establecido unos límites de cantidad máxima permitida de citrinina en cereales. No obstante, no sólo se han de cumplir los límites establecidos, sino que además, el tratamiento de la muestra debe ser el correcto, llevando a cabo técnicas preventivas y un control riguroso del producto alimenticio a tratar, con el objetivo de poder cumplir estos límites y garantizar la seguridad en el consumidor. Para ello, se han desarrollado varias técnicas de análisis que permiten determinar la cantidad de citrinina presente en un número variado de muestras.

Como se ha comentado anteriormente, el contenido máximo de citrinina en alimentos establecido por la Unión Europea es de 100 µg/kg para complementos alimenticios a base de arroz fermentado.

## **5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE CITRININA EN CEREALES**

### **5.1. Investigación bibliográfica**

En la tabla 5.1 se recoge la investigación bibliográfica llevada a cabo, que comprende un total de 36 artículos sobre las diferentes técnicas de análisis de citrinina en cereales (arroz, arroz rojo fermentado, maíz y trigo). En dicha tabla se recoge principalmente el país de procedencia de las muestras analizadas, número de muestras totales, tipo de muestra (matriz), tratamiento de muestra, técnicas de extracción y purificación, técnica de análisis, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y referencia del artículo correspondiente.

El LOD se define como la menor cantidad de sustancia o analito que puede ser detectada con un cierto nivel de fiabilidad por un método analítico determinado. Mientras que, el LOQ es la menor cantidad de sustancia o analito que puede ser cuantificada con un nivel aceptable de precisión y exactitud por un método analítico particular.

Los artículos están ordenados alfabéticamente por el país de procedencia. En el caso de los artículos del mismo país, están ordenados de la fecha más antigua de publicación del artículo a la fecha más actual.

**Tabla 5.1.** Investigación bibliográfica sobre la determinación de citrinina en cereales (Elaboración propia)

PAÍS	MUESTRAS TOTALES	PRETRATAMIENTO	TÉCNICA EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN	TÉCNICA ANÁLISIS	TIPO DE MUESTRA	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	REFERENCIA
Alemania	-	-	Extracción S-L (100 mL diclorometano y 10 mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,5M) y posterior SPE*	HPLC-FLD*	Trigo	0,8	3,2	(Meister, 2004)
Argentina	2	Humedecer con agua (40:60 p/p), almacenamiento (25°C)	Extracción S-L (acetónitrilo:cloruro de potasio 4%, 9:1 v/v)	IEM*	Arroz	0,1 ng/L	0,5 ng/L	(Arévalo et al., 2011)
Argentina	5	Humedecer con agua (40:60 p/p), almacenamiento (25°C)	Extracción S-L (acetónitrilo:cloruro de potasio 4%, 9:1 v/v)	BAP*	Arroz	0,25 nM	0,75 nM	(Zachetti et al., 2013)
Bélgica	-	Almacenamiento (-20°C)	Extracción S-L (acetónitrilo:ácido acético, 99:1 v/v)	LC-MS/MS*	Arroz levadura roja	1	2	(Meerpoel et al., 2018)
Bélgica	12	Secado (40-50°C), molienda y tamizado. Almacenamiento (-20°C)	Extracción S-L (acetato de etilo:acetónitrilo:ácido acético glacial, 75:24:1 v/v/v) y posterior centrifugación	LC-MS/MS	Arroz	0,8	2,5	(Tangni et al., 2021)
Bélgica	14	Molienda y almacenamiento (-20°C)	Extracción S-L (metanol:agua:ácido acético, 80:18:2 v/v/v)	LC-MS/MS	Arroz	0,05	0,1	(Meerpoel et al., 2021)

Brasil	38	Molienda y tamizado	QuEChERS* (ligeramente modificado)	HPLC-PDA*	Arroz	0,7	2,4	(Hackbart et al., 2012)
Burkina Faso	26	Almacenamiento (4°C)	Extracción S-L (acetonitrilo:agua:ácido acético, 79:20:1 v/v/v)	LC-MS/MS	Maíz	250	-	(Warth et al., 2012)
Canadá	37	Molienda	Extracción S-L (acetonitrilo:agua:ácido acético, 79:20:1 v/v/v)	ESI-MS/MS*	Trigo	0,6	1,4	(Limay-Rios et al., 2017)
China	-	Molienda	SPE + purificación	HPLC-FLD	Trigo	0,6-0,9	1,7-3,3	(Hartl & Stenzel, 2007)
China	18	Molienda	Extracción S-L (tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico, 7:3:1 v/v/v) x3 + centrifugación	HPLC-FLD	Arroz levadura roja	0,187 ng/mL	0,6 ng/mL	(Xue-Mei et al., 2012)
China	59	Molienda y almacenamiento (-20°C)	Extracción S-L (metanol:agua, 70:30 v/v) y posterior centrifugación. Purificación en IAC*	HPLC-FLD	Arroz levadura roja	0,8	2	(Li et al., 2012)
China	-	-	Extracción S-L (etanol:agua, 7:3 v/v) y posterior centrifugación y filtración	HPLC-FLD	Arroz fermentado rojo	-	-	(Wang et al., 2014)
China	12	-	Extracción S-L (25 mL metanol) y posterior centrifugación	LC-MS/MS	Arroz fermentado rojo	1	2	(Ji et al., 2015)

China	9	Molienda	Extracción S-L (100% metanol) + purificación con IAC	LC-FLD*	Arroz levadura roja	2	10	(Marley et al., 2016)
China	-	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 2:8 v/v)	IC-ELISA* y tiras ICA* de flujo lateral	Maíz, trigo y arroz	1,28 - 1,86	-	(Kong et al., 2017)
Corea	10	Molienda	Extracción S-L (acetona:acetato de etilo, 50:50 v/v) + centrifugación. Purificación (2,5 mL etanol)	HPLC*	Arroz	0,64 - 112,27	-	(Kim et al., 2007)
Croacia	7	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 80:20 v/v) + agitación	HPLC-FLD	Arroz levadura roja (suplemento)	0,03 µg/mL	0,08 µg/mL	(Nigovic et al., 2013)
Croacia	15	Almacenamiento en silos	Extracción S-L (metanolona 70%) + centrifugación. Purificación con SPE	HPLC-FLD	Maíz	-	< 1	(Culig et al., 2017)
Croacia	2	-	Extracción S-L (metanol 80%) + centrifugación + filtración	LC-DAD-FD-MS*	Granos de arroz rojo fermentado	0,0005 µg/mL	0,001 µg/mL	(Silva et al., 2020)
Escocia	6	-	Extracción S-L (metanol 75%) + filtración. Limpieza con IAC	HPLC-FLD	Cereales infantiles	0,1	0,25	(Mair et al., 2021)
España	-	Molienda	Extracción S-L (metanol:agua, 7:3 v/v) + filtración. Limpieza con m-MISPE*	HPLC-UV-DAD*	Arroz	0,7	2,3	(Urraca et al., 2016)

España	8	-	QuEChERS	UPLC-FLD*	Arroz integral	1,5	5	(Silva et al., 2020)
Francia	45	Trituración	Extracción S-L (solución acuosa KCl 4%) y posterior extracción L-L (acetonitrilo 190 mL)	HPLC-FLD	Cereales desayuno	0,5	1,5	(Molinié et al., 2005)
Malasia	50	Almacenamiento en frío	Extracción S-L (metanol 70%) y posterior centrifugación Limpieza con IAC	ELISA*	Arroz rojo	-	0,23-20,65	(Samsudin & Abdullah, 2013)
Polonia	15	-	Extracción S-L (metanol:agua, 7:3 v/v) y posterior filtración Limpieza con IAC	HPLC-FLD	Arroz levadura roja	16	26	(Twaruzek et al., 2021)
Serbia	-	Molienda	Extracción S-L (acetonitrilo:agua:ácido acético 79:20:1 v/v/v) y posterior filtración Limpieza con cartuchos EMR*	LC-MS/MS	Arroz rojo	-	-	(Vukovic et al., 2019)
Serbia	204	Homogeneización y posterior molienda Almacenamiento (-20°C)	Extracción S-L (acetonitrilo:agua:ácido acético v/v/v) y posterior agitación y centrifugación	LC-MS/MS	Maíz	0,16	-	(Kos et al., 2020)
Tailandia	-	Molienda y cocido al vapor (121°C)	Extracción S-L (etanol:agua, 70:30 v/v) + filtración	HPLC-FLD	Arroz levadura roja	-	-	(Jirasatid et al., 2019)

		Cultivar (30°C) durante 14 días						
Taiwán	6	Molienda	Extracción S-L (2 mL cloroformo)	GC-SIM*	Arroz rojo	1 µg/L	-	(Shu & Lin, 2002)
Taiwán	-	Molienda y almacenamiento (-30°C)	Extracción S-L (metanol:agua, 70:30 v/v) Purificación con IAC	HPLC-FLD	Arroz rojo	-	-	(Sato et al., 2010)
Taiwán	2	-	Extracción S-L (etanol:agua, 75:25 v/v) y posterior filtración	HPLC-FLD	Arroz con moho rojo (RMR)	-	-	(Wu et al., 2011)
Taiwán	84	Molienda y almacenamiento (4°C) en bolsas selladas	Extracción S-L (20 mL metanol) + calentamiento en baño de agua	HPLC-FLD LC-MS/MS	Arroz levadura roja	0,02 µg/mL	0,05 µg/mL	(Liao et al., 2014)
Túnez	200	Almacenamiento (4°C) en bolsas de plástico	Extracción S-L (acetonitrilo 4%:cloruro de potasio, 90:10 v/v) + filtración	HPLC-FLD	Trigo	0,25	1	(Zaied et al., 2012)
Turquía	-	-	Extracción S-L (1 mL TCA, 10% m/v) Dilución con tampón fosfato 0,1M	SPR biosensor*	Arroz levadura roja	0,0017 ng/mL	0,005 ng/mL	(Atar et al., 2015)
Vietnam	100	Almacenamiento (-20°C) en bolsas de polietileno	Extracción S-L (acetonitrilo:cloruro de potasio 4%, 9:1 v/v)	HPLC-FLD	Arroz	0,11	0,35	(Nguyen et al., 2007)

\* **HPLC-FLD**: cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia. **SPE**: extracción en fase sólida. **IEM**: inmunosensor electroquímico microfluídico. **BAP**: biosensor amperométrico basado en peroxidasas. **LC-MS/MS**: cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem. **QuEChERS**: Extracción en fase sólida dispersiva. **HPLC-PDA**: cromatografía líquida de alta resolución con detector de fotodiodo array. **ESI-MS**: espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray. **IAC**: columna de inmunoafinidad. **LC-FLD**: cromatografía líquida con detector de fluorescencia. **IC-ELISA**: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo por inhibición. **ICA**: ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. **HPLC**: cromatografía líquida de alta resolución. **LC-DAD-FD-MS**: cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos, fluorescencia y espectrometría de masas. m-MISPE: extracción en fase sólida con polímeros magnéticos de impresión molecular. **HPLC-UV-DAD**: cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por matriz de diodos ultravioleta. **UPLC-FLD**: cromatografía líquida de ultra eficiencia con detector de fluorescencia. **ELISA**: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. **EMR**: cartuchos de extracción en fase sólida con un enfoque particular en la resistencia electromagnética. **GC-SIM**: cromatografía de gases con monitoreo de iones seleccionados. **SPR biosensor**: biosensor de resonancia de plasmón superficial con impresión molecular.

## 5.2. Tratamiento de muestra

Para llevar a cabo la determinación de citrinina en cereales, como el arroz, arroz de levadura roja, maíz o trigo, es necesario que la muestra se trate con determinadas técnicas de extracción y purificación. Como se ha comentado anteriormente, las técnicas de extracción y purificación más empleadas habitualmente son: SLE, SPE, QuEChERS e IAC. A continuación, se recoge una introducción de cada uno de los tratamientos citados, seguido de ejemplos de artículos en los que se aplican, teniendo en cuenta los artículos estudiados (Tabla 5.1).

### Extracción sólido-líquido (SLE)

La técnica de SLE, también conocida como lixiviación, es una técnica que consiste en separar constituyentes solubles de una mezcla sólida previamente tratada, utilizando un disolvente o mezcla de disolventes adecuados para ello. Para elegir el mejor disolvente se tendrá en cuenta la polaridad de los analitos que se desean separar, los cuáles deben tener una gran afinidad por este disolvente.

Para llevar a cabo este tipo de extracción, la muestra se pone en contacto con un disolvente o mezcla de disolventes (extractante) con el objetivo de disminuir las interacciones analito-matriz e incrementar las interacciones analito-extractante, y así obtener la mayor cantidad posible de analito y la mínima de interferentes.

Como ya se ha comentado anteriormente, la citrinina es soluble en disolventes orgánicos polares. Los disolventes más utilizados para este tipo de extracciones son mezclas de agua con disolventes orgánicos, como pueden ser el metanol o acetonitrilo entre muchos otros, debido a que estos tienen una alta capacidad para disolver la citrinina.

Esta técnica suele complementarse con una técnica de purificación y concentración como puede ser la extracción en fase sólida (SPE) para asegurar resultados válidos y precisos. Aun así, la extracción sólido-líquido es un método utilizado habitualmente ya que es económico y sencillo.

La técnica de SLE es la técnica más empleada de entre todos los artículos investigados. Prácticamente todos los artículos investigados utilizan esta técnica como método de extracción y purificación, utilizando diferentes mezclas de

disolventes, como puede ser metanol, agua, acetonitrilo, cloruro de potasio, acetato de etilo o ácido acético.

Un ejemplo del procedimiento habitual de SLE es el que se realizó en el estudio desarrollado por Li Xue-Mei (Xue-Mei et al., 2012). En primer lugar, las muestras de arroz de levadura roja se molieron. A continuación, 1,5 gramos de polvo de muestra se transfirieron a un tubo de centrifuga PTEE de 15 ml. Seguidamente se realizó la extracción sólido-líquido con 10 ml de una mezcla de tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico (7:3:1, v/v/v) durante 20 minutos. El proceso se repitió 3 veces. La solución de extracto se centrifugó para eliminar los residuos no disueltos y el sobrenadante se evaporó al vacío para obtener el extracto crudo enriquecido de citrinina. Este extracto crudo se diluyó en 10 ml de metanol y se filtró a través de un filtro de membrana para su detección por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD).

#### Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica basada en la retención selectiva de los analitos de interés (que se encuentran en disolución) sobre una fase sólida inmóvil en el interior de un cartucho con forma de jeringuilla (columna de extracción o cartucho SPE), mientras que el resto de los componentes de la matriz se eluyen. La siguiente figura (Figura 5.1) muestra que los cartuchos que se utilizan están fabricados con polipropileno y vidrio.

Esta técnica permite tanto purificar como preconcentrar los componentes de interés con el riesgo mínimo de pérdidas o contaminaciones. *“En realidad, este tipo de preparación de muestra es una forma de cromatografía, que consigue separar selectivamente los analitos de los interferentes de la matriz”* (Fuentes López et al., 2020)

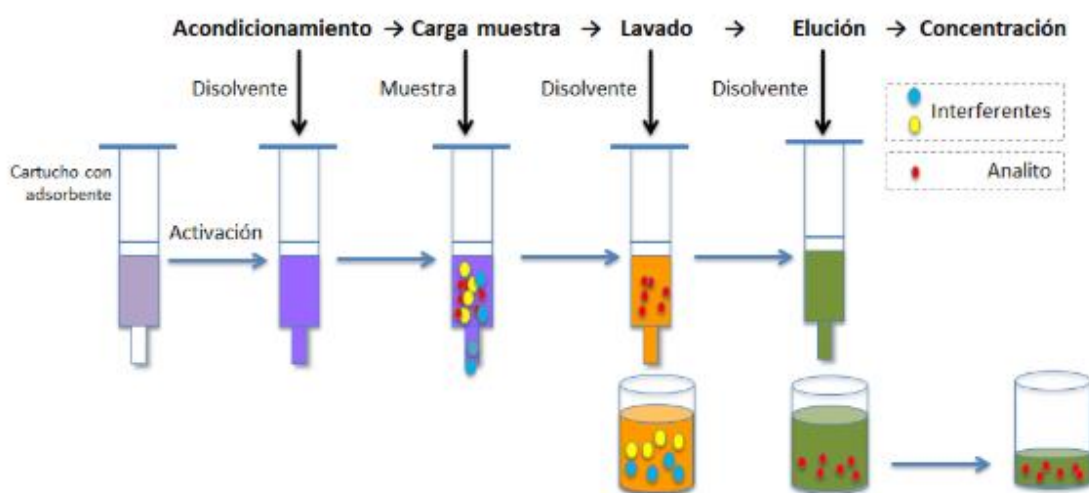


**Figura 5.1.** Configuración de los cartuchos empleados en la Extracción en Fase Sólida (SPE)  
(Fuentes Lopez et al., 2020)

Para llevar a cabo esta técnica deben de seguirse los siguientes pasos:

- Acondicionamiento de la fase sólida: El cartucho se acondiciona con un disolvente adecuado con el objetivo de que el sorbente se encuentre en una fase óptima para retener los analitos que se buscan.
- Carga de la muestra: La solución de carga que contiene el analito se hace pasar a través de la fase sólida (sorbente acondicionado). Así, quedan retenidos los analitos en la superficie del material sólido. Además de los analitos, pueden quedar retenidos otros componentes de la muestra.
- Lavado: Es una etapa opcional que tiene el objetivo de eliminar interferencias, por lo que se debe utilizar un disolvente adecuado que provoque la elución de estos interferentes, pero deje retenido el analito en el sorbente.
- Elución: Se hace pasar un disolvente adecuado de mayor fuerza eluyente, es decir, un disolvente que deshaga las interacciones entre el sorbente y el analito, a través de la fase sólida para desorber los analitos de ésta, recogiendo finalmente el extracto.

En la siguiente figura (Figura 5.2) se muestra un esquema del procedimiento a seguir en una extracción en fase sólida (SPE):



**Figura 5.2.** Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) (Fuentes López et al., 2020)

Normalmente, esta técnica se utiliza para extraer micotoxinas que se encuentran en muestras líquidas. Sin embargo, en matrices sólidas, como cereales, la extracción en fase sólida (SPE) se utiliza para eliminar interferencias de la matriz, como puede ser arroz, y concentrar y purificar citrinina antes de su

análisis. La SPE permite una alta selectividad y eficiencia, además es un método sencillo, económico y con una gran automatización. Otra gran ventaja es el reducido consumo de disolventes.

La técnica SPE se ha empleado en varios de los artículos estudiados, aunque no tanto como la extracción S-L. Por ejemplo, se ha utilizado en el estudio realizado por A. Hartl (Hartl & Stenzel, 2007) para la extracción de citrinina en muestras de trigo. En este estudio, inicialmente, las muestras de trigo se molieron hasta obtener una muestra fina. A continuación, se pesaron 20 gramos de muestra finamente molida en un matraz Erlenmyer. Estos gramos de muestra se agitaron con 100 mL de acetato de etilo y 10 mL de ácido fosfórico 0,5M durante 45 minutos. Tras la filtración, se prepararon 50 mL del extracto para realizar la extracción en fase sólida. Para realizar la extracción, se utilizó una columna de aminopropilo previamente acondicionada con 5 mL de acetato de etilo. Finalmente, la citrinina en muestras de trigo fue analizada por cromatografía líquida de alta afinidad con detector de fluorescencia (HPLC-FLD).

#### Extracción con columnas de inmunoafinidad (IAC)

Esta técnica se utiliza ampliamente para la extracción y purificación de micotoxinas separadas de alimentos y fluidos biológicos, como puede ser la citrinina en distintos cereales.

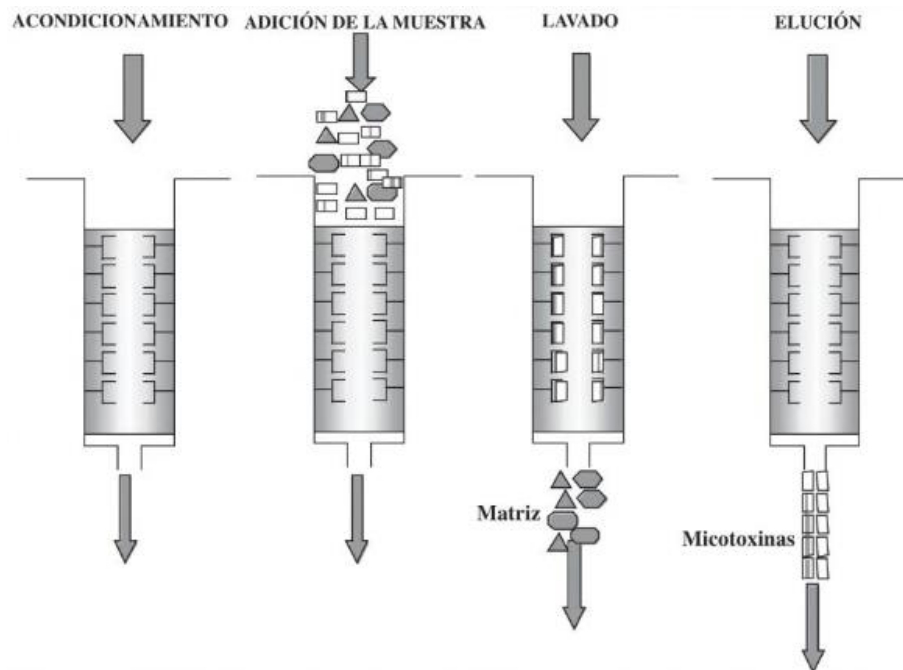
Las columnas se preparan uniendo anticuerpos específicos para una micotoxina determinada a un soporte de fase sólida especialmente activado y empaquetando el soporte suspendido en una solución tampón acuosa en un cartucho (Scott y Trucksess, 2020).

A continuación, se hace pasar la muestra que contiene el antígeno de interés a través de la columna, por lo que la micotoxina que se encuentra en el extracto se une específicamente al anticuerpo inmóvil, mientras que los demás componentes no deseados presentes en la muestra se eluyen sin quedar retenidos. Las impurezas se eliminan con agua o con una solución acuosa adecuada. Por último, la micotoxina se eluye con un pequeño volumen de un disolvente adecuado, por ejemplo, metanol.

La limpieza de los extractos de muestras es esencial en los métodos de análisis de micotoxinas, sobre todo cuando se utiliza la cromatografía para la determinación final. Los anticuerpos específicos de micotoxinas se purifican por

precipitación con sulfato de amonio, por cromatografía de intercambio iónico, por filtración en gel o por cromatografía de afinidad. El anticuerpo se inmoviliza en un soporte sólido inerte como el gel de agarosa (Scott y Trucksess, 2020).

En la siguiente figura (Figura 5.3) se representa un esquema del procedimiento a seguir para llevar a cabo esta técnica.



**Figura 5.3.** Extracción con columnas de inmunofinidad (Soriano del Castillo, 2007)

Es una técnica que presenta una alta especificidad, es decir, la interacción antígeno-anticuerpo conlleva una purificación muy específica. Además, ofrece una alta sensibilidad y pureza del antígeno. Es un método sencillo, sin embargo, tiene los inconvenientes de ser un proceso de elevado coste y lento, ya que el proceso de inmovilización de los anticuerpos en la columna y la preparación de ésta puede ser dificultoso.

La IAC se ha empleado también en algunos de los estudios recogidos en este TFG, entre los que se encuentra el estudio realizado por T. Sato y sus colaboradores (Sato et al., 2010), en el cuál se utilizó como técnica de purificación.

En primer lugar, las muestras de arroz rojo se molieron hasta obtener un polvo fino de menos de 0,5 mm y se almacenaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Posteriormente, a 10 gramos de muestra se le realizó una extracción S-L con 50 mL de una mezcla de metanol y agua (70:30, v/v) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. A continuación, las muestras molidas se agitaron para la extracción durante

30 minutos a 230 rpm aproximadamente. Después de realizar una filtración, se realizó una purificación con columna de inmunoafinidad (IAC) con 10 mL de tampón fosfato salino (PBS) y 10 mL de agua. La columna de inmunoafinidad se lavó con 10 ml de PBS y 10 ml de agua. La citrinina se eluyó con 2 ml de metanol por cada 10 mmol/L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (7:3, v/v). Finalmente, la citrinina en muestras de moho rojo fue analizada por cromatografía líquida de alta afinidad con detector de fluorescencia (HPLC-FLD).

#### Método “QuEChERS”

El método “QuEChERS” es la abreviatura de “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”, es decir, es un método rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. Es un método basado en la etapa de extracción sólido-líquido, seguido de una etapa de purificación mediante el empleo de PSA (amina primaria-secundaria) como sorbente. Se utiliza en la extracción de residuos de pesticidas y otros contaminantes en alimentos, como pueden ser micotoxinas como la citrinina en arroz.

Como ya se ha comentado anteriormente, es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Este método recoge dos etapas fundamentales:

- Etapa de extracción simple con un disolvente adecuado, generalmente acetonitrilo en presencia de varias sales, como pueden ser sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) y cloruro sódico (NaCl) (Fuentes López et al., 2015).

A continuación, la mezcla se agita para asegurar una buena interacción entre el sólido y el disolvente. Seguidamente, se realiza una centrifugación para separar el extracto del sólido.

- Etapa de limpieza o “clean-up” del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) con el objetivo de que el extracto líquido sea purificado y donde el analito se retiene en la columna para ser eluido más tarde con un disolvente adecuado. Así, se consigue eliminar el agua residual y los compuestos presentes en la matriz del alimento que pueden provocar interferencias en el análisis. *Entre los sorbentes que se pueden emplear en esta etapa se encuentran C18, carbón negro grafiado (GCB) y PSA (amina primaria-secundaria), que elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos y azúcares* (Fuentes López et al., 2015).

El método “QuEChERS” es un método simple que no requiere equipamiento especializado de gran coste, además de las características que su propio nombre indica. Algunos de los artículos estudiados han utilizado este método, aunque en menor medida en comparación con las otras técnicas.

Este método se empleó en el estudio realizado por Helen C.S. Hackbart y sus colaboradores (Hackbart et al., 2012), aunque ligeramente modificado.

En primer lugar, las muestras de arroz fueron trituradas y tamizadas. A continuación, se pesó una muestra de 10 gramos en un matraz de centrífuga y se añadió 20 ml de agua. Además, se añadieron 20 ml de acetonitrilo con 0,2 ml de ácido acético glacial. Posteriormente, se realizó una agitación orbital en mesa a 200 rpm a 25°C durante 10 minutos. Los cambios respecto a la metodología original se debieron a la adición de sales y a la limpieza. Se añadieron 1,5 gramos de sulfato de magnesio, además de 0,85 gramos de acetato de sodio. Seguidamente, se realizó una agitación orbital a 200 rpm a 25°C durante 10 minutos. Tras la agitación, el material se centrifugó a una velocidad de rotación de 3220 x gramo durante 8 minutos. La fase líquida se secó en un concentrador bajo una corriente de nitrógeno. Finalmente, el contenido de citrinina fue analizado por HPLC utilizando un detector de fotodiodo array.

### **5.3. Técnicas de análisis**

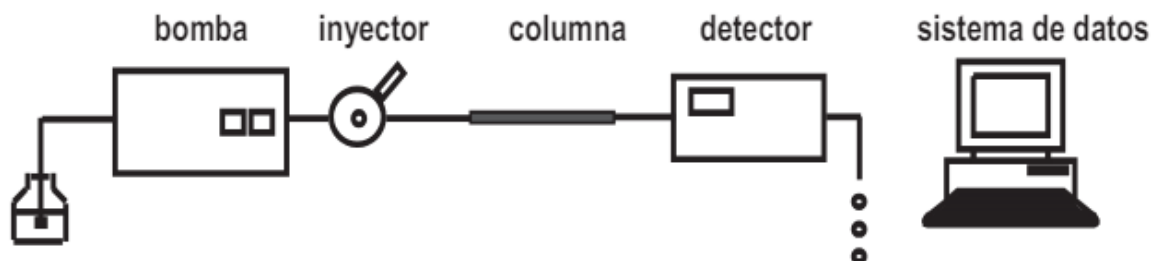
Como se puede ver en la Tabla 5.1, las técnicas de análisis más empleadas habitualmente para el análisis de citrinina en cereales son las técnicas cromatográficas; HPLC, HPLC-FLD, HPLC-PDA y LC-MS/MS. Con todas ellas se obtienen LODs y LOQs del orden de los µg/kg o incluso inferiores. A continuación, se recoge una introducción de cada una de estas técnicas seguido de ejemplos de los artículos estudiados en los que se utilizan, en los que se comenta el LOD y LOQ obtenido para cada ejemplo en función de la técnica empleada.

#### Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica que se utiliza para separar los componentes de una mezcla, basándose en su interacción con una fase estacionaria y una fase móvil. En este caso la fase móvil es un líquido que contiene la muestra y se mueve a alta presión a través de una columna que contiene la fase estacionaria.

Los componentes básicos para un sistema de HPLC son: depósitos para la fase móvil, desgasificador de fases móviles, sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil, dispositivo para la introducción de la muestra (inyector) a temperatura ambiente, columna cromatográfica (termostatzada) que contiene la fase estacionaria, detector adecuado para el análisis y un sistema para el tratamiento de datos y registrador.

En las siguientes figuras (Figura 5.4 y Figura 5.5) se muestra un esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo HPLC (Figura 5.4) y una imagen de un sistema de HPLC real (Figura 5.5):



**Figura 5.4.** Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de HPLC (García de Marina y Yusá, 2016)



**Figura 5.5.** Sistema de HPLC (García de Marina y Yusá, 2016)

Se pueden distinguir dos tipos de HPLC en función de la naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria. Si la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar, el sistema HPLC se denomina HPLC en fase normal. Sin embargo, si la

fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar, el sistema HPLC se denomina HPLC en fase reversa.

En la cromatografía líquida de alta resolución se pueden utilizar diferentes tipos de detectores, como detectores espectrofotométricos, detectores de fluorescencia o detectores de absorción UV-Vis. Para la determinación de citrinina en cereales se utiliza generalmente el detector de fluorescencia.

Es un método que ofrece grandes ventajas como pueden ser la alta sensibilidad, es decir, tiene la capacidad de detectar niveles mínimos de citrinina o el reducido volumen de muestra que se requiere para el análisis. Además, proporciona resultados precisos y reproducibles. Sin embargo, es un método de elevado coste y exigencia, ya que se requiere una gran precisión y exactitud para poder llevarlo a cabo.

Esta técnica se empleó en varios de los artículos estudiados. Por ejemplo, se utilizó en el estudio realizado por Hae-Jin Kim (Kim et al., 2007) sobre los niveles presentes de citrinina y monacolina K en productos de fermentación producidos por las especies "*Monascus*". Tras la realización del análisis, se comprobó que los productos contenían citrinina en unos niveles de entre 0,64 y 122,27 µg/kg.

#### Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD)

Esta técnica deriva de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Como ya se ha comentado anteriormente, se pueden utilizar diferentes tipos de detectores. Uno de ellos es el detector de fluorescencia (FLD). Cuando determinados compuestos químicos tienen propiedades fluorescentes, absorben radiación electromagnética de una determinada longitud de onda y emiten una radiación fluorescente de una longitud de onda mayor que la radiación absorbida.

El detector se coloca perpendicularmente a la dirección del haz de radiación de excitación, la cual suele originarse por una lámpara de xenón o deuterio (Química Analítica Instrumental, Universidad de Jaén, 2022-2023).

Esta técnica tiene una serie de ventajas como son una alta selectividad y sensibilidad, lo que permite la detección de analitos que tienen propiedades fluorescentes en concentraciones muy bajas. Además, es un método rápido y efectivo, garantizando que los productos alimenticios sean seguros para el consumo.

Debido a sus grandes ventajas, 16 de los 36 artículos seleccionados utilizan la técnica acoplada de HPLC-FLD. En Vietnam, Minh Tri Nguyen y sus colaboradores (Nguyen et al., 2007) analizaron 13 muestras de arroz, obteniendo un LOD de 0,11 ng/g y un LOQ de 0,36 ng/g para la citrinina. El rango de concentraciones de citrinina encontrado una vez que se aplicó a muestras reales fue de 0,38 ng/g de media y un máximo de 0,42 ng/g. En Túnez, Chiraz Zaided y sus colaboradores (Zaided et al., 2012) analizaron la presencia de citrinina en muestras de trigo, obteniendo un LOD de 0,25 µg/kg y un LOQ de 1 µg/kg. El rango de concentraciones de citrinina en las muestras positivas de trigo fue de 1 y 170 µg/kg.

Otra opción es emplear el método HPLC-PDA en el que se utiliza un detector de fotodiodo array. Este método se empleó en Brasil, donde Helen C.S. Hackbart y sus colaboradores (Hackbart et al., 2021) analizaron la presencia de citrinina y ocratoxina A en 38 muestras de arroz. El LOD y LOQ fueron de 0,7 y 2,4 µg/kg respectivamente.

#### Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

La cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) es una de las técnicas más utilizadas en la determinación de citrinina en alimentos. Este método combina el poder de separación de la técnica de cromatografía líquida (LC) con el poder de detección, identificación y cuantificación de la técnica de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

En primer lugar, la muestra se inyecta en el cromatógrafo de líquidos, separándose así los analitos que contiene. A continuación, una vez que la citrinina se encuentra separada de la muestra, se ioniza y se introduce en el espectrómetro de masas. Los métodos que se utilizan normalmente para la ionización incluyen electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI). Los fragmentos generados se analizan en un segundo espectrómetro de masas para garantizar una mayor especificidad en la identificación y cuantificación de la sustancia de interés. Por último, el espectrómetro de masas detecta la relación masa/carga de los iones y proporciona lo que se denomina espectro de masas.

La MS en tándem permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas, las cuáles están basadas en su relación masa/carga ( $m/z$ ).

Posteriormente al proceso de ionización, los iones en fase gaseosa entran en el analizador. Existen varios tipos de analizadores, entre los cuáles se encuentran detectores de baja resolución (cuadrupolo o trampa de iones) y de alta resolución (TOF principalmente). Los analizadores de baja resolución solo pueden distinguir iones con diferencia de 1 unidad (1 Da), mientras que los de analizadores de alta resolución tienen la capacidad de detectar diferencias mínimas de masas. Además, otra diferencia entre ambos tipos es que a nivel práctico, en baja resolución la relación  $m/z$  se da como números enteros (por ejemplo  $m/z$  341), mientras que en alta resolución se da con números decimales (por ejemplo  $m/z$  341.1435).

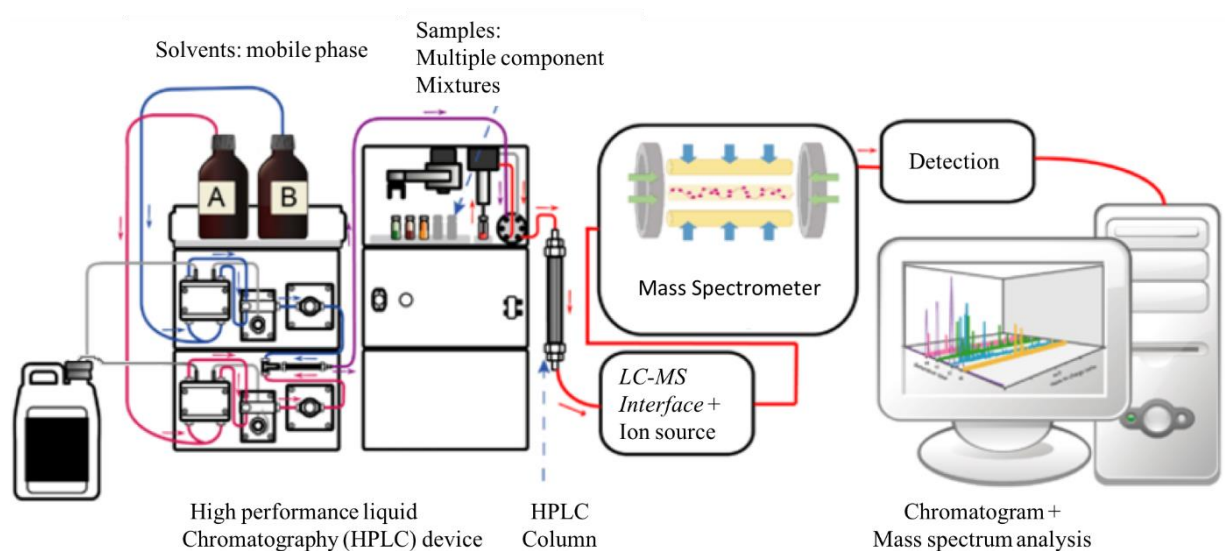
Los detectores de cuadrupolo consisten en cuatro rodillos paralelos a los que se le aplica una corriente continua. El campo creado en los rodillos actúa como filtro y determina que iones alcanzan el detector en función de su  $m/z$ . Poseen un uso relativamente sencillo, además de tener un bajo costo. Sin embargo, son detectores incapaces de realizar análisis de alta resolución, masas exactas y tienen limitación en cuanto a rango de masas. Los detectores de trampa de iones son muy similares a los de cuadrupolo. En éstos, los iones generados en la fuente son captados durante un cierto tiempo utilizando campos eléctricos. Sus principales ventajas son su alta versatilidad y un costo moderado. Sin embargo, tienen un rango lineal bajo, lo que provoca problemas en la cuantificación debido a la falta de linealidad, además, no permiten medidas de masas exactas de iones. (Química Analítica Instrumental, Universidad de Jaén, 2022-2023)

Los detectores TOF ("time-of-flight", es decir, tiempo de vuelo) se basan en la medida del tiempo que tardan los iones generados en la fuente iónica en alcanzar el detector. Como estos iones poseen la misma energía pero diferente masa, alcanzan el detector a diferentes tiempos. Sus principales ventajas son su elevada sensibilidad y la capacidad de realizar medidas exactas de iones, así como una alta selectividad debida a la elevada resolución que posee. Sin embargo, tienen un rango lineal bajo y problemas respecto a la cuantificación debido a la falta de linealidad. Además, no permite hacer experimentos reales MS/MS ya que necesita un analizador híbrido Q-TOF.

Por tanto, la MS en tándem ocurre cuando se acoplan dos o más detectores, como pueden ser el triple cuadrupolo (excelente sensibilidad y bajos LODs) o Q-

TOF, que son los más utilizados. En estos detectores acoplados se combinan principalmente las ventajas de los detectores por separado.

En la siguiente figura (Figura 5.6) se muestra un esquema de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem:



**Figura 5.6.** Esquema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MA) (Vega Bustillos, 2020)

Es un método muy utilizado debido a sus grandes ventajas como son su alta sensibilidad (capacidad de detectar niveles muy bajos de citrinina), especificidad y capacidad para analizar múltiples compuestos simultáneamente. Sin embargo, es un método que requiere un elevado coste. De los 36 artículos seleccionados, 8 de ellos utilizan CL-MS/MS. En Bélgica, Celine Meerpoel y sus colaboradores (Meerpoel et al., 2018) analizaron la presencia de citrinina en muestras de arroz de levadura roja obteniendo un LOD y LOQ de 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente. En Serbia, 204 muestras de maíz fueron analizadas por Jovana Kos y sus colaboradores (Kos et al., 2020). En el artículo no viene especificado el LOQ, no obstante, el LOD fue de 0,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Para finalizar, también se han realizado investigaciones en donde se emplea ionización por electrospray (ESI) con espectrometría de masas en tándem. El estudio realizado por Victor Limay-Rios y sus colaboradores (Limay-Rios, 2017) empleó este acoplamiento para determinar el contenido de citrinina en 37 muestras

de trigo del país de Canadá. Los LOD y LOQ que se obtuvieron fueron 0,6 y 1,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente.

Además de las técnicas comentadas recientemente, existen estudios que utilizan otras técnicas como son IEM, BAP o ELISA, por lo que existe una gran variedad de técnicas para la determinación de citrinina en cereales.

## 6. CONCLUSIONES

Este TFG se centra en la revisión e investigación bibliográfica sobre la presencia de citrinina en alimentos, concretamente, en distintos cereales. De acuerdo con la revisión e investigación bibliográfica realizada, se pueden extraer una serie de conclusiones.

Algunos de los artículos seleccionados se centran solo en la puesta a punto de métodos que permitan la determinación de citrinina en distintos cereales. Para ello, es necesario que, a la hora de aplicar el método, se agreguen concentraciones conocidas de este analito a la muestra alimenticia. Este es el caso del estudio realizado por T. Sato (Sato et al., 2010) en Taiwán sobre muestras de arroz rojo.

Sin embargo, muchos de los artículos seleccionados, además de poner a punto el método, realizan análisis de un número determinado de muestras reales con el objeto de ver si éstas están contaminadas. Este es el caso del estudio realizado por M. Twaruzek y sus colaboradores (Twaruzek et al., 2021), en el que se analizaron 15 suplementos dietéticos que contenían extractos de arroz rojo fermentado, obtenidos en un mercado de Polonia mediante HPLC-FLD, obteniendo un LOD de 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

En Argentina, FJ Arévalo y sus colaboradores (Arévalo et al., 2011) realizaron un análisis de 2 muestras de arroz utilizando la técnica IEM, obteniendo un rango de concentración en las muestras reales analizadas de 30,8-36,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

En el estudio realizado por Helen C.S. Hackbart y sus colaboradores (Hackbart et al., 2012) en 38 muestras de arroz de Brasil, se determinó que el valor de concentración de citrinina en las muestras de arroz era de 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por lo que estaba por encima del límite máximo establecido por la legislación.

En Malasia, Samsudin y Abdullah (Samsudin & Abdullah, 2013) estudiaron el análisis de 50 muestras de arroz rojo mediante la técnica de análisis ELISA. La

citrinina estaba presente en el 100% de las muestras analizadas en un rango de concentración de 0,23-20,65 mg/kg).

En Taiwán, Chia-Ding Liao y sus colaboradores (Liao et al., 2014) realizaron un análisis de 84 muestras reales de arroz de levadura roja mediante la técnica de HPLC-FLD durante 4 años (2009-2012) obteniendo que la presencia de citrinina estaba presente en 58 de esas 84 muestras, presentando un rango de concentración de 0,4-93,5 mg/kg.

En Túnez, 200 muestras de granos de trigo fueron analizadas por Chiraz Zaied y sus colaboradores (Zaied et al., 2012). Se determinó que la citrinina estaba presente en 100 de estas 200 muestras, es decir, el 50% de las muestras estaban contaminadas con citrinina en un rango de concentración de 1-170 µg/kg.

En 5 provincias de Vietnam, Minh Tri Nguyen y sus colaboradores (Nguyen et al., 2007) estudiaron la presencia de varias micotoxinas, entre ellas la citrinina en 100 muestras de arroz. Se analizaron 13 muestras reales de arroz que contenían citrinina, de las cuales sólo 2 eran cuantificables presentando un máximo de 0,42 µg/kg de citrinina.

En la mayor parte de los casos, a excepción de algunos de los comentados anteriormente, los valores encontrados de citrinina en cereales se encuentran por debajo de los límites permitidos, por lo que, en éstos no se genera una alarma social respecto a la contaminación de los alimentos.

Como ya se ha comentado anteriormente, las técnicas de extracción y purificación más empleadas son la extracción S-L, SPE, QuEChERS e IAC. Sin duda, la más empleada en los estudios analizados es la extracción S-L, habiéndose utilizado prácticamente en todos los artículos seleccionados. Para esta técnica se han utilizado mezclas de distintos disolventes como metanol, agua, ácido acético, acetonitrilo, cloruro de potasio (4%) o acetato de etilo. Sin embargo, las mezclas de disolventes más utilizadas son metanol:agua y acetonitrilo:agua:ácido acético. Esta extracción S-L es un método económico y sencillo, de ahí su elevado uso.

En cuanto a las técnicas de análisis de los artículos seleccionados, las más empleadas son HPLC-FLD y LC-MS/MS. Ambas técnicas son efectivas y presentan alta selectividad y sensibilidad, es decir, tienen la capacidad de detectar niveles muy bajos de citrinina. Además, LC-MS/MS tiene la ventaja de que es capaz de analizar múltiples componentes. Sin embargo, ésta última requiere de un

instrumental que requiere un elevado coste, lo que hace que la mayoría de estudios prefieran utilizar la técnica HPLC-FLD.

Para escoger la técnica analítica más adecuada para la determinación de citrinina en una variedad cereales, se debe de tener en cuenta el LOD obtenido para cada estudio realizado, es decir, la mínima cantidad de analito que puede ser detectada por un método analítico con cierta fiabilidad. Por tanto, cuanto menor sea el LOD, más eficaz y sensible será esa técnica.

A continuación, en la Tabla 6.1 se recogen las técnicas con menor LOD utilizadas en los diferentes estudios realizados.

**Tabla 6.1.** Técnicas analíticas estudiadas con menor LOD (Elaboración propia)

LOD	TÉCNICA ANALÍTICA	REFERENCIA
0,0001 µg/L	IEM	(Arévalo et al., 2011)
0,5 µg/L	LC-DAD-FD-MS	(Silva et al., 2020)
0,05 µg/kg	LC-MS/MS	(Meerpoel et al., 2021)
0,1 µg/kg	HPLC-FLD	(Mair et al., 2021)
0,6 µg/kg	ESI-MS/MS	(Limay-Rios et al., 2017)
0,7 µg/kg	HPLC-PDA	(Hackbart et al., 2012)

Como ya se ha comentado anteriormente, las técnicas analíticas que se utilizan comúnmente son HPLC-FLD y LC-MS/MS, si bien, existen técnicas que presenten menores valores de LOD como se puede comprobar en la Tabla 6.1. Esto es debido a que las técnicas innovadoras tienen ciertas desventajas como puede ser la técnica IEM, ya que se requiere la fabricación de dispositivos microfluídicos con inmunosensores electroquímicos, lo que supone una dificultad y un elevado coste. La técnica ESI-MS/MS presenta una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, si se analizan muestras complejas, como pueden ser algún tipo de cereales, éstas pueden causar interferencias, por lo que el análisis de los espectros de masas sería complejo.

Las técnicas HPLC-FLD y LC-MS/MS tienen un LOD más bajo que las técnicas ESI-MS/MS y HPLC-PDA, por lo que las primeras son más sensibles y eficaces. Se llega a la conclusión de que las técnicas más idóneas para realizar análisis de citrinina en cereales son HPLC-FLD y LC-MS/MS por su elevada selectividad y sensibilidad. Si se desea analizar compuestos fluorescentes, es más

común utilizar HPLC-FLD, mientras que, si se desea analizar compuestos en niveles de traza, se utiliza LC-MS/MS. Ésta última requiere de unos costos más elevados, además de mayor complejidad operativa.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrevaya, X. (2008). *Genotóxicos o xenobióticos*. <https://www.intramed.net/47111/Que-es-la-genotoxicidad>
- Alshannaq, A., & Yu, J.H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632. doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Arévalo, F. J., Granero, A. M., Fernández, H., Raba, J., & Zón, M. A. (2011). Citrinin (CIT) determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor. *Talanta*, 83(3), 966–973. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.007>
- Atar, N., Eren, T., & Yola, M. L. (2015). A molecular imprinted SPR biosensor for sensitive determination of citrinin in red yeast rice. *Food Chemistry*, 184, 7–11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.065>
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Ogbonna, C. U., Upadhyay, A. K., Baran, K., Okpala, C. O. R., Korzeniowska, M., & Guiné, R. P. F. (2021). Mycotoxins affecting animals, foods, humans and plants: types, occurrence, toxicities, action mechanisms, prevention and detoxification strategies-A revisit. *Foods*, 10(6), 1279. doi:<https://doi.org/10.3390/foods10061279>
- Centro de Medicina Neuro-Regenerativa (2022). *Neurotoxicidad: Qué es y sus causas*. <https://www.parkinsonysalud.com/neurotoxicidad-que-es-y-sus-causas/>
- Comisión Europea. (2023). *Reglamento (UE) n° 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los 44 alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) n°. 1881/2006*. Boletín Oficial del Estado. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>
- Čulig, B., Bevardi, M., Bošnjir, J., Serdar, S., Lasić, D., Racz, A., Galić, A., & Kuharić, Ž. (2017). Presence of citrinin in grains and its possible health effects. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(3), 22–30. doi:<https://doi.org/10.21010/ajtcam>

- de Oliveira Filho, J. W. G., Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., de Oliveira Santos, J. V., de Alencar, M. V. O. B., ... & de Carvalho Melo-Cavalcante, A. A. (2017). A comprehensive review on biological properties of citrinin. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 130–141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.002>
- Flajs, D., & Peraica, M. (2009). Toxicological properties of citrinin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60(4), 457-464. doi:<https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1992>
- Fuentes López, A., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, C. (2020). *Preparación de muestra mediante la técnica de Extracción en Fase Sólida*. Departamento de Tecnología de los alimentos. Universidad Politécnica de 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*. Universidad Politécnica de Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/51363>
- García de Marina Bayo, A., & Yusa Marco, D. J. (2016). *HPLC instrumental*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/67705>
- Hackbart, H. C. S., Prietto, L., Primel, E. G., Garda-Bufferon, J., & Badiale-Furlong, E. (2012). Simultaneous extraction and detection of ochratoxin A and citrinin in rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 103-109. doi:<https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000100015>
- Hartl, A., & Stenzel, W. R. (2007). Development of a method for the determination of citrinin in barley, rye and wheat by solid phase extraction on aminopropyl columns and HPLC-FLD. *Mycotoxin Research*, 23, 127-131. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02951508>
- Hajnal, E. J., Kos, J., Malachová, A., Steiner, D., Stranska, M., Krska, R., & Sulyok, M. (2020). Mycotoxins in maize harvested in Serbia in the period 2012-2015. Part 2: Non-regulated mycotoxins and other fungal metabolites. *Food Chemistry*, 317, 126409. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126409>
- Ji, X., Xu, J., Wang, X., Qi, P., Wei, W., Chen, X., Li, R., & Zhou, Y. (2015). Citrinin determination in red fermented rice products by optimized extraction method coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-

- MS/MS). *Journal of Food Science*, 80(6), T1438–T1444.  
doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12900>
- Jirasatid, S., Limroongreungrat, K., & Nopharatana, M. (2019). Monacolin K, pigments and citrinin of rice pasta by-products fermented by *Monascus purpureus*. *International Food Research Journal*, 26(4), 1279–1284.  
Obtenido de:<https://www.proquest.com/openview/a163133aff298905fcb304fa063fe751/1?pq-origsite=gscholar&cbl=816390>
- Kong, D., Xie, Z., Liu, L., Song, S., & Kuang, H. (2017). Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of citrinin in cereals. *Food and Agricultural Immunology*, 28(5), 754–766.  
doi:<https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1312293>
- Kos, J., Hajnal, E. J., 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, 126034.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126034>
- Kim, H. J., Ji, G. E., & Lee, I. (2007). Natural Occurring Levels of Citrinin and Monacolin K in Korean. *Food Science and Biotechnology*, 16(1), 142–145.  
<https://www.researchgate.net/publication/289628334>
- Li, Y., Zhou, Y. C., Yang M. H., & Ou-Yang, Z. (2012). Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products. *Food Chemistry*, 132(2), 1040–1045. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.051>
- Liao, C. D., Chen, Y. C., Lin, H. Y., Chiueh, L.C., & Shih, D. Y. C. (2014). Incidence of citrinin in red yeast rice and various commercial *Monascus* products in Taiwan from 2009 to 2012. *Food Control*, 38(1), 178–183.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.016>
- Limay-Rios, V., Miller, J. D., & Schaafsma, A. W. (2017). Occurrence of *Penicillium verrucosum*, ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in on-farm stored winter wheat from the Canadian Great Lakes Region. *PLoS ONE*, 12(7), e0181239. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181239>
- Madonna, R. (2017). Early diagnosis and prediction of anticancer drug-induced cardiotoxicity: from cardiac imaging to “Omics” technologies. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 70(7), 576–582.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.02.001>

- Mair, C., Norris, M., Donnelly, C., Leeman, D., Brown, P., Marley, E., Milligan, C., & Mackay, N. (2021). Assessment of citrinin in spices and infant cereals using immunoaffinity column clean-up with hplc-fluorescence detection. *Toxins*, *13*(10), 715. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins13100715>
- Marley, E., Brown, P., Leeman, D., & Donnelly, C. (2016). Analysis of citrinin in cereals, red yeast rice dietary supplement, and animal feed by immunoaffinity column cleanup and LC with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, *99*(4), 1025–1031. doi:<https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-006>
- Meerpoel, C., Vidal, A., di Mavungu, J. D., Huybrechts, B., Tangni, E. K., Devreese, M., Croubels, S., & de Saeger, S. (2018). Development and validation of an LC–MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin a in a variety of feed and foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, *1580*, 100–109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.039>
- Meerpoel, C., Vidal, A., Andjelkovic, M., de Boevre, M., Tangni, E. K., Huybrechts, B., Devreese, M., Croubels, S., & de Saeger, S. (2021). Dietary exposure assessment and risk characterization of citrinin and ochratoxin A in Belgium. *Food and Chemical Toxicology*, *147*, 111914. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111914>
- Meister, U. (2004). New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up. *European Food Research and Technology*, *218*(4), 394–399. doi:<https://doi.org/10.1007/s00217-003-0858-1>
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: Development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*, *92*(3), 391–400. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.035>
- Nguyen, M. T., Tozlovanu, M., Tran, T. L., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, *105*(1), 42–47. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.040>
- Nigović, B., Sertić, M., & Mornar, A. (2013). Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, *138*(1), 531–538. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.104>

- Ruiz Medina, A. (2022). *Guía docente Trabajo Fin de Grado: Determinación de contaminantes y sustancias tóxicas en alimentos*. Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Jaén.
- Salimax, Calidad en Certificación y Control. *Ensayos de mutagenicidad*. <https://salimax.cl/ensayos-de-mutagenicidad/>
- Samsudin, N. I. P., & Abdullah, N. (2013). A preliminary survey on the occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins contaminating red rice at consumer level in Selangor, Malaysia. *Mycotoxin Research*, 29(2), 89–96. doi:<https://doi.org/10.1007/s12550-012-0154-7>
- Sato, T., Higashihara, K., Sasaki, A., Toth, D., & Goto, T. (2010). Development and single laboratory validation of a method for citrinin. *World Mycotoxin Journal*, 3(2), 129–134. doi:<https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1204>
- Scott, P. M., & Trucksess, M.W. (1997). Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International*, 80(5), 941-950. doi:<https://doi.org/10.1093/jaoac/80.5.941>
- Silva, L. J. G., Pereira, A. M. P. T., Pena, A., & Lino, C. M. (2020). Citrinin in Foods and Supplements: A Review of Occurrence and Analytical Methodologies. *Foods*, 10(1), 14. doi:<https://doi.org/10.3390/foods10010014>
- Shu, P. Y., & Lin, C. H. (2002). Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC selected ion monitoring mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 18(3), 283-287. doi:<https://doi.org/10.2116/analsci.18.283>
- Soriano del Castillo, J. M., (2007). *Micotoxinas en alimentos*. España: Díaz de Santos. <https://books.google.es/books?id=wuZvCQAAQBAJ&lpg=PR23&ots=HEEws343f7&dq=soriano%20del%20castillo%202007%20citrinina&lr&hl=es&pg=PR23#v=onepage&q=soriano%20del%20castillo%202007%20citrinina&f=false>
- Tangni, E. K., Van Hove, F., Huybrechts, B., Masquelier, J., Vandermeiren, K., & Van Hoeck, E. (2021). Citrinin Determination in Food and Food Supplements by LC-MS/MS: Development and Use of Reference Materials in an International Collaborative Study. *Toxins*, 13(4), 245. doi:<https://doi.org/10.3390/toxinas13040245>

- Twarużek, M., Altyn, I., & Kosicki, R. (2021). Dietary supplements based on red yeast rice—a source of citrinin? *Toxins*, 13(7), 497. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins13070497>
- Urraca, J. L., Huertas-Pérez, J.F., Cazorla, G.A., Gracia-Mora, J., García-Campaña, A. M., & Moreno-Bondi, M. C. (2016). Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: Determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(11), 3033–3042. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9348-8>
- 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.
- Vega Bustillos, O. (2020). Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Obtenido en: <https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-massas-em-tandem-hplc-ms-ms/>
- Vuković, G., Đukić, M., Bursić, V., Stojanović, T., Petrović, A., Kuzmanović, S., & Starović, M. (2019). Development and validation of LC-MS/MS method for the citrinin determination in red rice. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*, 2(1), 192-199. [https://plantarum.izbis.bg.ac.rs/bitstream/id/3342/bitstream\\_3342.pdf](https://plantarum.izbis.bg.ac.rs/bitstream/id/3342/bitstream_3342.pdf)
- Wang, W., Chen, Q., Zhang, X., Zhang, H., Huang, Q., Li, D., & Yao, J. (2014). Comparison of extraction methods for analysis of citrinin in red fermented rice. *Food Chemistry*, 157, 408–412. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.060>
- Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., & Krska, R. (2012). Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9352–9363. doi:<https://doi.org/10.1021/jf302003n>
- Wu, C. L., Kuo, Y. H., Lee, C. L., Hsu, Y. W., & Pan, T. M. (2011). Synchronous high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector and mass spectrometry for the determination of citrinin, monascin, ankaflavin, and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice.

*Journal of AOAC International*, 94(1), 179–190.  
doi:<https://doi.org/10.1093/jaoac/94.1.179>

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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.012>

Xue-Mei, L., Xing-Hai, S., Lan, X., Zhen-Wen, D., & Shu-Ren, G. (2012). A Validated RP-HPLC method for the determination of citrinin in Xuezhikang capsule and other *Monascus*-Fermented products. *Journal of Chemistry*, 9(1), 260-266. doi:<https://doi.org/10.1155/2012/693570>

Zachetti, V. G. L., Granero, A. M., Robledo, S. N., Zon, M. A., & Fernández, H. (2013). Development of an amperometric biosensor based on peroxidases to quantify citrinin in rice samples. *Bioelectrochemistry*, 91, 37–43. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.12.004>

Zaied, C., Zouaoui, N., Bacha, H., & Abid, S. (2012). Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. *Food Control*, 28(1), 106–109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.015>

Zhang, H., Ahima, J., Yang, Q., Zhao, L., Zhang, X., & Zheng, X. (2021). A review on citrinin: Its occurrence, risk implications, analytical techniques, biosynthesis, physiochemical properties and control. *Food Research International*, 141, 110075. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110075>