



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*  
Grado en Química

# **Estudio comparativo de técnicas de extracción para la determinación de micotoxinas en alimentos**

Alumna: Raquel Carmona Muñoz

Septiembre, 2015



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*  
Grado en Química

**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*  
Grado en Química

# **Estudio comparativo de técnicas de extracción para la determinación de micotoxinas en alimentos**

**Alumna: Raquel Carmona Muñoz**

**Septiembre, 2015**

## ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN/ ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>3.1. Micotoxinas</b>	<b>2</b>
<b>3.2. El analito: Citrinina</b>	<b>6</b>
<b>3.3. Técnicas de extracción y clean-up para micotoxinas</b>	<b>7</b>
3.3.1. Extracción sólido- líquido	9
3.3.2. Extracción en fase sólida	9
3.3.3. Extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad	11
3.3.4. QuEChERS	12
<b>3.4. Técnicas analíticas para determinación de micotoxinas:</b>	
<b>Luminiscencia Molecular</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>4.1. Reactivos</b>	<b>17</b>
<b>4.2. Materiales e instrumentos</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Preparación de la muestra</b>	<b>19</b>
4.3.1. Extracciones sólido-líquido	20
4.3.2. QuEChERS	22
4.3.3. Extracción en fase sólida con columnas de Inmunoafinidad	22
<b>4.4. Medida analítica</b>	<b>23</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Características espectrales de la Citrinina</b>	<b>24</b>
<b>5.2. Optimización de variables instrumentales</b>	<b>24</b>
<b>5.3. Optimización de variables analíticas</b>	<b>26</b>
<b>5.4. Calibración</b>	<b>27</b>
<b>5.5. Extracción de la Citrinina</b>	<b>28</b>
5.5.1. Determinación del efecto matriz	31
5.5.2. Determinación de los porcentajes de extracción	34

<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>37</b>



# **Estudio comparativo de técnicas de extracción para la determinación de micotoxinas en alimentos**

## **1. OBJETIVOS**

Este trabajo tiene como objetivo principal la realización de un estudio comparativo de la aplicabilidad de diferentes técnicas de extracción para la determinación de Citrinina en alimentos, concretamente en arroz blanco. En el estudio se hará una valoración de los porcentajes de extracción obtenidos con técnicas de extracción tradicionalmente usadas tales como Extracción Sólido-Líquido, así como con otras más recientemente desarrolladas, como es el caso del QuEChERS o la Extracción en Fase Sólida con columnas de inmunoafinidad. En base a los resultados obtenidos, se propondrá un método fluorimétrico para el análisis de la micotoxina en arroz blanco.

## **2. RESUMEN / ABSTRACT**

En el Trabajo Fin de Grado que se presenta se ha comparado la efectividad de diferentes técnicas de extracción para la determinación de la micotoxina Citrinina en arroz blanco. Los métodos de extracción desarrollados han sido: (1) extracción sólido- líquido con metanol: agua (8:2), (2) extracción sólido- líquido con etanol: agua (7:3), (3) extracción sólido- líquido con tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (7:3:1), (4) extracción sólido- líquido con acetato de etilo: ácido fosfórico 0.5M (10:1), (5) QuEChERS y (6) extracción sólido- líquido con ácido fosfórico 0.1M: cloruro de metileno (1:10), seguida de clean-up con columnas de inmunoafinidad Supel Tox OchraBind. En todos los casos se comprobó la existencia o no de efecto matriz, la cual se tuvo en cuenta para la determinación de los porcentajes de extracción. Al tratarse la Citrinina de una micotoxina fluorescente, su detección se ha llevado a cabo mediante la medida de su señal fluorescente ( $\lambda_{\text{excitación}}=332\text{nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}}=508\text{nm}$ ; rendijas 10nm/20nm; voltaje: 700V) en disolución metanólica a pH 1.6. Los porcentajes de extracción obtenidos se encontraban en el rango 64,68-93,96 %. Se ha

puesto de manifiesto que la sensibilidad de los métodos de análisis desarrollados es apropiada para la determinación de Citrinina en arroz blanco a los niveles establecidos por la Legislación Europea (2 mg/Kg).

In the Project here presented the efficiency of different extraction techniques for the determination of Citrinin in white rice is compared. The developed extraction methods have been: (1) solid-liquid extraction with methanol:water (8:2), (2) solid-liquid extraction with ethanol:water (7: 3), (3) solid-liquid extraction toluene:ethyl acetate:formic acid (7:3:1), (4) solid-liquid extraction with ethyl acetate:0.5 M phosphoric acid (10: 1), (5) QuEChERS and (6) solid-liquid extraction 0.1 M phosphoric acid:methylene chloride (1:10), followed by a clean-up with Supel Ochrabind Tox immunoaffinity columns. In all cases the existence of matrix effect was checked, which was taken into account for determining the extraction percentages. Since Citrinin is a fluorescence mycotoxin, it was detected by measuring its fluorescent signal ( $\lambda_{\text{excitation}}=332\text{nm}$  and  $\lambda_{\text{emission}}=508\text{nm}$ ; slits 10nm/20nm; voltage: 700V) in methanol solution at pH 1.6. The obtained extraction percentages were in the range 64.68 to 93.96%. It has been demonstrated that the sensitivity of the methods of analysis developed is suitable for determining Citrinin in white rice at the levels established by the European Legislation (2 mg/kg).

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son unos compuestos altamente tóxicos, resultado de un metabolismo secundario de origen fúngico. La mayoría de las micotoxinas han sido identificadas como metabolitos secundarios de los *Fungi imperfecti*, entre los que cabe destacar los del género *Aspergillus* y *Penicillium*. El término metabolito secundario designa a aquellos compuestos no indispensables para el desarrollo o crecimiento de los hongos (Martinez M.R., 2012).

Elevados niveles de éstas en la dieta, pueden causar efectos agudos y crónicos en la salud del hombre y de diversas especies animales. Los efectos



que estas produzcan en el organismo son tan diversos como estructuras de micotoxinas existen. Pueden dañar órganos, aparatos o sistemas, como hígado, riñón, sistemas nervioso, endocrino e inmunitario.

Existen muchos tipos de micotoxinas, las cuales se pueden clasificar (*Tabla 1*) según el hongo que las sintetiza:

*Tabla 1. Clasificación de micotoxinas*

<b>Aflatoxinas</b> <b>(Aspergillus flavus y Aspergillus paraiticus)</b>	Aflatoxina B1
	Aflatoxina B2
	Aflatoxina G1
	Aflatoxina G2
	Aflatoxina M1
	Aflatoxina M2
<b>Toxinas de fusarium</b> <b>(Género fusarium. Fusarium graminearum)</b>	Zearalenona
	Zearalenol
	Deoxivalenol
	Nivalenol
	Toxinas T-2 y HT-2
	Fumonisina 1
Fumonisina 2	
<b>Ocratoxina A (Aspergillus ochraceus y Penicilium verricosum)</b>	
<b>Patulina (Penicilium, Aspergillus y Byssochylamys)</b>	
<b>Alcaloides ergóticos (alcaloides del cornezuelo del centeno)</b>	
<b>Citrinina</b>	

Dentro de éstas, las más conocidas son:

- *Aflatoxinas (Figura 1)*: Son sintetizadas por el hongo *Aspergillus flavus*. Químicamente son cumarinas sustituidas, que contienen anillos de bifurano y configuración tipo lactina, comunes a todas ellas. Presenta propiedades fluorescentes (*Heras A., 2011*). Son

contaminantes naturales en cereales, semillas oleaginosas, nueces y especias (Becerra M.E., 2014).

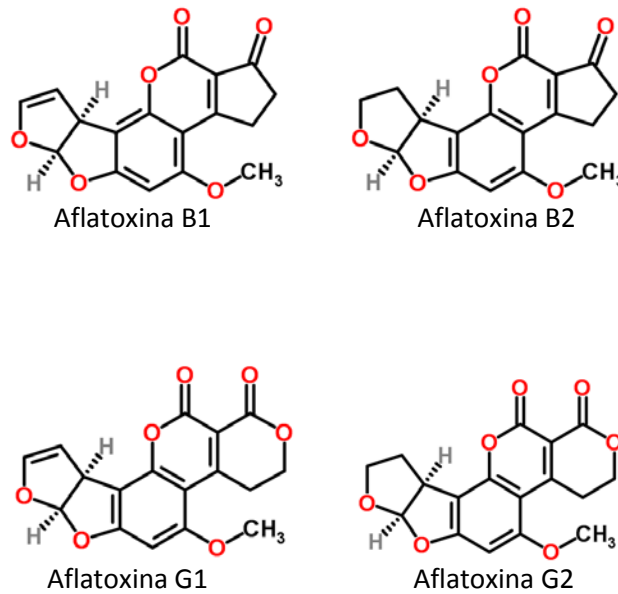


Figura.- 1. Estructuras Aflatoxinas B1, B2, G1 Y G2

- **Ocratoxina A**

(Figura 2): Es la más tóxica de todas las ocratoxinas. Es producida por dos especies de *Penicillium*. Está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina

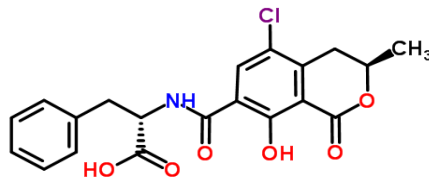
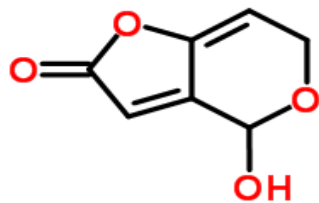


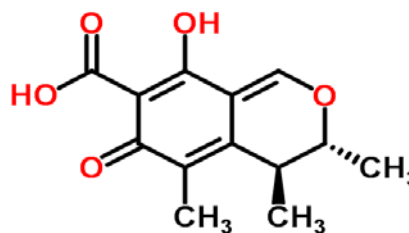
Figura.- 2. Estructura Ochratoxina A

mediante un enlace amida. Se encuentra presente en cereales, derivados, vino y café.

- **Patulina** (Figura 3): Es una micotoxina producida por *Penicillium exoansum* en manzanas y peras. Estos hongos actúan en la etapa de poscosecha.



**Figura.- 3.**  
Estructura Patulina



**Figura.- 4.** Estructura Citrinina

- *Citrinina (Figura 4):* Esta micotoxina se suele encontrar asociada a otras como es el caso de la Ocratoxina A. La Citrinina se encuentra en alimentos como son el arroz, espelta, avena, centeno, cebada, maíz, granos de trigo (Arroyo N., 2013; Becerra M.E., 2013). También ha sido encontrada en productos cárnicos fermentados y piensos entre otros (Jiménez J., 2014). Sus mayores concentraciones se han encontrado, sin embargo, en arroz rojo fermentado.

A día de hoy la concentración máxima tolerable de Citrinina en alimentos está solamente legislada para complementos alimenticios a base de arroz fermentado con levadura roja *Monascus purpureus*, siendo de 2000 µg/Kg. El control de esta micotoxina en alimentos es relativamente reciente ya que se hizo aplicable en toda Europa el 1 de abril del 2014 (UE, 2014; BOE, 2014), aclarando que el contenido máximo tolerable de Citrinina tendrá que revisarse antes del 1 de Enero del 2016 teniendo en cuenta su presencia en diferentes alimentos y sus repercusiones para la salud.

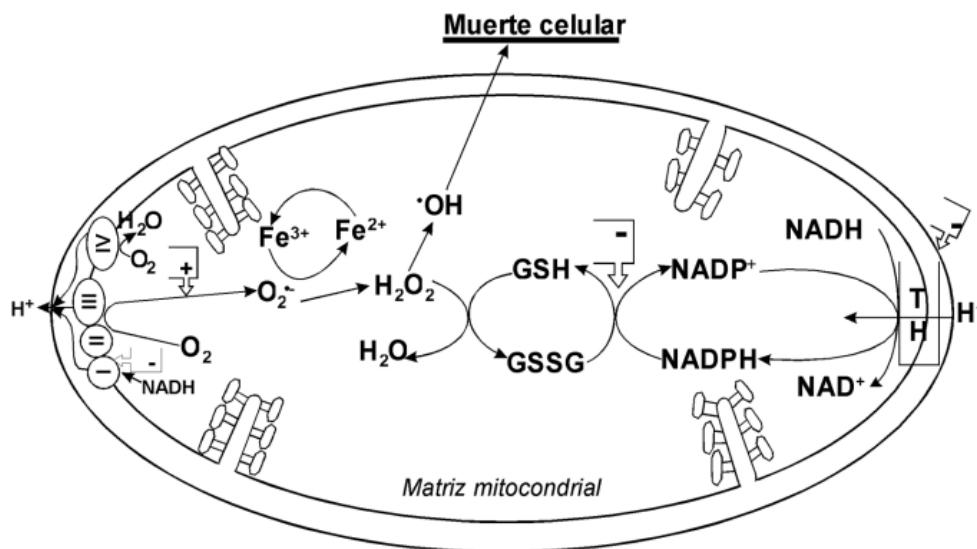
La gran repercusión que ha tenido la reciente detección de esta micotoxina en diferentes alimentos, así como el control continuó que la Unión Europea tendrá sobre ella, ha sido la principal razón para su elección como analito para este Trabajo Fin de Grado.

### 3.2. El analito: Citrinina

Citrinina, cuyo nombre según la IUPAC es [(3R, 4S)-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-4,6-dihidro-3H-isocromano-7-ácido carboxílico (*Figura 4*), fue aislada por primera vez en 1932 como una sustancia cristalina de color amarillo desde *Penicillium citrinum*. Se caracterizó como antibiótico y como antifúngica, antiprotozoica y bacteriostática (*Soriano J.M., 2007*). Es una micotoxina producida por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus*.

La Citrinina fue relacionada con el síndrome del “arroz amarillo” en Japón en 1971, debido a la presencia de *P. citrinum* en productos alimenticios. Fue la causante de nefropatía en cerdos y otros animales (*Becerra M.E., 2013*).

Los efectos de esta micotoxina son alteraciones de la función mitocondrial, favorece la disminución del contenido de ATP y actúa sobre enzimas de la ruta del colesterol y de los triglicéridos. Esta activa la formación de radicales libres ( $O_2^-$ ) que dará lugar a daños y muerte celular en algunos tejidos (*Figura 5*).



*Figura.- 5. Efecto de la Citrinina en la mitocondria de hígado de rata*

La Citrinina tiene efectos nefrotóxicos y mutagénicos. Su ingestión provoca diarrea y pérdida de peso debida a una degeneración renal. La toxicología renal cobra gran importancia porque suele encontrarse asociada a otra

micotoxina la Ocratoxina A, que también produce daños renales (*Soriano J.M., 2007*).

Está presente en trigo (*Zaied A., 2012*), maíz, productos lácteos, frutas (*Hackbart H., 2012*), especies (*Yogendrarajah P., 2013*) y arroz (*Nguyen M.T., 2007*). También está presente en arroz rojo fermentado (*Weiping W., 2014*), ampliamente utilizado como colorante alimenticio y medicamento en el Este asiático y en Europa y Estados Unidos como aditivo y suplemento alimenticio.

Tal y como se ha dicho anteriormente, la Citrinina está presente en cereales como es el caso del arroz, el cual supone uno de los alimentos base en la nutrición mundial. El consumo mundial total de arroz en 2014 supuso 500 millones de toneladas, de los cuales 413 millones de toneladas fueron destinados al consumo humano (*FAO 2015*). A causa su amplio consumo y de las previsiones de aumento de éste, es de gran importancia el control de las concentraciones de Citrinina.

Debido a la complejidad de la determinación de micotoxinas en alimentos, y en concreto de la Citrinina, su análisis se lleva a cabo habitualmente mediante técnicas de separación tales como la cromatografía y electroforesis capilar (*Ho J.A., 2003; Rodriguez S., 2007; Hernández J.M., 2008; Arroyo-Manzanares N., 2015*). Además de éstas se han utilizado otras técnicas tales como la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) (*Zougagh M., 2008*).

Por otra parte, dado que la Citrinina presenta fluorescencia, otra de las técnicas que se ha utilizado para su determinación sensible y selectiva ha sido la luminiscencia molecular (*Jiménez-López J., 2014*). Esta es la técnica analítica seleccionada para la realización de este Trabajo Fin de Grado.

### **3.3. Técnicas de extracción y clean-up para micotoxinas**

Para la determinación de micotoxinas en alimentos, se conoce una amplia variedad de técnicas de extracción y clean-up (purificación) que permiten la obtención de un extracto libre de interferentes y con una alta concentración del analito en estudio. A la hora de elegir qué técnica utilizar hay que tener en

cuenta el tipo de matriz, las propiedades físico-químicas del analito y el método de detección que se va a usar.

El uso de la extracción líquido-líquido con tierras diatomeas adsorbentes (*Abramson, D., 1999*) y extracción con diclorometano con adición de ácido fosfórico y columnas de poliamidas para el clean-up (*Meister, U., 2004*) permite recuperaciones de entre el 70 y 90%.

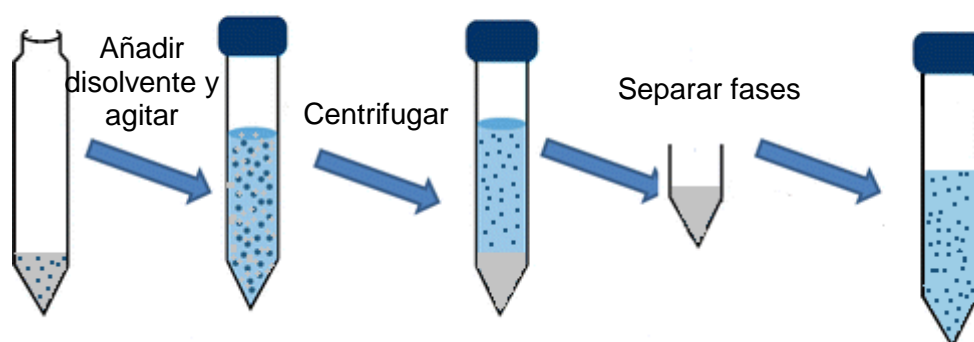
Para la extracción de micotoxinas en matrices sólidas, una de las técnicas más utilizadas es la convencional extracción sólido-líquido (*Hartl A., 2007*). No obstante, en los últimos años se han estado desarrollando técnicas que permiten disminuir el volumen de los disolventes utilizados para la extracción, ya que estos pueden ser contaminantes para el medio ambiente. Entre el año 2008 y 2013 se han publicado más de 100 artículos sobre extracciones de micotoxinas en cereales en los que han sido usadas técnicas como QuEChERS (*Jiménez-López J., 2014*) y extracciones simples sólido-líquido (*Weiping W., 2014*). En el caso del QuEChERS se cumple el requisito anterior de la utilización de poca cantidad de disolventes. Además, lleva implícito un clean-up de la muestra, dejando así el extracto final libre de interferencias.

Otra novedosa técnica es el uso de la extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad (*Categnanaro M., 2006*). En el caso del análisis de muestras sólidas, son usadas como clean-up, por lo que es necesario previamente una extracción sólido-líquido permitiendo la eliminación de gran cantidad de interferencias (*Pereira V.L., 2014*). Esta técnica se la utilizado para la extracción de citrinina en cereales, utilizado diferentes disolventes como metanol, tolueno, acetonitrilo y acetato de etilo.

A continuación se hará una breve descripción de las técnicas de extracción seleccionadas para la realización de este Trabajo Fin de Grado.

### 3.3.1. Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es el técnica de preparación de muestra más antigua que utiliza disolventes. Se basa en la puesta en contacto de una cantidad determinada de muestra con un disolvente o disolventes adecuados. A continuación, la mezcla es sometida a distintos procesos más o menos agresivos dependiendo de la fortaleza de la unión analito-matriz (*Figura 6*). Son cuatro los factores a tener en cuenta para una mayor eficacia de esta técnica, como el tamaño de la partícula, el solvente de extracción, la temperatura y la agitación del fluido.



*Figura.- 6. Procedimiento extracción sólido-líquido*

En el caso concreto de la extracción de micotoxinas en granos, cereales y otros materiales sólidos, la extracción sólido-líquido es una de las técnicas mas usadas. La mayoría de micotoxinas son solubles en disolventes polares e insolubles en disolventes apolares. Por consiguiente, mezclas de disolventes orgánicos, tal como, acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo o metanol, mezcladas con una pequeña cantidad de ácido diluido o agua, son utilizadas para este tipo de extracciones (*Pereira V.L., 2014*).

### 3.3.2. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se basa en la diferente afinidad que presenta el analito (o matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o extracto

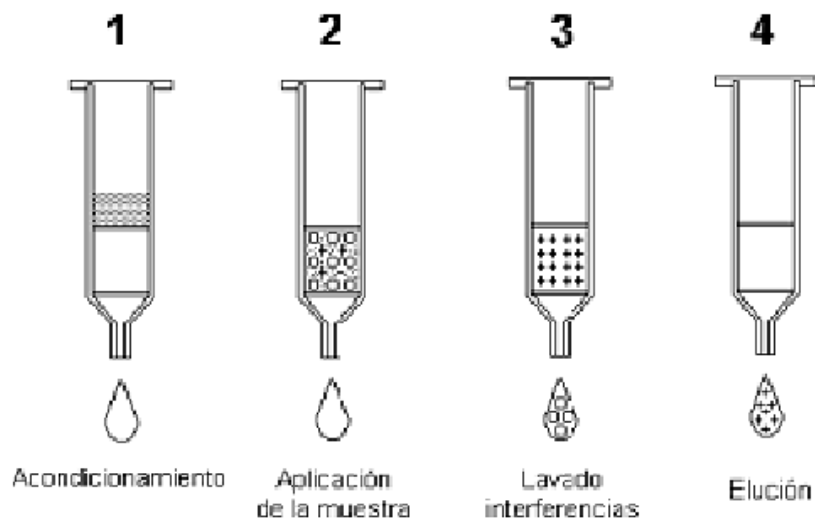
obtenido) (*Cámara C., 2000*). Las más comúnmente usadas son de fase inversa con materiales como por C8 o C18 (*Krska, R., 2008*).

Esta técnica es comúnmente aplicada para la extracción de micotoxinas de muestras líquidas. En el caso de matrices sólidas, como cereales, normalmente se usa como clean-up y/o concentración tras una previa extracción (*Pereira V.L., 2014*). En estos casos la muestra es pasada por el cartucho (columna) en el cual quedan retenidas en el sorbente sólido y luego eluidas con un disolvente orgánico (*Lattanzio V.M.T., 2009*). Estas columnas también sirven para eliminar interferentes procedentes de la matriz. Cuando la extracción en fase sólida es usada como clean-up, el disolvente en el que se encuentra la muestra cuando se pasa a través del sorbente es el propio extractante de los analitos, por lo que habitualmente son los interferentes los que quedan retenidos en el sorbente obteniendo el extracto con la micotoxina.

Las etapas en las que consta esta técnica generalmente son (*Figura 7*) (*Cámara C., 2000*):

1. Acondicionamiento. El sorbente es acondicionado con un disolvente de propiedades similares a la muestra.
2. Aplicación de la muestra. Un determinado volumen de muestra es pasado a través del cartucho que contiene un sorbente adecuado, quedando así los analitos retenidos en él.
3. Lavado. Se eliminan las interferencias mediante el paso a través del sorbente de un disolvente adecuado.
4. Elución. El analito es eluido con un disolvente adecuado



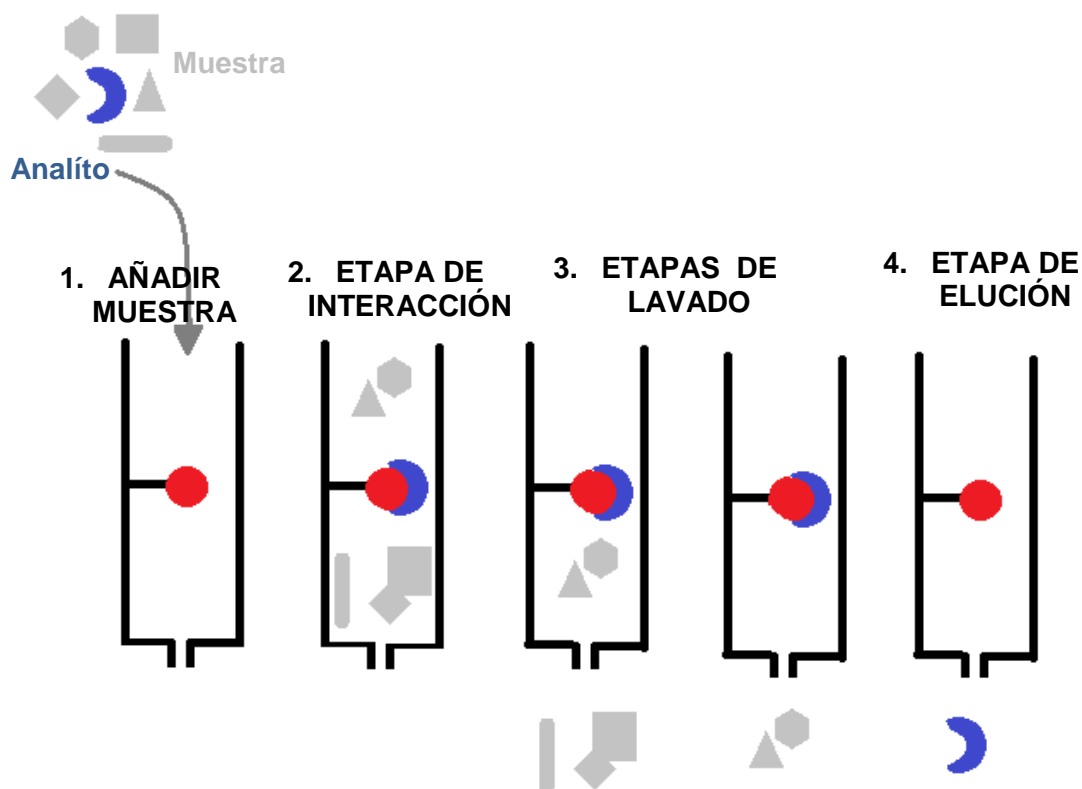


*Figura.- 7. Etapas extracción en fase sólida*

### 3.3.3. Extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad

Esta técnica, que es un caso concreto de la extracción en fase sólida, ha demostrado ser la más eficiente para la extracción de micotoxinas. Debido al aumento de análisis de micotoxinas ha crecido la demanda de materiales más selectivos para esta técnica ya que de esta manera se obtiene una recuperación mayor (Ahmed N.E., 2007). Los más conocidos están basados en materiales de inmunoafinidad o polímeros de impresión molecular las cuales son una alternativa barata, emergente y muy prometedora (Urraca J.L., 2008; Baggiani C., 2008). Para el análisis de micotoxinas las más usadas son las columnas de inmunoafinidad. La principal diferencia de estas columnas con las anteriores, es que las columnas de extracción en fase sólida están compuestas de materiales no específicos, mientras las columnas de inmunoafinidad están compuestas de materiales específicos para cada analito. Pueden ser usadas para una gran diversidad de matrices como en cereales polen de abeja maíz, comida de animales domésticos, vino y cerveza entre otros (Krska R., 1998; García-Villanova R., 2004; Saéz J.M., 2004). En el caso de muestras complejas actúan como clean-up con una previa extracción (Songsermsakul P., 2006; Saéz J.M., 2004).

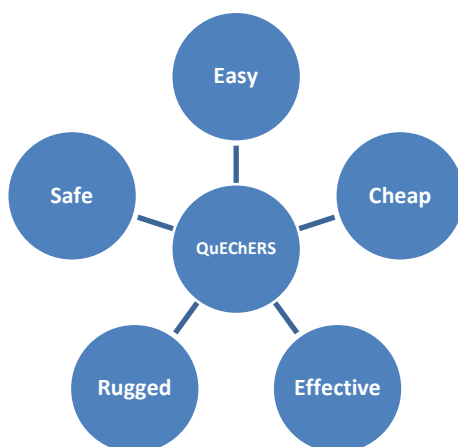
Estas columnas están compuestas por un soporte de fase sólida activa, unidos a anticuerpos específicos para estas micotoxinas. Cuando el extracto pasa a través de la columna, las micotoxinas se unen selectivamente a los anticuerpos, mientras que las impurezas son eliminadas. Luego las micotoxinas son eluidas con un disolvente miscible o por un desnaturizador del anticuerpo (Figura 8). Cuando la muestra es muy compleja, a veces, es necesario combinar las columnas de inmunoafinidad con otras técnicas de extracción, como la extracción líquido- líquido o la extracción en fase sólida convencional. La mayor ventaja de este tipo de columnas es la especificidad de interacción entre el anticuerpo y el analito (Senyuva H.Z., 2010).



*Figura.- 8. Etapas de extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad*

### 3.3.4. QuEChERS

QuEChERS- es la abreviatura de “quick, easy, cheap, effective, rugged y safe”. Se trata pues de un método de extracción rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (Figura 9).



*Figura.- 9. Características del método QuEChERS*

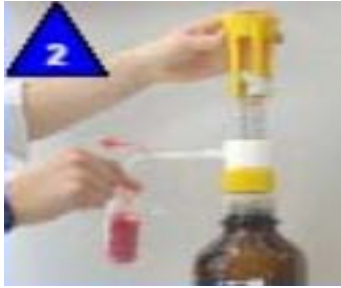
Este método se optimizó inicialmente para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas y verduras (*Anastassiades M., 2003*). En los últimos años ha aumentado su uso para otros analitos como son micotoxinas, acrilamida, aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Normalmente se realiza una micro-extracción con acetonitrilo a la vez que un clean-up. En el paso de la extracción se usa sulfato de magnesio junto con cloruro sódico para reducir el contenido de agua en la muestra en la etapa de clean-up, se usan como adsorbentes una amina secundaria (PSA) o C18.

En el caso de analizar cereales el método inicial requiere algunas modificaciones. Estos cambios consisten en la adición de ácido fórmico al disolvente de extracción, agua o metanol. Se recomienda además la adición de agua para facilitar al disolvente el contacto con la muestra (*Pereira V.L., 2014*).

A continuación se muestran los pasos a seguir en el método *QuEChERS* original (*Figura 10*):



Se pesan 10 g de muestra previamente homogeneizada en un tubo de centrifuga



Se le añade 10 mL de acetonitrilo para llevar a cabo la extracción



Se agita vigorosamente 1 minuto



Se añade 4g de sulfato de magnesio anhidro y 1g de cloruro sódico



Se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos



Se toma 1 mL de sobrenadante en acetonitrilo



Se introduce en un microtubo de centrifuga el cual contiene 25mg de un sorbente PSA y 150 mg de sulfato de magnesio



Se agita durante 30 segundos y se centrifuga  
1 minuto



Se toma una alícuota del extracto para  
analizar

*Figura.- 10. Etapas del método QuEChERS original.*

### **3.4. Técnicas analíticas para determinación de micotoxinas: Luminiscencia Molecular**

La técnica de luminiscencia molecular se clasifica en fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia molecular) y quimioluminiscencia. En los tres casos la molécula de analito se excita para dar lugar a una especie cuyo espectro de emisión suministra información para un análisis cualitativo y cuantitativo. En la fluorescencia y fosforescencia la excitación se consigue a través de la absorción de fotones. En el caso de la fluorescencia, las transiciones electrónicas no conllevan un cambio de spin del electrón y, en consecuencia, ésta tiene un tiempo de vida corto, cesando la luminiscencia casi inmediatamente ( $\leq 10^{-5}$ s). Por el contrario las emisiones de fosforescencia están acompañadas por un cambio del spin electrónico, lo que hace que la radiación sea detectable durante más tiempo después de haber cesado la irradiación de la muestra.

Uno de los aspectos más atractivos de las técnicas de luminiscencia molecular desde el punto de vista analítico es su inherente sensibilidad y bajos límites de detección, siendo inferiores éstos a los encontrados en las técnicas

de absorción molecular. Por otra parte, dado que son relativamente pocas las moléculas que presentan luminiscencia, son técnicas también muy selectivas.

La fluorescencia surge de una transición desde el nivel vibracional más bajo del primer estado electrónico excitado a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental.

El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por lo tanto, si la desactivación por fluorescencia es más rápida respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión. Por otro lado, si un camino sin radiación tiene una constante de velocidad favorable, la fluorescencia no tiene lugar o es menos intensa (*Skoog D, 1992*).

La emisión fluorescente observada en una determinada especie está condicionada por la propia estructura molecular de la sustancia y por otros factores dependientes del medio en que se trabaje, como puede ser el disolvente o pH.

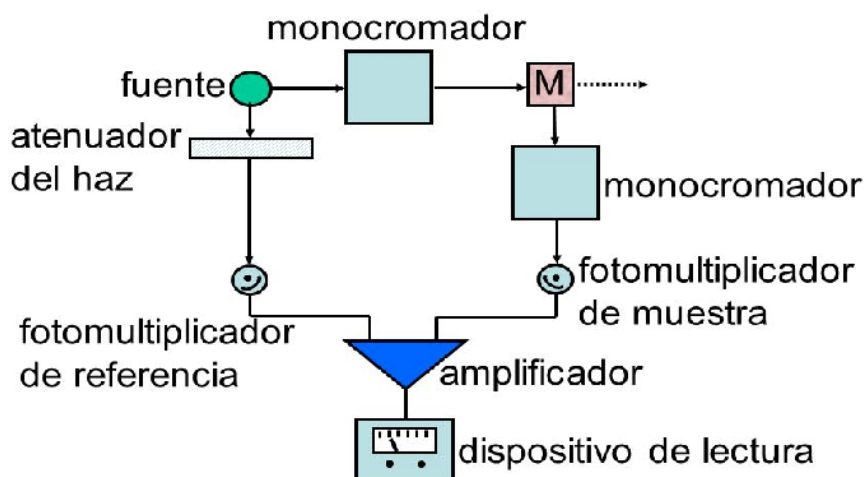
Un factor estructural importante es la rigidez. Experimentalmente se observa que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas, siendo así en el caso de la Citrinina.

El instrumento utilizado para medir fluorescencia es el fluorímetro o espectrofluorímetro. Sus principales componentes son:

- *Fuente de radiación.* Lámpara de arco de Xenón
- Sistema selector de longitudes de onda
- *Cubeta de cuarzo.*
- *Detector.* Tubo fotomultiplicador.

El haz dirigido a la muestra pasa primero a través de un filtro o monocromador, que transmite sólo la radiación de longitud de onda que excita la fluorescencia. La radiación de fluorescencia se propaga luego desde la muestra en todas las direcciones, siendo detectada sólo en la dirección normal al haz de excitación (90°). Esa radiación vuelve a pasar por otro monocromador que aísla el pico de fluorescencia que se quiere medir llegando por último a un detector fotoeléctrico.

El haz de referencia pasa a través de un atenuador, tal y como se ve en la *Figura 11*, disminuyendo su potencia. Las señales que llegan de la muestra y del haz de referencia son procesadas mediante un amplificador.



*Figura.- 11. Principales componentes del espectrofluorímetro.*

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

El estándar de Citrinina fue adquirido de Sigma-Aldrich al igual que metanol, etanol, tolueno, acetato de etilo, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido acético, acetonitrilo, acetato de sodio anhidro, sulfato de magnesio anhidro, cloruro de metileno, ácido clorhídrico e hidróxido sódico.

El agua ultra pura ( $18,2\mu\text{S}$ ) fue preparada en un sistema de purificación Milli-Q Gradient A10.

La disolución estándar de Citrinina se preparó en metanol y fue almacenada en un frasco de vidrio ámbar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A partir de este estándar, se prepararon las disoluciones estándar de trabajo por dilución con agua Milli- Q.

Las columnas de inmunoafinidad Supel Tox OchraBind (Supelco) también fueron adquiridas en Sigma-Aldrich.

## 4.2. Materiales e instrumentos

Se utilizó un mortero de ágata para triturar el arroz hasta tener una partícula lo suficientemente pequeña para pasar por el tamiz cuyo poro fue de  $0.45\ \mu\text{m}$ .



*Figura.- 12. Mortero de ágata*



*Figura.- 13. Tamiz*

El medidor de pH utilizado fue un pH-meter GLP 21 de Crison, el cual presenta una resolución seleccionable entre 0.1, 0.01 y 0.001 pH. El electrodo utilizado fue un electrodo de pH Crison 50-14T, con una escala de pH 0-14, un diámetro de 6mm, membrana semiesférica micro, electrolito Crislyt, cuerpo de vidrio, dos diafragmas cerámicos y un rango de temperatura de trabajo  $-10-100^{\circ}\text{C}$ .



*Figura.- 12. Medidor de pH*

Se hizo uso de una centrífuga Mixtasel-BL Selecta. Ésta tiene una capacidad para 4 tubos de 100mL. Se le puede cambiar el cabezal, dando así opción a utilizarla para otros tubos de diferentes medidas y volúmenes. La placa agitadora Rotaterm Selecta tiene la opción de proporcionar temperaturas desde 5 hasta  $250^{\circ}\text{C}$ . Tiene regulador electrónico de velocidad desde 20 hasta 230 oscilaciones por minuto.





*Figura.- 13. Centrifuga Mixtasel-BL Selecta*



*Figura.- 14. Placa agitadora Rotatem*

El extractor Visipred SPE Vacuum Manifold contiene un sistema de válvula patentada que permite un control preciso del caudal a través de cada tubo de SPE obteniendo así el vacío deseado.

Se utilizó un espectrofotómetro de emisión de fluorescencia Cary Eclipse de Varian.

Permite la medida de muestras de volúmenes muy pequeños ya que dispone de cubetas de volúmenes muy reducidos, hasta 5µL. También dispone de recopilación ultra rápida de datos (<http://www.chem.agilent.com/>).



*Fig.- 15. Extractor Visipred SPE Vacuum Manifold*



*Fig.- 16. Espectrofotómetro de emisión de fluorescencia Cary Eclipse de Varian*

### **4.3. Preparación de muestras**

Previo al tratamiento de muestra, el arroz blanco fue triturado en un mortero de ágata. Posteriormente este fue pasado por un tamiz de poro 0.45 µm para

así conseguir la misma superficie de absorción y la homogenización de la muestra.

Como se ha dicho anteriormente, las técnicas de tratamiento de muestra seleccionadas en este trabajo para la extracción de Citrinina fueron: extracción sólido-líquido, QuEChERS y extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad.

Lo primero que se hizo fue comprobar si el arroz contenía Citrinina. Para esto, se preparó un blanco para cada uno de los métodos de extracción seleccionados. Estos se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras fortificadas, tal y como se explica a continuación.

La fortificación del arroz se llevó a cabo de la siguiente forma: se pesó en un tubo de centrífuga cierta cantidad de arroz molturado (2 g en el caso de la extracción sólido-líquido y extracción en fase sólida, 5 g en el caso del QuEChERS). A continuación, se le añadió la cantidad necesaria de la disolución estándar de Citrinina para obtener una concentración de 5 µg/Kg, cubriendo totalmente el arroz, se mantuvo en contacto durante 24 h y finalmente se evaporó el disolvente mediante corriente de nitrógeno quedando la muestra totalmente seca.

Por último, se procedió a realizar la extracción de Citrinina con las diferentes técnicas seleccionadas.

#### *4.3.1. Extracción sólido- líquido.*

Las extracciones sólido-líquido se realizaron con las siguientes mezclas de disolventes: metanol:agua 8:2 (v/v); etanol:agua 7:3 (v/v); tolueno:acetato etilo:ácido fórmico 7:3:1 (v/v/v) y acetato de etilo:ácido fosfórico 0.5M 10:1 (v/v).

Tanto en la extracción con metanol:agua 8:2 (v/v) (*Figura 17*) y etanol:agua 7:3 (v/v) (*Figura 18*) el procedimiento seguido fue:

Se pesó 2.0000 g de muestra fortificada y se le añadieron 10 mL del extractante. Se agitó vigorosamente durante 5 min y después la mezcla se introdujo en un baño ultrasonidos a temperatura ambiente durante 1 h. A

continuación, se centrifugó durante 5 min a 200 rpm, se recogieron 5mL de sobrenadante con una micro-pipeta y se transvasaron a un vial.



**Figura.- 17.** Procedimiento extracción sólido- líquido metanol: agua 8:2 (v/v)



**Figura.- 18.** Procedimiento extracción sólido- líquido etanol: agua 7:3 (v/v)

En el caso de la extracción con tolueno: acetato etilo:ácido fórmico 7:3:1 (v/v/v) (Figura 19) y acetato de etilo: ácido fosfórico 0.5 M 10:1 (v/v) se siguió el siguiente procedimiento (Figura 20):

Se pesó 2.0000 g de muestra fortificada y se le añadieron 10 mL del extractante. Se agitó vigorosamente durante 5 min y después la mezcla se introdujo en un baño ultrasonidos a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 200 rpm, se recogieron 5 mL de sobrenadante con micro-pipeta y se trasvasaron a un vial. Después se evaporó el disolvente con la ayuda de una corriente de nitrógeno hasta sequedad y se re-disolvió en metanol.



**Figura.- 19.** Procedimiento extracción sólido- líquido con tolueno: acetato etilo: ácido fórmico 7:3:1 (v/v/v)



**Figura.- 20.** Procedimiento extracción sólido- líquido con acetato de etilo: ácido fosfórico 0.5M 10:1 (v/v)

#### 4.3.2. QuEChERS

Se pesó 5,0000 g de muestra fortificada y se le añadieron 1 mL de agua y 10 mL ácido acético al 1% en acetonitrilo. Primero la mezcla fue agitada vigorosamente unos segundos y se centrifugó luego durante 10 min a 200 rpm. Se le añadieron 0,45g de acetato de sodio anhidro y 0.75 g de sulfato de magnesio anhidro y se agitó unos segundos.

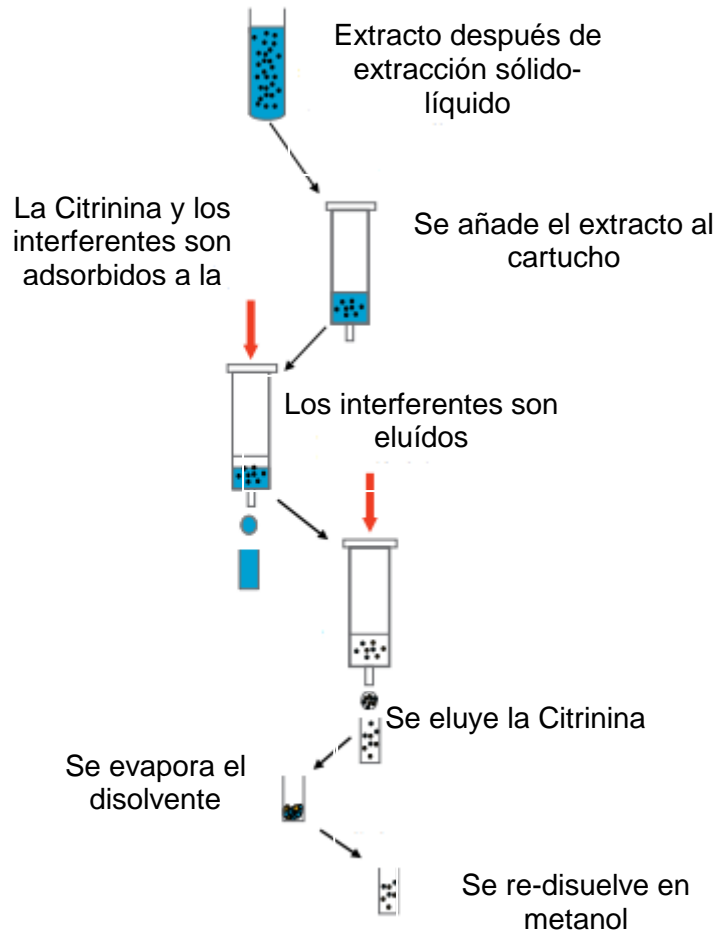
Se volvió entonces a centrifugar, pero esta vez durante 8 min a 200 rpm. Una vez separadas las dos fases se tomaron 5 mL de sobrenadante y se transvasaron a un tubo de centrífuga de 15 mL. A este extracto se le añadieron 150 mg de sulfato de magnesio y 100 mg de tierra de diatomeas. Se agitó vigorosamente durante 1 min y se centrifugó durante 8 min a 300 rpm.

#### 4.3.3. *Extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad.*

Se pesó 2,0000 g de muestra fortificada. A continuación se añadió 1.25 mL de ácido fosfórico 0.1M y 12.5mL de cloruro de metileno. Se agitó durante 1 h en una placa agitadora y se filtró a vacío para separar el arroz del extractante. El extracto se llevó a 25 mL con la misma mezcla de disolventes que se produjo la extracción.

En la segunda etapa del procedimiento (*Figura 21*) se acondicionó primero la columna de inmunoafinidad (cartucho) con 2 mL de la mezcla ácido fosfórico/cloruro de metileno. Se tomaron entonces 7.25 mL del extracto y se mezclaron con 4 mL de hexano. Esta mezcla fue aplicada al cartucho. Se añadieron después a este 15 mL de cloruro de metileno y se pasaron a través del mismo aplicando un leve vacío.

Por último la elución se realizó con 20 mL de una mezcla de cloruro de metileno-ácido fórmico 99:1. El extracto resultante se evaporó en un rotavapor y el residuo obtenido se re-disolvió en 10mL de metanol.



*Figura.- 21.* Procedimiento extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad

#### 4.4. Medida analítica

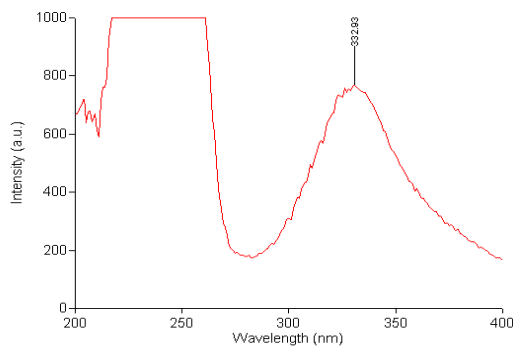
En todos los casos tras la extracción de los extractos se llevó a cabo una dilución 1:200 con agua milli-Q, se ajustó el pH a 1.6 añadiendo HCl 0.5 M y se midió las señales de fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}}=332 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisión}}=508 \text{ nm}$ ; rendijas 10-20; voltaje 700V).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

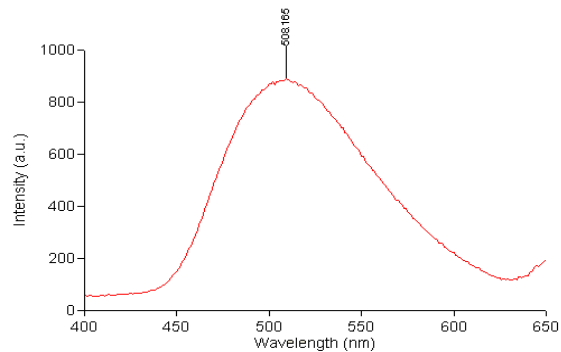
Se optimizaron en primer lugar las características espectrales del analito, así como las variables instrumentales y las variables químicas que influyen en la fluorescencia.

## 5.1. Características espectrales de la Citrinina

En primer lugar se procedió a realizar los espectros de excitación (*Figura 22*) y de emisión (*Figura 23*) de la Citrinina utilizando para ello una disolución de la misma de 15ppb. A partir de los mismos se eligieron las siguientes longitudes de onda de medida  $\lambda_{\text{excitación}}=332\text{nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}}=508\text{nm}$ .



*Figura.- 22.* Espectro de excitación Citrinina, 15 ppb.



*Figura.- 23.* Espectro de emisión Citrinina, 15 ppb.

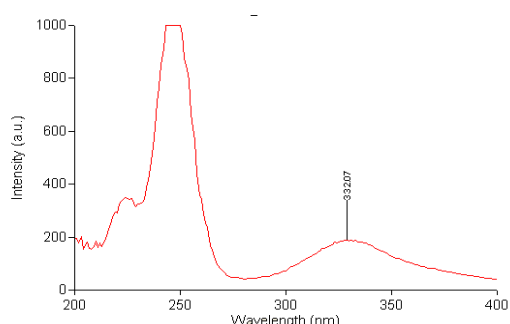
## 5.2. Optimización variables instrumentales

En la detección por fluorescencia es necesario optimizar variables instrumentales tales como la anchura de las rendijas de excitación/ emisión y el voltaje del tubo fotomultiplicador.

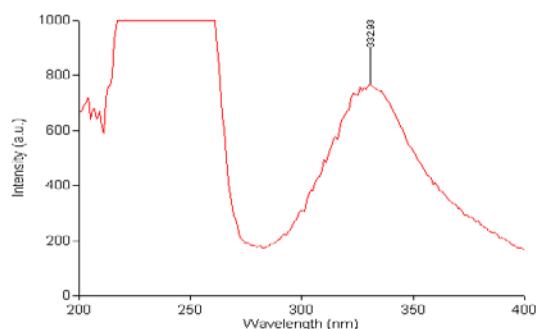
El estudio de la influencia de la anchura de las rendijas de excitación y emisión se llevó a cabo sobre una disolución de Citrinina de 500ppb. En este estudio se estableció un valor fijo (5, 10, 20 nm) para la rendija de excitación y se fue variando la apertura de la rendija de emisión (5, 10, 20 nm). El criterio utilizado para seleccionar unos determinados valores de anchura de rendijas de excitación/ emisión fue que la relación entre el valor de la señal de fluorescencia y el de la señal de fondo fuera lo más alto posible, sin que el valor de fondo sobrepasara las 250 unidades de fluorescencia (midiendo entre 0 y 1000). De este modo habría un rango amplio que permitiera medir la

luminiscencia debida exclusivamente al analito. Se tomaron por tanto como rendijas óptimas 10-20 después de haber probado diferentes combinaciones.

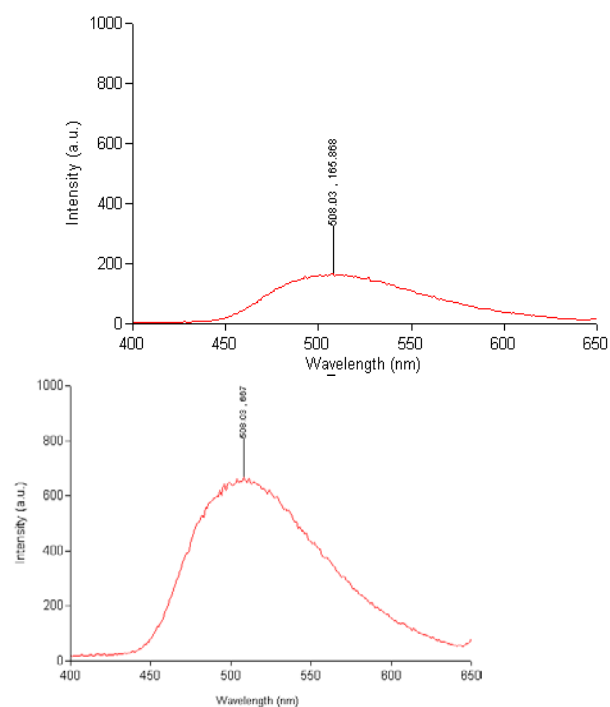
El voltaje del tubo fotomultiplicador es una variable crítica en las medidas de fluorescencia. Como norma general, al aumentar el voltaje se produce un aumento de la señal, para un mismo valor de rendijas. En los espectros (*Figuras 24-27*) se muestra como aumenta la intensidad de la señal al aumentar el voltaje de 600 a 700V tanto en los espectros de emisión como de excitación. Se seleccionó finalmente un voltaje 700V.



**Figura.- 24.** Espectro de excitación Citrinina, 600V, rendijas 10-20.



**Figura.- 25.** Espectro de excitación Citrinina, 700V, rendijas 10-20.



**Figura.- 26.** Espectro de emisión Citrinina, 600V, rendijas 10-20.

**Figura.- 27.** Espectro de emisión Citrinina, 700V, rendijas 10-20.

En la siguiente (*Tabla 2*) se recogen los valores optimizados para las variables instrumentales:

*Tabla 2. Valores optimizados para las variables instrumentales.*

Condiciones de la medida	
$\lambda_{\text{emisión}}$ (nm)	508
$\lambda_{\text{excitación}}$ (nm)	332
RENDIJAS (nm)	10-20
VOLTAJE (V)	700

### 5.3. Optimización de las variables analíticas

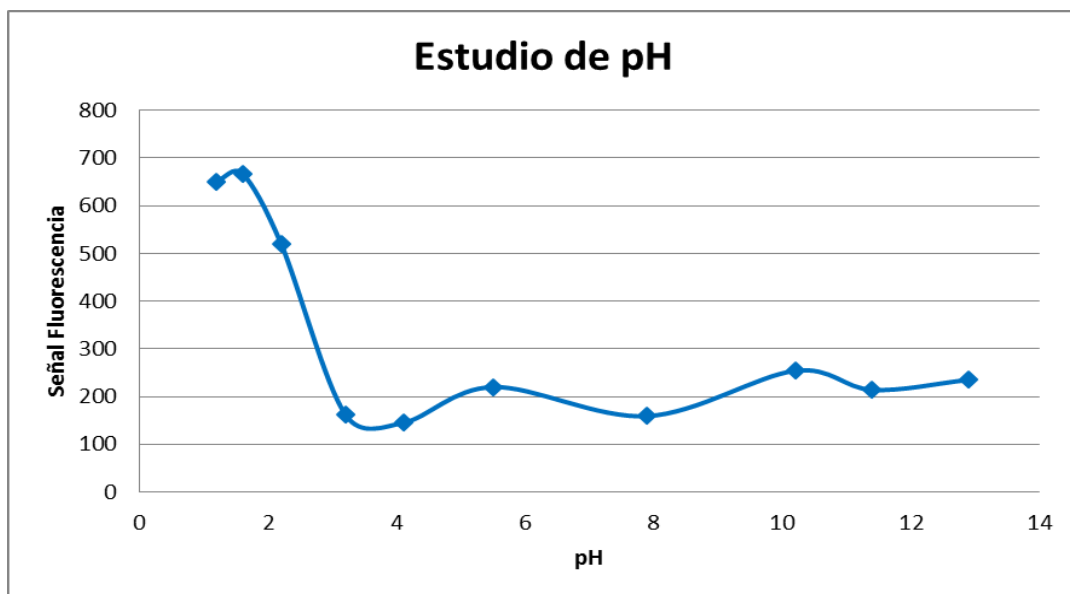
Una vez optimizadas las variables instrumentales, se procedió a optimizar las variables analíticas, en este caso el pH. Se comenzó midiendo el pH de la disolución estándar de Citrinina la cual tenía un pH= 5.10.

A continuación se midieron las señales de disoluciones de Citrinina de 15ppb a las que se le ajustó el pH a diferentes valores mediante la adición de HCl (0.5 M) y NaOH (0.5 M).

Se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la *Figura 28* y se llegó a la conclusión que el pH óptimo que proporcionaba una señal de mayor intensidad estaba entre 1.5-2.0.

Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que el valor de pKa de la Citrinina sea 1.52, por lo que su extracción efectiva en disolventes orgánicos sólo será posible a valores de pH muy ácidos, a los que el grupo carboxilo estará protonado.





*Figura.- 28. Gráfica de la variación de la señal de fluorescencia en función del pH*

Se elige como pH de trabajo para posteriores experiencias un valor de 1.6.

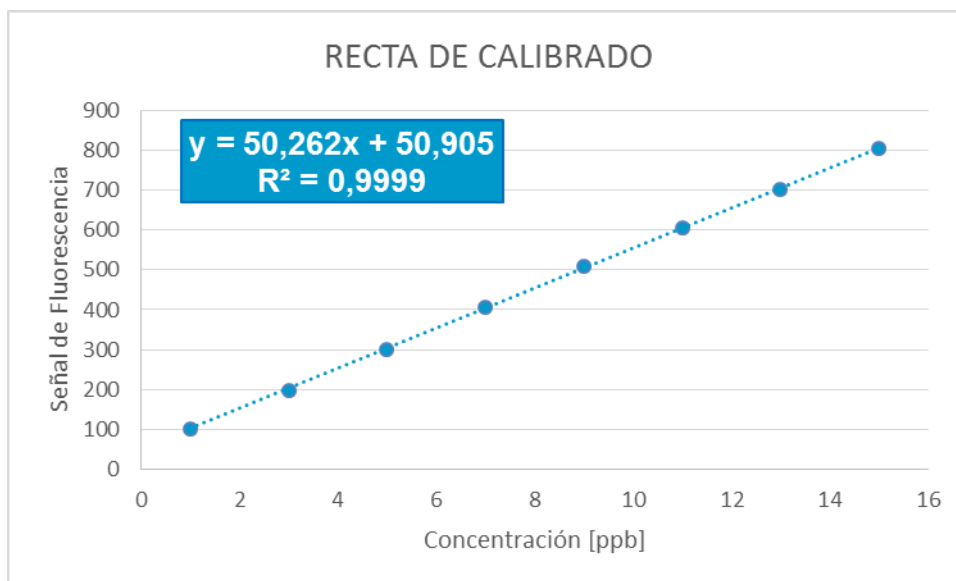
#### 5.4. Calibración

Para evaluar la linealidad del método se preparó una recta de calibrado (Figura 29) con 8 niveles de concentración de Citrinina comprendidos en el rango 1 – 15 ppb (Tabla 3).

La recta de calibrado ( ) se construyó mediante el trazado de las relaciones de señal neta de fluorescencia (y), una vez restado el blanco, del estándar de Citrinina frente a la concentración (x) de ésta.

*Tabla 3. Datos Recta de Calibrado*

Concentración [ppb]	Señal
1	102
3	198
5	301
7	405
9	508
11	604
13	703
15	803



*Figura.- 29. Representación gráfica recta de calibrado*

## 5.5. Extracción de la Citrinina

En los siguientes apartados y tablas (*Tablas 4-9*) se muestran los datos experimentales obtenidos mediante fluorescencia para la determinación de Citrinina en arroz blanco.

La señal utilizada para la determinación del analito fue la obtenida de la media de tres extracciones independientes. Las señales de blanco fueron restadas a las señales obtenidas de las muestras fortificadas (señal neta).

- **Extracción sólido- líquido con metanol: agua**

*Tabla 4. Señales obtenidas de la extracción sólido- líquido con metanol: agua*

Análisis	Señal	Media	Señal neta
<b>Blanco 1</b>	69	67,66	-
<b>Blanco 2</b>	66		
<b>Blanco 3</b>	68		
<b>Blanco Fortificado 1</b>	420	416,33	348,66
<b>Blanco Fortificado 2</b>	412		
<b>Blanco Fortificado 3</b>	417		
<b>Muestra Fortificada 1</b>	364	356,33	288,66
<b>Muestra Fortificada 2</b>	335		
<b>Muestra Fortificada 3</b>	370		

- **Extracción sólido- líquido con etanol:agua**

*Tabla 5. Señales obtenidas de la extracción sólido- líquido con etanol: agua*

Análisis	Señal	Media	Señal neta
<b>Blanco 1</b>	94	86,33	-
<b>Blanco 2</b>	84		
<b>Blanco 3</b>	81		
<b>Blanco Fortificado 1</b>	440	439,33	353,00
<b>Blanco Fortificado 2</b>	437		
<b>Blanco Fortificado 3</b>	441		
<b>Muestra Fortificada 1</b>	385	363,33	277,00
<b>Muestra Fortificada 2</b>	345		
<b>Muestra Fortificada 3</b>	360		

- **Extracción sólido- líquido con tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico**

*Tabla 6. Señales obtenidas de la extracción sólido- líquido con tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico*

Análisis	Señal	Media	Señal neta
<b>Blanco 1</b>	117	111,33	-
<b>Blanco 2</b>	110		
<b>Blanco 3</b>	107		
<b>Blanco Fortificado 1</b>	260	260,33	297,66
<b>Blanco Fortificado 2</b>	258		
<b>Blanco Fortificado 3</b>	263		
<b>Muestra Fortificada 1</b>	244	245,00	266,66
<b>Muestra Fortificada 2</b>	245		
<b>Muestra Fortificada 3</b>	246		

- **Extracción sólido- líquido con acetato de etilo: ácido fosfórico 0.5M**

**Tabla 7.** Señales obtenidas de la extracción sólido- líquido con acetato de etilo: ácido fosfórico 0.5M

Análisis	Señal	Media	Señal neta
Blanco 1	83	75,33	-
Blanco 2	70		
Blanco 3	73		
Blanco Fortificado 1	237	249,00	173,66
Blanco Fortificado 2	265		
Blanco Fortificado 3	245		
Muestra Fortificada 1	225	224,33	149,00
Muestra Fortificada 2	220		
Muestra Fortificada 3	228		

- **QuEChERS**

**Tabla 8.** Señales obtenidas de la extracción mediante el método QuEChERS

Análisis	señal	Media	Señal neta
Blanco 1	95	96	-
Blanco 2	93		
Blanco 3	100		
Blanco Fortificado 1	476	476,33	380,33
Blanco Fortificado 2	478		
Blanco Fortificado 3	475		
Muestra Fortificada 1	444	433,00	337,00
Muestra Fortificada 2	405		
Muestra Fortificada 3	450		

- **Extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad**

**Tabla 9.** Señales obtenidas de la extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad

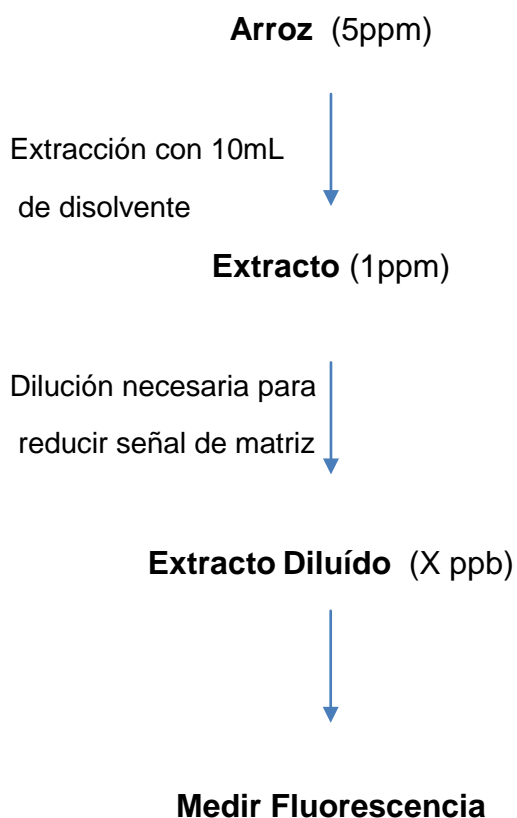
Análisis	señal	Media	Señal neta
Blanco 1	40	41,33	-
Blanco 2	43		
Blanco 3	41		
Blanco Fortificado 1	373	370,00	428,66
Blanco Fortificado 2	367		
Blanco Fortificado 3	370		
Muestra Fortificada 1	216	255,00	213,66

<b>Muestra Fortificada 2</b>	260		
<b>Muestra Fortificada 3</b>	289		

### 5.5.1. Determinación del efecto matriz

Antes de determinar los porcentajes de recuperación se comprobó si existía o no efecto matriz. Este consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes de la matriz. Es decir, para la misma concentración de analito el análisis de una muestra o disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta.

Para determinar si se tiene efecto matriz se realizó una extracción al arroz previamente fortificado con 5 ppm. De esta manera se obtenía un extracto con 1 ppm si la extracción hubiera sido del 100%. Se diluyó doscientas veces por lo que se obtenía una concentración de 5 ppb. Como con el resto de muestras el pH fue ajustado antes de medir a 1.6. Se midió en el espectrofluorimetro (Figura 30).



Comparar con calibrado



**Concentración (Y ppb)**

*Figura.- 30. Esquema para cálculo del efecto matriz de las muestras fortificadas previamente a la extracción*

A continuación se realizó una nueva extracción, esta vez, a arroz sin fortificar. Una vez se tiene el extracto se le añade cierta cantidad de la disolución de Citrinina para obtener una concentración después de la dilución de 5 ppb. De esta manera se garantiza que al medir la señal corresponda a una concentración de 5 ppb, es decir, se considera el 100% de la extracción (Z ppb). Se determina si hay efecto matriz comparando la señal correspondiente al blanco fortificado (Z ppb) y la señal correspondiente al extracto diluido del arroz fortificado (X ppb) (Figura 31).

**Arroz**

Extracción con 10mL  
de disolvente



**Extracto**

Dilución necesaria para  
disminuir la señal de  
matriz



**Extracto Diluido**

Se añade la cantidad  
necesaria de Citrinina  
para 5ppb



**Medir Fluorescencia**



Comparar con calibrado

### Concentración (Z ppb)

*Fig.- 31. Esquema para el cálculo del efecto matriz de los blancos fortificados posterior a la extracción*

El efecto matriz se calculó para el caso concreto de la extracción sólido-líquido con metanol: agua 8:2 de la siguiente manera:

*Señal muestra fortificada neta: 288.67*

*Señal extracto fortificado neta: 348,67*

*Señal patrón de 5ppb: 370*

Se comparó la señal del extracto fortificado con la señal del patrón de 5ppb (concentración que se espera si se consiguió una extracción del 100%).

$$348,67/370 \times 100 = 94,23\%$$

La señal se reduce por tanto un 5.76%. El factor necesario para calcular el porcentaje de recuperación teniendo en cuenta el efecto matriz es 0,94.

Este mismo procedimiento fue aplicado a las demás extracciones. En la (Tabla 10), se muestran el valor del efecto matriz de cada método de extracción aplicado en este Trabajo Fin de Grado.

*Tabla 10. Valores efecto matriz*

Método de extracción	Efecto Matriz %
Sólido- líquido metanol: agua	5,76 (negativo)
Sólido- líquido etanol: agua	1,18(positivo)
Sólido- líquido tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico	14,00(negativo)
Sólido- líquido acetato de etilo: ácido fosfórico 0.5M	5,60(negativo)
QuEChERS	2,60(negativo)
Fase sólida con columnas de inmunoafinidad	1,47(positivo)

### 5.5.2. Determinación de los porcentajes de extracción

El porcentaje de extracción se calculó teniendo en cuenta el efecto matriz en cada caso.

A modo de ejemplo se muestra el cálculo para la extracción sólido- líquido con metanol:agua 8:2:

Se determina primero cual sería la señal obtenida si no hubiese efecto matriz.

$$288,67/0,94= 307,09$$

Se compara esta señal con la señal del patrón de 5ppb, obteniendo así la concentración experimental correspondiente a las señales obtenidas.

$$(307,09/370) \times 5ppb= 4.14ppb$$

Comparando la concentración teórica con la concentración experimental se calculó el porcentaje de extracción:

$$(4,14ppb/ 5ppb) \times 100= 82,99\%$$

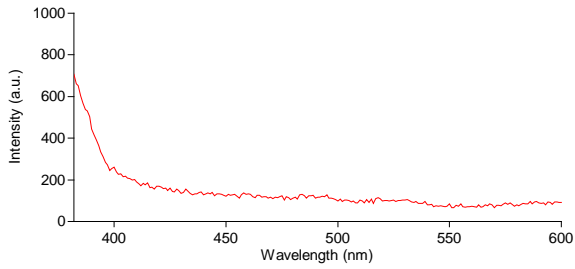
*Tabla 11. Porcentajes de extracción*

Método de extracción	% de recuperación
Sólido- líquido metanol: agua	82,99
Sólido- líquido etanol: agua	83,21
Sólido- líquido tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico	92,96
Sólido- líquido acetato de etilo: ácido fosfórico 0.5M	86,14
QuEChERS	93,96
Fase sólida con columnas de inmunoafinidad	64,68

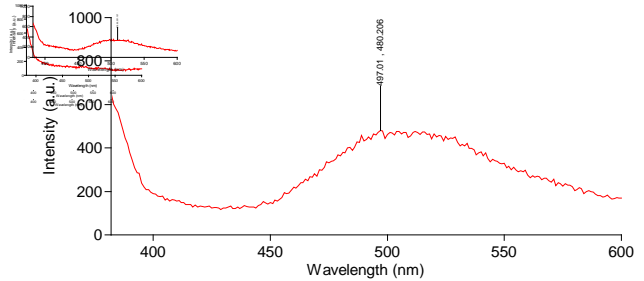
Aunque en principio cabía esperar que la extracción en fase sólida con columnas de inmunoafinidad resultara ser la más efectiva, a la vista de los resultados (*Tabla 11*) el método de extracción que proporciona una mejor extracción es el QuEChERS. Es necesario tener en cuenta que el soporte de inmunoafinidad utilizado es específico para la Ocratoxina A, aunque se ha utilizado también en bibliografía para la determinación de Citrinina



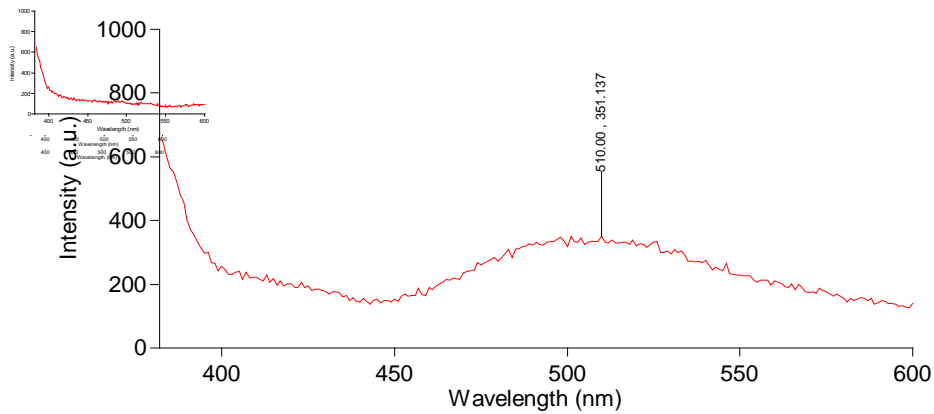
A continuación se muestran unos ejemplos (*Figuras 29-36*) de los espectros obtenidos de algunos de los extractos medidos mediante fluorescencia. Estos fueron obtenidos con las condiciones analíticas e instrumentales anteriormente tratadas.



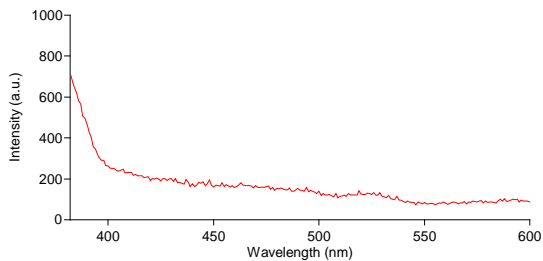
**Figura.- 29.** Espectro de emisión blanco de la extracción sólido- líquido con etanol: agua



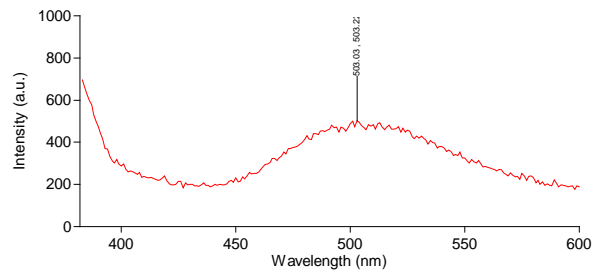
**Figura.- 30.** Espectro de emisión blanco fortificado de la extracción sólido- líquido con etanol: agua



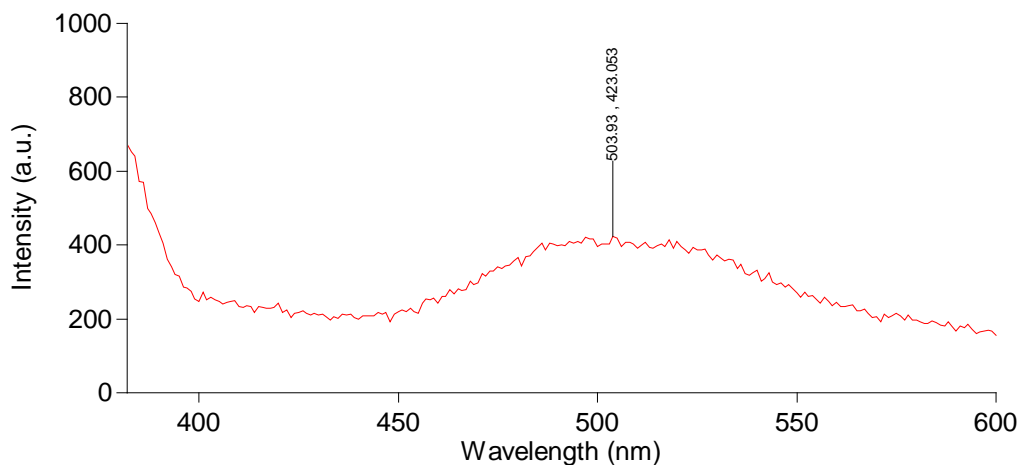
**Figura.- 31.** Espectro de emisión arroz fortificado de la extracción sólido- líquido con etanol: agua



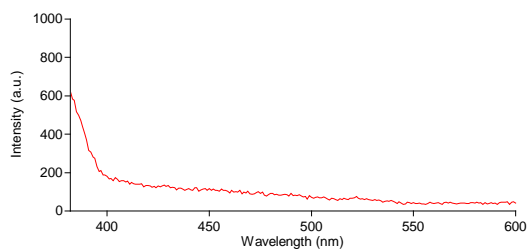
**Figura.- 32.** Espectro de emisión blanco de la extracción QuEChERS



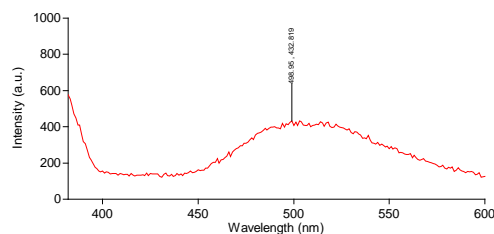
**Figura.- 33.** Espectro de emisión blanco fortificado de la extracción QuEChERS



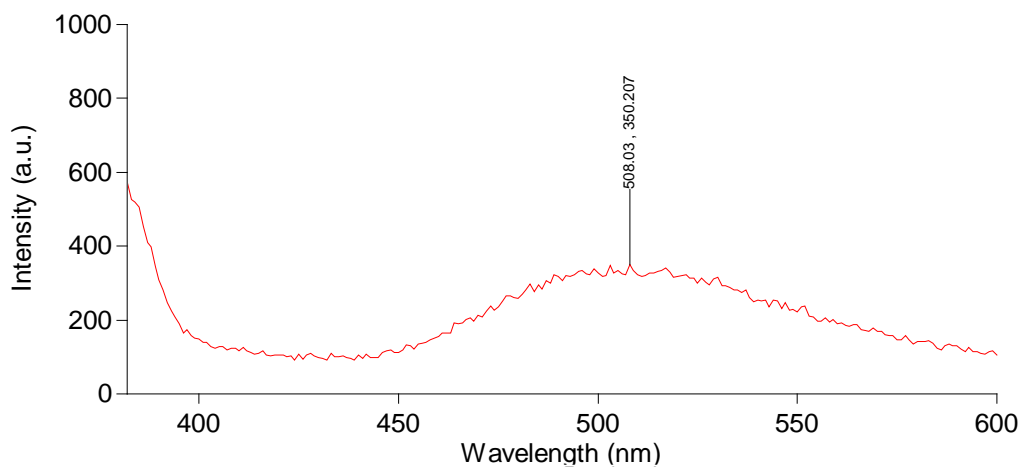
**Figura.- 33.** Espectro de emisión arroz fortificado de la extracción QuEChERS



**Figura.- 34.** Espectro de emisión blanco de la extracción sólido-líquido con metanol: agua



**Figura.- 35.** Espectro de emisión blanco fortificado de la extracción sólido-líquido con metanol: agua



**Figura.- 36.** Espectro de emisión arroz fortificado de la extracción sólido-líquido con metanol: agua

## 6. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado se han comparado diferentes métodos de extracción para la determinación de la micotoxina Citrinina en arroz blanco. A partir de los resultados obtenidos se concluye que el método QuEChERS es el tratamiento de muestra que permite un mayor porcentaje de extracción, concretamente del 93,96 %. Este método permite la extracción de la micotoxina y a la vez lleva implícita una etapa de purificación (clean-up) del extracto.

Por otra parte, se ha desarrollado un método analítico sensible y selectivo para la determinación de Citrinina en arroz blanco, que está basado en la medida de la intensidad de la fluorescencia de los extractos obtenidos a partir del método QuEChERS. El método es suficientemente sensible como para cumplir los requerimientos establecidos por la Legislación Europea en cuanto a las cantidades máximas permitidas de Citrinina en arroz blanco.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Abramson D., Hulasare R., White NDG., Jayas DS., Marquardt RR. Mycotoxin Formation in Hulled Barley During Granary Storage at 15 and 19% Moisture Content. *Journal of Stored Products Research*, 1999, 35, 297-305.
- [2] AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. *Micotoxinas*, 2014.
- [3] Ahmed N.E., Farag MM., Soliman KM., Abdel-Samed AKM., Naguib KM. Evaluation of Methods Used to Determine Ochratoxin A in Coffee Beans. *J.Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 9576-9580.
- [4] Anastassiades M., Lehotay S J., Stajnbaher D., Schenck FT. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Procedure. *Journal of AOAC International*, 2003, 86, 412-431.
- [5] Arroyo-Manzanares N., Huertas-Pérez JF., García-Campaña AM., Gámiz-Gracia L. Simple Methodology for the Determination of Mycotoxins in Pseudocereales, Spelt and Rice. *Food Control*, 2014, 36, 94-101.

- [6] Arroyo-Manzanares N., Huertas-Pérez JF., García-Campaña AM., Gámiz-Gracia L. Simple and Efficient Methodology to Determine Mycotoxins in Cereal Syrups. *Food Chem*, 2015, 177, 274-279.
- [7] Baggiani C., Anfossi L., Giovannoli C. Molecular Imprinted Polymers as Synthetic Receptors for the Analysis of Myco- and Phyco-Toxins. *Analyst*, 2008, 133, 719-730.
- [8] Bezerra ME., Changas-Oliveira-Freire F., Erlan-Feitosa-Maia F., Florindo-Guedes MI., Rondina D. Mycotoxins and Their Effects on Human and Animal Health. *Food Control*, 2014, 36, 159-165.
- [9] BOE, Boletín Oficial de Estado. Modificación del Reglamento (CE) n o 1881/2006 en lo que Concierne a los Contenidos Máximos del Contaminante Citrinina en Complementos Alimenticios Basados en Arroz Fermentado con Levadura roja *Monascus Purpureus*, 212/2014.
- [10] Cámara C., Fernandez-Hernando P., Martín-Esteban A., Pérez-Conde C., Vidal M. *Toma y Tratamientos de Muestras*, Ed.Sintesis, Madrid, 2002.
- [11] Castegnaro M., Leszkowicz A. Advantages and Drawbacks of Immunoaffinity Columns in Analysis of Mycotoxins in food. *Mol. Nutr. Food Res*, 2006, 50, 480-487.
- [12] FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Seguimiento del Mercado del Arroz*, 2015.
- [13] García- Villanova R., Cordón C., Gonzalez-Paramas AM., Aparacio P., García-Rosales ME. Simultaneous Immunoaffinity Column clean-up and HPLC Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spanish Bee Pollen. *J.Agric. Food Chem*, 2004, 52, 7235-7239.
- [14] Hackbart H., Pretto L., Primel EG., Garda- Buffon J., Badiale-Furlong E. Simultaneous Extraction and Deterction of Ochratoxin A and Citrinin in Rice. *J. Braz Chem. Soc.* 2012, 1, 103-109.
- [15] Hartl A., Stenzel WR. 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*, 2007, 3, 127-131.
- [16] Heras A. *Separación de Micotoxinas Mediante Cromatografía de Líquidos de Ultrapresión Aco*, Jorge Loring S.L., España 2011.
- [17] Hernández- Hierro JM., García-Villanova RJ., González- Martín I. Potencial of Near Infrared Spectroscopy for the Analysis of Mycotoxins Applied to Naturally Contaminated Red Paprika Found in the Spanish Market. *Anal. Chim.*, 2008,622,198-194.
- [18] Ho J.A, Durst R.A. Detection of fumonisin B1: Comparision of Flow-Injection Liposome Immunoanalysis With High- Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem*, 2003, 6, 7-13.

- [19] Jiménez J., Llorent-Martínez E., Ortega-Barrales P., Ruíz-Medina A. Multicommutated Fluorometric Optosensor for the Determination of Citrinin in Rice and Read Yeast Rice Supplements. *Food Additives & Contaminants*, 2014, 10, 1744-1750.
- [20] Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinelli A., Sulyok M., MacDonald S., y Crews C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants*, 2008, 25, 152-163.
- [21] Krska R. Performace of Modern Simple Preparation Techniques in the Analysis of Fusarium Mycotoxins in Cereals. *J.Chromatogr*, 1998, 815, 49-57.
- [22] Lattanzio VMT., Pascale M., Visconti A. Current Analytical Methods for Trichothecene Mycotoxins in Cereals. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28, 758-768.
- [23] Martinez MR., Anadón A. *Micotoxinas: Toxicología alimentaria*, Ed. Ediciones Díaz de Santos, Madrid 2012.
- [24] Meister U. New Method of Citrinin Determination by HPLC After Polyamide Column Clean-up. *European Food Research and Technology*, 2004, 218, 394-399.
- [25] Nguyen MT., Tozlavanu M., Tran TL., Pfohl-Leszkowicz A. Occurrence of Aflatoxin B1, Citrinin and ochratoxin A in Rice in Five Provinces of the Central Region Vietnam. *Food Chem*, 2007, 105, 42-47.
- [26] Rahmani A., Jinap S., Soleimany F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8, 202-251.
- [27] Rodriguez- Mozaz S., López de Alda M J., Barceló D. Advantages and Limitations of On-line Solid Phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography-mass Spectrometry Technologies Versus Biosensors for Monitoring of Emerging Contaminants in Water. *J. Chromatogr. A.*, 2007, 1152, 97-115.
- [28] Pereira VL., Fernanades JO., Cunha SC. Mycotoxins in Cereals and Related Foodstuffs: A Review on Occurrence and Recent Methods of Analysis. *Trends in Food Science & Techology*, 2014, 36, 96-136.
- [29] Saéz J.M., Medina A., Gimeno-Adelantado JV., Mateo R., Jiménez M. Comparison of Different Simple Treatments for the Analysis of Ochratoxin A in Must, Wine and Beer by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1029, 125-133.
- [30] Senyuva HZ., Gilbert J. Immunoaffinity Column Clean-up Techiques in Food Analysis: A Review. *Journal of Cromatography*, 2010, 878, 115-132.
- [31] Skoog D. Holler FM., Nieman TA. *Principios de Análisis Instrumental*, 8ª Ed., McGraw.Hill, Madrid 1992.

- [32] Songsermsakul P., Sontag G., Cochna-Markl M., Zentek J., Razzazi-Fazeli E. Determination of Zearalenone and its Metabolites in Urine, Plasma and Faeces of Horses by HPLC-APCI-MS. *J. Chromatogr. A.*, 2006, 843, 252-261.
- [33] Soriano JM. *Micotoxinas en Alimentos*, Ediciones Díaz Santos, Madrid 2007.
- [34] UE. Reglamento (UE) No 212/2014 de la Comisión de 6 de Marzo de 2014 por el que se modifica el reglamento (CE) no 1881/2006 en lo que concierne a los contenidos máximos del contaminante Citrinina en complementos alimenticios basados en arroz fermentado con levadura roja *Monascus purpureus*, Diario Oficial de la Unión Europea, 2014, L 67/3.
- [35] Urraca JL., Carbajo MC., Torralvo MJ., Gonzalez-Vazquez J., Orellana G., Moreno-Bondi MC. Effect of the Template and functional Monomer on the Textural Properties of Molecularly Imprinted Polymers. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 155-161.
- [36] Wang W. Comparison of Extraction Methods for Analysis in Red Fermented Rice. *Food Chemistry*, 2014, 157, 408-412.
- [37] Yogendrarajah P., Van-Poucke C., De-Meulenaer B., De-Saeger S. Development and Validation of a Quechers Based Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Multiple Mycotoxins in Spices. *J Chromatogr. A.*, 2013, 1297, 1-11.
- [38] Zaied C., Zouaoui N., Bacha H., Abid S. Natural Occurrence of Citrinin in Tunisian Wheat Grains. *Food Control*, 2012, 1, 106-109.
- [39] Zougagh M., Ríos A. Supercritical Fluid Extraction of Macrocyclic Lactone Mycotoxins in Maize Flour samples for Rapid Amperometric Screening and Alternative Liquid Chromatographic Method for Confirmation. *J. Chromatogr. A.*, 2008, 1177, 50-57.
- [40] <http://www.analisisvinicos.com/>
- [41] <http://www.cromlab.es/>
- [42] <http://www.chem.agilent.com/>
- [43] <http://www.quimica.urv.es/quimio/>
- [44] <http://www.romerlabs.com/>
- [45] <http://www.slideplayer.es/>