

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE BAJO IMPACTO AMBIENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA

Yésica S. Lambrese, Viviana E. Calvente, Soledad E. Cerutti, Delia A. Benuzzi, María I. Sanz Ferramola, Julio Raba.

FQByF, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Argentina. INQUISAL, Departamento de Química, Universidad Nacional de San Luis, CONICET, San Luis, Argentina. Ejercito de los Andes 950, San Luis, Argentina. yesicalambrese@gmail.com

Introducción: La patulina es una micotoxina producida por los hongos del género *Penicillium* que contamina distintos tipos de alimentos, entre ellos cereales, nueces, y gran variedad de frutas. Particularmente, en manzanas, tiene mayor incidencia el *P. expansum*, principalmente en la etapa de postcosecha de la fruta, ya que la mayoría de las especies productoras de patulina crecen a temperaturas de refrigeración.[1] El mayor problema entonces lo constituyen los productos elaborados en base a la mencionada fruta, sobre todo jugos y purés destinados a la alimentación de niños. En los últimos años la demanda de jugos naturales y sin aditivos alimentarios ha aumentado, lo que podría significar un aumento en la incidencia de esta micotoxina. Se han fijado los límites máximos de concentración en alimentos en 50 ppb para zumos de frutas, 25 ppb para productos sólidos elaborados con manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados al consumo directo y, por último, en 10 ppb para zumo de manzana y productos sólidos elaborados a base de manzanas, destinados a los lactantes y niños de corta edad [2]. El control de la materia prima y la prevención de su contaminación implica contar con metodología adecuada para determinar no sólo la incidencia de hongos probablemente toxicogénicos, sino también su capacidad para la producción de la toxina. Esto supone el análisis de una mayor cantidad de muestras que las que se necesitan en el caso del producto terminado por lo que es importante explorar alternativas al método tradicional de determinación de patulina [3], que sean confiables y ambientalmente aceptables.

Objetivos: Por tal motivo, este trabajo propone el desarrollo de un método para determinación de patulina evaluando la microextracción líquido-líquido dispersiva y optimización de los parámetros UHPLC-MS/MS desde el medio de cultivo YGM que sería el aplicado para la determinación de la incidencia de cepas productoras de la micotoxina en la materia prima.

Materiales y métodos: Se realizó la optimización del tiempo de agitación de la microextracción líquido-líquido dispersiva usando como solvente dispersivo isopropanol 1000 µL y como extractante cloroformo 1000 µL. Para la detección por espectrometría de masas y cromatografía líquida de ultraelevada resolución utilizando un cromatógrafo UPLC Acquity acoplado a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Por las características químicas de la patulina se utilizó una columna de cromatografía líquida de fase reversa C18. Se evaluaron los parámetros operativos que afectan la separación seleccionando entre diferentes fases móviles. Se fijaron las condiciones de ionización y variables de fragmentación/detección del espectrómetro de masas mediante infusión directa de 1ppm de patulina en acetato de etilo.

Resultados: Se calcularon los factores de recuperación con respecto al tiempo de agitación, con una recuperación máxima del orden de la técnica oficial. Luego de la optimización de separación se seleccionó como fases móviles A: H₂O y B: metanol (50:50) para la elución en modo gradiente (t = 0-1 min, B: 98%; t= 1,5-2 min, B: 20%,

t= 2,5-3 min, B: 98%). Para la detección en masa se fijaron los parámetros óptimos de fragmentación con fuente de ionización por electrospray en modo negativo ((-)ESI). En modo ((+)ESI) no hubo detección. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de las especies ($[M-CO_2]^-$ 109,1; $[C_5-H_5O]^-$ 81; $[C_4H_5]^-$ 53), como también que estas especies no dependen de la naturaleza de los solventes, pero que al agregar ácido fórmico como agente modificador éste suprime la señal. El límite de detección de la técnica analítica fue de 5ppb.

Conclusión: Se desarrolló una técnica de determinación de patulina en la cual, el preparado de muestra es rápida, de bajo costo y amigable con el medio ambiente, cuya detección en UHPLC-MS/MS permite encontrar concentraciones de la micotoxina por debajo de la técnica oficial.

Referencias:

- [1]- Víctor Ortega, M.D. (2011). Evaluación de la microextracción líquido-líquido dispersiva para la determinación de patulina en zumos de manzana mediante electroforesis capilar. (Trabajo final de Master en Química). Universidad de Granada. España
- [2]- Reglamento (CE) N° 1881/2006, 19 de diciembre 2006.
- [3]- AOAC International. (2000) Method 200.02, Official Method of Analysis of AOAC International, 17 th ed., AOAC International, Gaithersburg, M.D, EE.UU.