

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“Determinación del contenido de Patulina en manzanas, jugos y néctares de manzana,
por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa”

Disertación previa a la obtención del título Licenciado en Ciencias Químicas,
especialidad Química Analítica.

CRISTINA SORAYA VILLACÍS REYES

Quito 2011

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, especialidad Química Analítica, de la candidata Cristina Soraya Villacís Reyes ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: 06 de junio de 2011

Firma del Director de la Disertación

M.Sc. Wendy Heredia R.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a Dios por ser mi motor de vida y a mis padres por su amor, apoyo y ejemplo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo. Agradezco a:

Dios por ser mi luz y mi compañero de toda la vida.

Mis padres por su enseñanza, amor y guía.

La Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y maestros por todos los conocimientos impartidos durante mi carrera.

Msc. Wendy Heredia por su dirección y soporte durante toda la carrera y sobre todo en la realización de este trabajo.

Laboratorio Especial de Aseguramiento de la Calidad de la Región Bolivariana de Nestlé por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación y haberme abierto sus puertas para poder desarrollarme como profesional, especialmente a Ramiro Valarezo por su confianza y a todos mis amigos y compañeros por su soporte y amistad.

Mis amigos porque junto a ellos he compartido grandes momentos y han sido de apoyo para terminar mi carrera.

Gracias nuevamente a todos de corazón.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	x
ABREVIACIONES.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. LOS HONGOS Y SUS TOXINAS.....	5
1.1.1. PENICILLIUM.....	6
1.1.2. ASPERGILLUS.....	6
1.1.3. FUSARIUM.....	7
1.2 MICOTOXINAS.....	8
1.2.1. ORIGEN DE LAS MICOTOXINAS.....	10
1.2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS.....	11
1.2.2.1 TEMPERATURA.....	11
1.2.2.2. ACTIVIDAD DE AGUA.....	11
1.2.2.3. INFLUENCIA DEL pH Y OXÍGENO.....	12
1.2.2.4 SUSTRATO.....	12
1.2.2.5. INTERACCIONES MICROBIANAS.....	13
1.2.3. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS.....	13
1.3 PATULINA.....	15
1.3.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.....	15
1.3.2 ORGANISMOS QUE PRODUCEN PATULINA Y FACTORES QUE INTERVIENEN EN SU CRECIMIENTO.....	16
1.3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PATULINA.....	17
1.3.3.1 ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y EXCRECIÓN.....	17
1.3.3.2 ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE PATULINA.....	17
1.3.3.2.1 ESTUDIOS IN VIVO.....	17
1.3.3.2.2 ESTUDIOS IN VITRO.....	18
1.3.3.2.3 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS.....	18
1.3.4 EFECTOS SOBRE LA SALUD.....	20
1.3.4.1 SÍNTOMAS AGUDOS.....	20
1.3.4.2 SÍNTOMAS CRÓNICOS.....	20
1.3.5 PRODUCCIÓN DE PATULINA EN ALIMENTOS.....	21
1.3.6 INGESTA DIARIA DE PATULINA.....	21

1.3.7 LEGISLACIÓN DE PATULINA VIGENTE	22
1.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE PATULINA	23
1.4.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA	23
1.4.2 TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y DE CUANTIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA.	25
1.5 LA MANZANA	30
1.5.1 PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE MANZANA EN ECUADOR	30
2. PARTE EXPERIMENTAL	32
2.1 ÁREA DE ESTUDIO	32
2.2 MUESTREO.....	32
2.3 MÉTODO ANALÍTICO SELECCIONADO.....	36
2.3.1 RESUMEN DEL MÉTODO ANALÍTICO SELECCIONADO.....	37
2.3.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	37
2.3.2.1 MATERIALES.....	37
2.3.2.2 REACTIVOS.....	38
2.3.2.3 EQUIPOS	38
2.3.2.4 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	38
2.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	39
2.3.4 PROCEDIMIENTO	39
3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
3.1 COMPROBACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL MÉTODO	41
3.1.1 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	41
3.1.2 ESTABLECIMIENTO DEL RANGO LINEAL DE CURVA DE CALIBRACIÓN..	43
3.1.3 ENSAYOS DE RECUPERACIÓN.....	46
3.2 OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS DATOS.....	47
3.3 CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE PATULINA EN LAS MUESTRAS.....	47
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	54
4. CONCLUSIONES.....	57

5. RECOMENDACIONES	59
6. REFERENCIAS	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los riesgos para la salud derivados de los alimentos.

Tabla 2. Clasificación de las principales micotoxinas.

Tabla 3. Toxicidad de patulina en diferentes especies de ratas

Tabla 4. Niveles máximos admitidos de patulina en alimentación humana.

Tabla 5. Criterios exigibles a los métodos de análisis de ocratoxina A, patulina y toxinas de *Fusarium*.

Tabla 6. Variedades que se cultivan en las zonas altas del Ecuador y la época de cosecha

Tabla 7. Resumen de la toma de muestras de manzanas frescas.

Tabla 8. Resumen de la toma de muestras de jugos y néctares de manzana.

Tabla 9. Análisis de la señal del blanco para la determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Tabla 10. Datos de concentraciones y señales promedios obtenidos de la curva de calibración para la determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Tabla 11. Datos de la curva de calibración para la determinación del rango lineal.

Tabla 12. Cálculo de regresión lineal utilizando la curva de calibración en el rango de 0,0129 μ g/mL a 1,2869 μ g/mL y su respectiva gráfica.

Tabla 13. Resultados obtenidos en manzanas frescas

Tabla 14. Resultados obtenidos en jugos y néctares de manzana.

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) para manzanas frescas.

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) para muestras de jugos y néctares de manzana.

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) para muestras de origen nacional e importado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del género *Penicillium*

Figura 2. Estructura del género *Aspergillus*

Figura 3. Estructura del género *Fusarium*

Figura 4. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.

Figura 5. Esquema de los niveles combinados de actividad de agua y temperatura que permiten la producción de patulina.

Figura 6. Fórmula de la patulina

Figura 7. Gráfico de barras de los resultados del análisis de patulina que relaciona la concentración de patulina en $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs variedad de manzana

Figura 8. Gráfico de barras de los resultados del análisis de patulina que relaciona la concentración de patulina en $\mu\text{g}/\text{L}$ vs marcas de jugos y néctares de manzana

Figura 9. Gráfico de barras de los resultados del análisis de patulina que relaciona la concentración de patulina en $\mu\text{g}/\text{L}$ vs periodo de muestreo de jugos y néctares de manzana

Figura 10. Diagrama pastel del porcentaje de muestras de manzanas frescas que contienen o no patulina.

Figura 11. Diagrama pastel del porcentaje de muestras de manzanas frescas que contienen patulina.

Figura 12. Diagrama pastel del porcentaje de muestras de jugos y néctares de manzana que contienen o no patulina.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Información general del estándar de patulina.

Anexo 2. Hoja de especificación del estándar de patulina.

Anexo 3. Cromatograma junto a espectro de absorción de la patulina a la longitud de onda máxima (276nm)

Anexo 4. Método AOAC 995.10 Patulin in Apple Juice. Liquid Chromatographic Method. Chapter 49 (Natural Toxins). Section 49.7.02, año 2005.

Anexo 5. Directiva 2003/78/Comunidad Europea de la Comisión de 11 de agosto de 2003 por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios.

Anexo 6. Parámetros de la regresión lineal.

Anexo 7. Prueba de Tuckey. Rangos de significancia entre interacciones de marcas y lotes

ABREVIACIONES

a_w : Actividad de agua

A.: Aspergillus

AOAC Association of Official Analytical Chemist

CE: Comunidad Europea

C.V.: Coeficiente de variación

DF: Grados de Libertad

F.: Fusarium

FAO: Food and Agricultural Organization

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

IDTMP: Ingesta diaria tolerable máxima provisional.

ISTP: Ingesta semanal tolerable permitida.

JECFA: Asesoramiento científico de la Comisión del Codex Alimentarius. Comité mixto
FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios.

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación.

NOEL: Es la mayor dosis experimental a la que no se observa un efecto

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTA: Ocratoxina A

P.: Penicillium

P.M.: Peso molecular

Pr: Probabilidad

UV – VIS: Ultravioleta visible

RESUMEN

Las micotoxinas son toxinas naturales producidas por hongos, son metabolitos que en determinadas circunstancias se desarrollan en productos alimenticios de origen animal o vegetal y pueden causar enfermedades, y en algunos casos la muerte al hombre y los animales.

Se han identificado cientos de micotoxinas que son producidas por unas 200 variedades de hongos ^[1], entre ellas la Patulina y debido a la ocurrencia de esta micotoxina en manzanas y productos derivados a base de ellas, se realizó este trabajo en 16 muestras de jugos y néctares de manzana y 4 variedades de manzana diferenciadas visualmente las cuales fueron tomadas en el Distrito Metropolitano de Quito.

Se utilizó el método estándar. AOAC 995.10 Patulin in Apple Juice. Liquid Chromatographic Method. Chapter 49 (Natural Toxins). Section 49.7.02, año 2005. Se trabajó en un rango lineal de 0,013µg/mL a 1,287µg/mL con un coeficiente de correlación de 0,999. La patulina fue extraída y purificada mediante una extracción líquido – líquido y cuantificada mediante cromatografía líquida con un detector de arreglo de diodos a una longitud de 276nm.

Debido a que en el Ecuador no existe una legislación para el control de patulina, los resultados obtenidos en este trabajo los hemos comparado con normas internacionales las cuales señalan como límite máximo 50µg/kg de patulina para manzanas, jugos, concentrados de manzana y alimentos que la contengan como ingrediente. ^[2,3,4]

¹ Carrillo, Leonor (2007). Los hongos de los alimentos y forrajes. Mohos y Micotoxinas.
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf>

² FAO (2003) Legislación Micotoxinas

De los resultados obtenidos podemos observar que el 80% de manzanas frescas no contienen patulina, el 7.5% de las muestras contienen valores que se encuentran dentro de los límites máximos permitidos y el 12.5% corresponde a muestras que contienen mayor a 50µg/kg de patulina. El 48% de los jugos y néctares de manzana no contienen patulina, el 50% contienen patulina pero dentro de los límites máximos permitidos y el 2% de las muestras contiene patulina sobre el límite máximo permitido.

³ Codex Alimentarius Commission (2003) Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. CA/RCP-2003. Pre-publication. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

⁴ Consejo de la Unión Europea. (2003). Reglamento CE N° 1425/2003 de la Comisión del 11 de agosto de 2003 que modifica el reglamento CE N° 466/2001 en lo relativo a la patulina. Bruselas.

ABSTRACT

Micotoxins are natural toxins produced by fungi. They are metabolites that sometimes develop in food products from animal or vegetation sources. They can cause illness and death in animals and humans.

Hundred of micotoxins produced by 200 types of fungi have been identified. One of them is Patulin and because of their presence in apples and products made with apples, this study had been made in 16 samples of juices and apple nectars and 4 kinds of apples visually recognized. All of these samples were taken in Distrito Metropolitano de Quito.

AOAC 995.10 Patulin in Apple Juice. Liquid Chromatographic Method. Chapter 49 (Natural Toxins). Section 49.7.02, year 2005. The standard method was used. A linear range from 0,013 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 1,287 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with a correlation coefficient of 0.999 was worked with. Patulin was extracted and purified by liquid – liquid extraction and it was quantified by high performance liquid cromathography with a photo diode array detector to 276nm.

In Ecuador there isn't legislation that controls the content of patulin in products, that's why we compared the results of this investigation with international regulation. These regulations consider 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patulin as maximum limit allowed for apples, juices, nectars and food that content these ingredients.

Results show that 80% of fresh apples have patulin, 7.5% of samples comply with legislation and 12.5% are over the maximum limit of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patulin.

48% of apples juices and nectars do not have patulin, 50% have patulin but the levels comply with the legislation and 2% of samples have patulin over the maximum limit permitted.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. LOS HONGOS Y SUS TOXINAS

Las toxinas son metabolitos secundarios que se producen bajo condiciones sub óptimas y de estrés de los metabolitos primarios. La cantidad producida depende de parámetros nutricionales y ambientales. La formación de toxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica. Las toxinas son específicas, cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, más restringido es el número de especies de hongos productores.

Las especies de hongos suelen dividirse en dos grupos:

- Hongos de campo: invaden las semillas mientras el cultivo todavía está en el campo y requieren condiciones de alta humedad (20-21%). En este grupo están incluidas las especies fusarium, alternaria, clodosporium, diplodia, gibberella y helminthosporium.
- Hongos de almacenaje: invaden las frutas, granos o semillas durante el almacenamiento. Necesitan condiciones de humedad entre 13 y 18%. Incluyen las especies aspergillus y penicillium. ^[5]

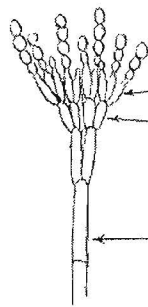
Existen géneros de hongos productores de micotoxinas entre los que se destacan el penicillium, aspergillus y fusarium debido a que pueden estar presentes en un gran número de alimentos y son los que más especies micotoxigénicas producen. A continuación se describen cada uno de estos hongos:

⁵ KnowMycotoxins (2008). Crecimiento de los hongos, <http://www.knowmycotoxins.com/es/ndairy.htm>, 05 de abril de 2009.

1.1.1. PENICILLIUM

Se caracteriza por la producción de células pequeñas que forman colonias y crecen generalmente de manera rápida, están formadas por densas agrupaciones de conidióforos en forma de pincel y la mayoría presenta coloraciones azules o verdosas con una textura aterciopelada y lanosa. Predomina en los climas templados y presenta especificidad para colonizar ciertas frutas o vegetales, por ejemplo, el *P. digitatum* y *P. italicum* son hongos de frutas cítricas, *P. expansum* ataca a las manzanas y el *P. gladioli* ataca al maíz y bulbos. La estructura del género *Penicillium* se muestra en la figura 1.

Figura 1. Estructura del género *Penicillium*.



Fuente: *Micotoxins Formation, Analysis and Significance*. Smith, Jhon (1985).

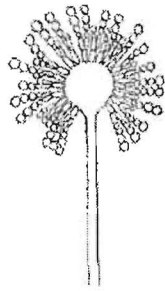
1.1.2. ASPERGILLUS

Son especies que se producen con mayor frecuencia en climas cálidos. Las colonias de las especies de este género se desarrollan de forma rápida y presenta diversas tonalidades blanquecinas, amarillentas, marrones amarillentas, negruzcas, marrón negruzco o verdoso. Este género tiene particular importancia debido a que contiene especies capaces de crecer con actividades de agua bajas (0.65 – 0.85)^[6] y está asociado con el crecimiento en especies

⁶ Smith, Jhon E. (1985). *Micotoxins Formation, Analysis and Significance*, John Wiley & Sons Ltda., Great Britain. pp 23.

demasiado secas para ser atacadas por otros microorganismos. Este género está asociado con la producción de aflatoxinas (*A. flavus*), ocratoxinas (*A. ochraceus*) y patulina (*A. clavatus*). En la figura 2 se muestra la estructura del género *Aspergillus*.

Figura 2. Estructura del género *Aspergillus*



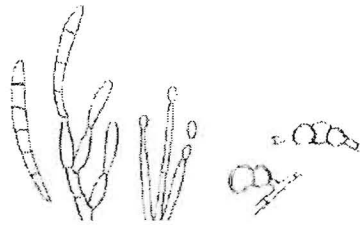
Fuente: *Micotoxins Formation, Analysis and Significance*. Smith, Jhon (1985).

1.1.3. FUSARIUM

Presenta una amplia distribución tanto en suelos como en sustratos orgánicos. Se considera que es el género de mayor prevalencia en zonas templadas y frías del hemisferio norte y se encuentra habitualmente en cereales cultivados en regiones templadas de América, Europa y Asia. Las toxinas más comunes producidas por este género son los Tricotocenos, Zearalenona, Moniliformina y Fumonicinas. Pueden producirse tanto en el crecimiento de la planta como al principio del almacenamiento.

En la figura 3 se muestra la estructura del género *Fusarium*.

Figura 3. Estructura del género *Fusarium*



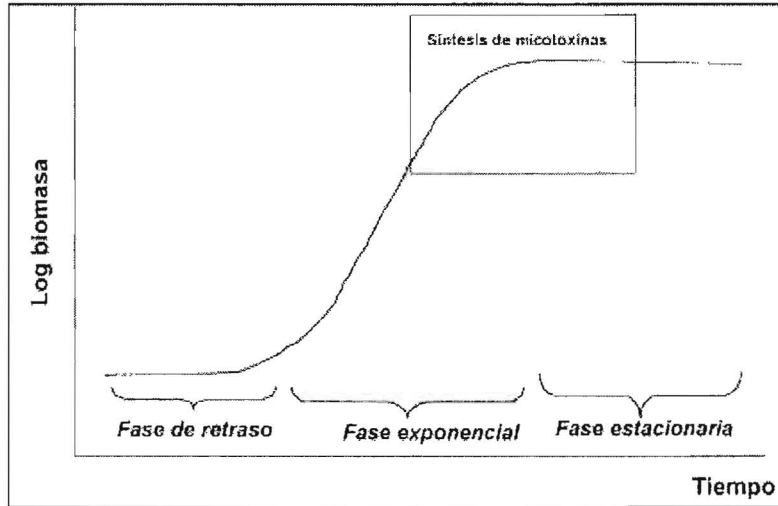
Fuente: *Micotoxins Formation, Analysis and Significance*. Smith, Jhon (1985).

1.2 MICOTOXINAS

Su nombre se deriva de la palabra griega *mikes* que significa hongo y *toxina* que significa veneno. Las micotoxinas son toxinas naturales producidas por organismos del reino fungi que incluyen mohos (hongos) y levaduras, en su mayoría aeróbicos; se encuentran en cantidades pequeñas, son comúnmente especies microscópicas y requieren materia orgánica para su crecimiento. Las micotoxinas son metabolitos secundarios que en determinadas circunstancias se desarrollan en los productos alimenticios de origen animal o vegetal, los cuales pueden causar enfermedades y en algunas ocasiones la muerte al hombre y los animales. La enfermedad causada por las micotoxinas se denomina micotoxicosis y puede ser primaria cuando se consume alimentos contaminados y secundaria cuando se ingiere carne o leche de animales que consumieron alimentos contaminados, un ejemplo de este último caso es la aflatoxina M1 presente en la leche que se produce luego de que la vaca ha ingerido alimentos contaminados con aflatoxina B1 y puede producir intoxicaciones a nivel infantil. Las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas ($P.M < 700$)^[7] y suelen formarse al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo como se muestra en la figura 4.

⁷ Soriano Del Castillo, José. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*, Díaz de Santos, México. pp 3.

Figura 4. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.



Fuente: Micotoxinas en alimentos. Soriano del Castillo, José (2007).

Desde el punto de vista de la exposición y la gravedad de las lesiones crónicas, las micotoxinas presentan actualmente un riesgo más grave que los contaminantes antropogénicos, los plaguicidas y los aditivos alimentarios como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los riesgos para la salud derivados de los alimentos.

AGUDOS		CRÓNICOS
	Altos	
Agentes microbiológicos	↑	Micotoxinas
Ficotoxinas		Contaminantes antropogénicos
Algunas fitotoxinas		Algunas fitotoxinas
Micotoxinas		Alimentación desequilibrada
Contaminantes antropogénicos	↓	Ficotoxinas
Aditivos alimentarios		Agentes microbiológicos
Residuos de plaguicidas		Aditivos alimentario
		Residuos de plaguicidas.
	Bajos	

Fuente: FAO/OMS (1999)

1.2.1. ORIGEN DE LAS MICOTOXINAS

Los efectos de las micotoxinas son conocidos por el hombre desde hace muchos años. En Europa, durante la edad media, se presentaron epidemias que causaron la muerte a miles de personas, la causa de estas epidemias fue el ergotismo, micotoxicosis originada por el moho *Claviceps purpurea*. Sin embargo, es a principios de la década de los 60 cuando en Gran Bretaña e Inglaterra ocurre un brote de una rara enfermedad de etiología desconocida que causó la muerte de miles de bovinos, ovinos, pollos y pavos, cuya causa estaba asociada al alimento que consumían estos animales, específicamente a una harina de maní importada de Brasil. De allí, se logró aislar una sustancia producto del crecimiento de un hongo que al ser suministrada a animales sanos produjo una sintomatología, compatible con la desconocida enfermedad, demostrándose que dicha sustancia había sido producida por una cepa de *Aspergillus flavus* de donde se derivó el nombre de aflatoxina.

En primeros estudios realizados sobre micotoxinas, Fleming descubrió la penicilina como consecuencia de que los hongos que estaba cultivando en las placas Petri inhibieron el crecimiento de bacterias a su alrededor ya que una de las funciones biológicas de las micotoxinas es proteger al organismo que las produce de otros que puedan matarlas o impedir su máximo desarrollo y crecimiento.

Durante la Segunda Guerra Mundial, pocos años después del descubrimiento de la penicilina, un grupo de investigadores de la Marina Real de Inglaterra habían demostrado que un producto de la especie del *Penicillium patulum*, era beneficioso para el resfriado común, años más tarde la patulina fue aislada por su propiedad de antibiótico contra bacterias gram positivas y gram negativas sin embargo, estudios posteriores demostraron que el efecto de la

patulina en el resfriado era despreciable y además era muy tóxica para ser usada como un agente anti-microbiano en el hombre. En 1954 la patulina fue implicada en la muerte de 100 vacas que comieron piensos contaminados en Japón. ^[8,9]

1.2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS

Existen varios factores que influyen sobre la cantidad y la velocidad de formación de toxinas entre los cuales podemos destacar:

1.2.2.1 TEMPERATURA

Los hongos crecen en un amplio intervalo de temperatura, siendo la temperatura ambiente la más adecuada; sin embargo, la refrigeración por sí sola no suele ser suficiente para frenar el crecimiento de los hongos ya que algunos son capaces de crecer a bajas temperaturas.

1.2.2.2. ACTIVIDAD DE AGUA

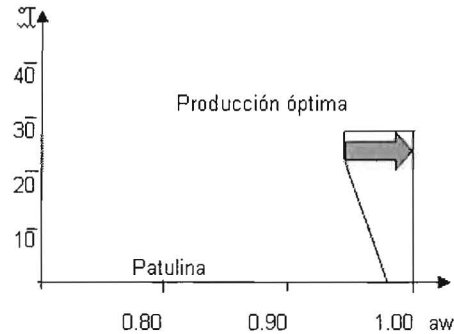
La actividad de agua (a_w) se usa en microbiología como medida de la disponibilidad de agua por parte de los microorganismos, es independiente del sustrato y junto con la temperatura son los factores más determinantes del desarrollo de hongos. En términos generales, los hongos necesitan a_w bajas para su formación y desarrollo; sin embargo, los requerimientos mínimos de a_w para sintetizar sus micotoxinas suelen ser más altos que aquellas necesidades hídricas que requieren para su crecimiento.

A continuación se presenta una gráfica en la que se ilustra el rango de temperatura en grados centígrados y actividad de agua en la que crecen los microorganismos del género *Penicillium* productores de patulina (Figura 5).

⁸ Idem 6. pp 50-72

⁹ Idem 7. pp 4-13.

Figura 5. Esquema de los niveles combinados de actividad de agua y temperatura que permiten la producción de patulina.



Fuente: Micotoxinas en Alimentos. Soriano del Castillo, José (2007).

1.2.2.3. INFLUENCIA DEL pH Y OXÍGENO

Los hongos son capaces de crecer en un intervalo de pH entre 2 y 8, siendo un valor cercano a 5 el más óptimo. Generalmente las especies de *Aspergillus* y *Fusarium* no toleran pH muy ácidos entre 2 y 3 mientras que las especies *Penicillium* son capaces de desarrollarse a valores de pH más bajos que otros géneros.^[10]

Los hongos suelen ser organismos aeróbicos que se desarrollan sobre la superficie del medio, sin embargo algunas especies pueden desarrollarse en medios profundos o en medios líquidos, con una baja tasa de oxígeno o incluso en una atmósfera modificada, con CO₂ y N₂.

1.2.2.4 SUSTRATO

Para una determinada cepa fúngica, la capacidad para producir micotoxinas y la cantidad sintetizada es función del sustrato sobre el cual el hongo se desarrolla. Se conoce que la proporción proteínas/carbohidratos es responsable de potenciar la síntesis de muchas

¹⁰ Idem 7.

micotoxinas, así como las fuentes de carbono como azúcares. La elevada cantidad de aminoácidos libres existentes en el sustrato también se han empleado como una posible explicación para justificar la elevada tasa de producción de micotoxinas.

1.2.2.5. INTERACCIONES MICROBIANAS

La interacción entre los microorganismos no solo afecta al desarrollo microbiano, sino también puede producir un efecto marcado en la síntesis de micotoxinas. Es así como el crecimiento de una micotoxina sobre un alimento puede inhibir el crecimiento de otra o por el contrario, puede aumentar su efecto tóxico. Es conocido que un hongo puede producir varias toxinas sobre un alimento o una misma toxina sobre varios alimentos. Los hongos pueden proliferar formando colonias donde los niveles de micotoxina pueden llegar a ser altos y su peligrosidad puede variar grandemente.

1.2.3. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS

Existen aproximadamente 200 toxinas fúngicas ^[11] producidas principalmente por hongos del género penicillium, aspergillus y fusarium, entre las cuales podemos destacar las que se describen en la tabla 2:

¹¹ Cole, Richard J. (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academia Press Inc., United States of America.

Tabla 2. Clasificación de las principales micotoxinas.

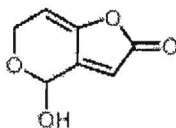
AFLATOXINAS	Producidas mayoritariamente por hongos del género <i>aspergillus</i> . Se clasifican en B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ , Q ₁ , P ₁ y aflatoxicoles encontradas generalmente en cereales y secreciones (leche y orina). El principal órgano afectado por la ingesta de estas toxinas es el hígado.
OCRATOXINAS	El grupo está compuesto por la ocratoxina A, B y C y sus respectivos metil y etil ésteres. Se pueden encontrar naturalmente en cereales, café y cacao, y los principales órganos afectados por su ingesta son el hígado y los riñones. Son metabolitos de los géneros <i>aspergillus</i> , <i>penicillium</i> y <i>fusarium</i> .
TRICOTICENOS	Se los puede clasificar en T-2, HT-2, monoacetoxyscirpenol, diacetoxyscirpenol, tricoxermina, scirpentriol, nivalenol, fusarenon-X, deoxinivalenol, deoxinivalenol nomoacetato, tricotecin, roridinas y verrucarinas. Se las puede encontrar naturalmente en el trigo y otros cereales. Tienen una alta actividad insecticida y causan problemas en la piel, tracto digestivo, sistema nervioso y cardíaco.
FUMONICINAS	Está presente en el maíz y son producidas por hongos del género <i>fusarium</i> . Se clasifican en B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₄ , A ₁ , y A ₂ . Los principales síndromes que producen son neurotóxicos, nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral, hepatotóxicos y lesiones cardíacas.
ZEARALENONA	Está presente en los granos, especialmente en el maíz y muestra una fuerte actividad estrogénica y anabólica en animales. Es un metabolito asociado con varias especies del género <i>fusarium</i>
LACTONAS TÓXICAS	Se clasifican en patulina , ascladiol y ácido penicílico. Se encuentran generalmente en los frutos como las uvas, manzanas y peras y se han demostrado efectos carcinogénicos sobre algunos animales.

Fuente: Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Cole (1981)

1.3 PATULINA

Su estructura química se muestra en la figura 6.

Figura 6. Fórmula de la patulina



Fuente: Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Cole. (1981)

1.3.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

La patulina es una lactona tóxica también conocida como claviformita, clavitina, clavicina, expansiona, penicilina, micoína, leucopina, tercinina, 4-hidroxi-4H-furo(3,2-c)piran-2(6H)-ona. Su estructura fue determinada por Woodward y Singh en 1949. ^[12]

Su peso molecular es 154,0266g/mol y su fórmula molecular es $C_7H_6O_4$. Forma cristales incoloros con un punto de fusión de 111°C. La longitud de onda máxima absorción (λ_{max}) es 276nm, presenta una absortividad molar (ϵ) de 16.600 y bandas infrarrojas a 5.6, 6.0 y 6.1 μ m. Es soluble en agua, alcoholes, acetona, acetato de etilo y cloroformo. Débilmente soluble en éter etílico y benceno e insoluble en éter de petróleo. Es estable en medio ácido y poco estable en solventes polares como el agua y metanol. En medio alcalino pierde su actividad biológica ya que se hidroliza, y en presencia de SO_2 y en condiciones de fermentación se reduce. Al ser un alcohol secundario reduce la solución de Fehling y decolora el permanganato de potasio.

[13]

¹² Woodward, RB; Singh, G. (1949). *Journal of American Chemistry Society*, Vol 71, pp 758-759.

¹³ Idem 11.

1.3.2 ORGANISMOS QUE PRODUCEN PATULINA Y FACTORES QUE INTERVIENEN EN SU CRECIMIENTO

La patulina es producida por hongos de los géneros:

- Penicillium, tales como *patulum* (en cereales y nueces), *expansum* (en manzanas), *bainier*, *claviforme*, *equinum*, *novae-zeelandiae*, *lpidosum*, *granulatum*, *lanosum*, *melinii*, *cyclopium*, *cyaneo-fulvum* y *roqueforti*.
- Aspergillus, tales como *clavatus*, *giganteus* y *terreus*.
- Byssochlamys *nivea* y *fulva*

La producción de patulina es dependiente de la temperatura y de la proporción de CO₂ y oxígeno en el aire. Las condiciones óptimas de producción de patulina por *P. expansum* son: pH 6 y temperatura de 25°C en la pera y de 17°C en las manzanas. Sin embargo, la patulina se puede formar entre 0 y 25°C. La producción es inhibida cuando se somete al hongo a una atmósfera que contiene 3% de CO₂ y 2% de O₂ a 25°C. El *P. expansum* requiere una a_w mínima para germinar de 0.82 – 0.83 mientras que la a_w mínima para la producción de patulina es de 0.95 a 25°C.^[14]

¹⁴ Idem 7.

1.3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PATULINA

1.3.3.1 ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y EXCRECIÓN

La patulina marcada con C^{14} , administrada por vía oral en forma de una dosis simple de 3mg/kg de peso corporal a ratas Sprague-Dawley se elimina por lo general por las heces y orina en 24 horas. Después de siete días, queda retenido del 2 al 3 por ciento en los tejidos blandos (bazo, riñones, pulmón e hígado) así como en la sangre. El LD_{50} en los ratones es de 15 a 35mg/kg según la modalidad de administración. ^[15].

1.3.3.2 ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE PATULINA

1.3.3.2.1 ESTUDIOS IN VIVO

La patulina inhibió la acetilcolinesterasa y NaKATPasa en el hemisferio cerebral, cerebelo y médula en ratas tratadas por un mes con inyecciones intraperitoneales de 1.6mg diarios de patulina por kilogramo de peso corporal. ^[16]

Cuarenta y ocho horas después de una inyección intraperitoneal de 5.0 a 7.5mg de patulina por kilogramo de peso corporal en ratoncitos machos, la NaKATPasa y MgATPasa del hígado,

¹⁵ Codex Alimentarius Commission (2004). Joint FAO/WHO Food Standard programme. Codex Comité on Food additives and contaminants. Maximum level for patulin in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. Thirty-sixth session. Róterdam, The Netherlands.

¹⁶ Official Methods of Analysis. (2005). Patulin. WHO Food Additives Series 35. pp 21-24.

riñones y cerebro fueron inhibidas significativamente. La inyección de 2.5mg de patulina por kilogramo de peso corporal no tuvieron efectos significativos sobre la actividad enzimática.^[17]

1.3.3.2.2 ESTUDIOS IN VITRO

La patulina inhibió la actividad in vitro de la NaKATPasa en microsomas preparados desde cerebros de ratones. La actividad fue parcialmente restablecida por lavado.^[18]

La ribonucleasa H preparada desde el nucleótido del hígado de las ratas, fue inhibida por la patulina in vitro por 62% a una concentración de 0.32 μ mol/mol y por 47% a una concentración de 1.07 μ mol/mL.^[19]

1.3.3.2.3 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

En la tabla 3 podemos observar la dosis letal media de patulina obtenida para varias especies de ratas luego de que han sido sometidas a ciertas cantidades de patulina por diferentes rutas.

^{17,18,19} Idem 16.

Tabla 3. Toxicidad de patulina en diferentes especies de ratas.

Especie	Sexo	Ruta	LD₅₀ (mg/kg de peso corporal)
Ratón	M	Oral	29-48
	F	Oral	46.31
	M & F	Oral	17
	M	Intraperitoneal	5.7-8.17
	F	Intraperitoneal	10.85
	M & F	Intraperitoneal	7.6
	M & F	Intravenosa	8.57
	M	Subcutánea	10
Rata	M	Oral	30.53-55.0
	F	Oral	27.79
	M & F	Oral	108-118
	M	Intraperitoneal	4.59-100
Ratas neonatales	F	Oral	5.70
	M & F	Oral	6.80
Ratas destetadas	M & F	Intraperitoneal	5.9
	M	Intravenosa	8.57
	M	Subcutánea	11.0
Hámster	M	Oral	31.5
		Intraperitoneal	10
		Subcutánea	23

Fuente: AOAC (2005)

Se han realizado estudios que demuestran que si se aplica subcutáneamente dos veces por semana 0.2mg de patulina a ratas, producen tumores malignos en el lugar de la inyección. En

pavos presenta un LD₅₀ de 170mg/kg, en embriones de pollo antes de la incubación un LD₅₀ de 68.7mg/kg y en ratones presenta un LD₅₀ de 5mg/kg.^[20]

Si se suministran dosis sub letales no producen efectos carcinogénicos pero si hemorragias en el tracto digestivo en ratas y ratones. Pero en embriones de pollo, dosis sub letales presentan efectos carcinogénicos.^[21]

El complejo patulina – cisteína (15-150g) ha demostrado efectos teratogénicos para embriones de pollo.^[22]

1.3.4 EFECTOS SOBRE LA SALUD

1.3.4.1 SÍNTOMAS AGUDOS

Puede causar nauseas, vómito, hemorragia e inflamación intestinal, degeneración de las células del epitelio, agitación, convulsiones, edema, hiperemia e incluso problemas en el hígado, bazo, pulmones, riñones, cerebro y sistema nervioso en general.

1.3.4.2 SÍNTOMAS CRÓNICOS

Es genotóxica, neurotóxica, inmunotóxica, inmunosupresiva y mutagénica, y a nivel de ensayos de laboratorio se ha encontrado que la patulina es potencialmente carcinogénica para algunos animales.

^{20,21} Idem 16.

²² World Health Organization. (1995). 44th Report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technology Report Series, 859 Geneva, Switzerland.

A nivel celular, se ha demostrado que la patulina tiene efectos que incluyen la inhibición de la síntesis de proteínas, inhibición del transporte de aminoácidos dependientes de sodio, inhibe la síntesis de ADN, ATPasas dependientes de sodio y potasio y ARN polimerasas.

1.3.5 PRODUCCIÓN DE PATULINA EN ALIMENTOS

La patulina producida por los hongos anteriormente mencionados se encuentra generalmente en las frutas dañadas. Se han investigado un gran número de frutas como manzanas, peras, bananas, piñas, uvas y duraznos que contenían un recubrimiento castaño como señal de pudrimiento y se ha encontrado que contenían patulina. Los ensayos también fueron positivos para jugos y compotas producidos a base de ellas.

1.3.6 INGESTA DIARIA DE PATULINA

En 1990 la JECFA estableció una ISTP de $7\mu\text{g}/\text{kg}$, basada en un NOEL de $0.1\text{mg}/\text{kg}$ para cada día de un estudio de toxicidad/carcinogenicidad a largo plazo efectuado en ratas; pero dado a que la patulina no se acumula en el cuerpo y debido al patrón de consumo de los productos que la contienen, se reevaluaron los límites y la ISTP se cambió a la IDMTP basada en un NOEL de $43\mu\text{g}/\text{kg}$ para cada día y un factor de seguridad de 100, estableciendo un valor de $0.4\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. ^[23]

²³ Tercera Conferencia Internacional Mixta entre la FAO, OMS, PNUMA sobre Micotoxinas. (1999). Análisis de riesgo de las micotoxinas por el comité mixto de expertos FAO/OMS sobre Aditivos alimentarios (JECFA). Túnez

1.3.7 LEGISLACIÓN DE PATULINA VIGENTE

Desde 1995 alrededor de 48 países han regulado la patulina especialmente en productos de frutas como los jugos de manzana, lo que le convierte a esta toxina en una de las micotoxinas más reguladas a nivel mundial. El Codex Alimentarius establece un nivel máximo permisible de 50µ/kg para alimentos a base de manzanas destinado a consumo humano. Algunos países estipulan un contenido máximo de 20µg/kg en alimentos para bebés y 30µg/kg en alimentos para niños debido a su peso corporal.^[24] En la tabla 4 podemos observar los niveles máximos admitidos de patulina en alimentación humana.

Tabla 4. Niveles máximos admitidos de patulina en alimentación humana

Productos	Patulina (µg/kg o ppb)
• Zumos de frutas, en particular zumo de manzana, e ingredientes de zumos de frutas en otras bebidas, incluido el néctar de frutas.	50,0
• Zumo de frutas concentrado una vez reconstituido según las instrucciones del fabricante.	50,0
• Bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas elaboradas con manzanas o que contengan zumo de manzana.	50,0
• Productos sólidos elaborados con manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados al consumo directo.	25,0
• Zumos de manzana y productos sólidos elaborados a base de manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados a los lactantes y niños de corta edad y vendidos y etiquetados como tales.	10,0
• Alimentos infantiles distintos de los elaborados a base de cereales.	10

Fuente: Codex Alimentarius (2009)

²⁴ Idem 2, 3, 4.

1.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE PATULINA

1.4.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA

Existen varios métodos de extracción de patulina en manzanas, jugos y néctares de manzana, a continuación detallamos algunos de ellos:

- **Extracción en fase sólida.-** En esta técnica se pasa la muestra por un cartucho que contiene fase sólida comercial (C_8 ó C_{18}) y una vez que la patulina ha sido retenida en el cartucho se eluye de la fase sólida con diferentes solventes orgánicos como acetonitrilo, hexano ó acetato de etilo, lo cual permite la extracción de la patulina desde pequeñas cantidades de muestras. Requiere un paso previo de pre acondicionamiento del cartucho. Es una técnica rápida pero relativamente costosa.
- **Micro extracción en fase sólida.-** Se basa en la absorción de la patulina sobre una fase absorbente situada en el extremo de una micro jeringa modificada, las cuales se desorben posteriormente en el inyector de un cromatógrafo de gases. La extracción se puede realizar por inmersión directa de la fibra en la muestra líquida, o por la técnica de espacio - cabeza. La principal ventaja de esta técnica es que se elimina la utilización de solventes pero se requieren tiempos largos de exposición y se deben estudiar los efectos de cada matriz.
- **Extracción con columnas de inmunoafinidad.-** Es fácil de usar y posee alta selectividad frente a otras técnicas de extracción, sin embargo los costos de análisis son elevados. El procedimiento consiste en pasar la muestra líquida por las columnas de inmunoafinidad en

donde la patulina se une a los anticuerpos monoclonales fijados en la columna de inmunoafinidad y mediante un líquido de lavado podrán eliminarse los restos del extracto, finalmente se eluye la patulina con solventes orgánicos.

- **Extracción líquido – líquido.-** Se basa en la distribución de una muestra líquida sobre un solvente. Es la operación básica más importante en la separación de mezclas homogéneas líquidas. Consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble, o parcialmente insoluble, en el primero. La transferencia de materia se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas. Es una técnica fácil de usar pero utiliza cantidades de solvente mayores a las requeridas por las técnicas descritas anteriormente.
- **Inmuno ensayos para exploración.-** En la actualidad existen kits que utilizan la tecnología de inmunoafinidad para una detección rápida de la sustancia a ser analizada. La facilidad de uso y de interpretación de resultados se debe a que los test contienen anticuerpos específicamente creados para capturar la micotoxina en cuestión, estos kits proveen una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo los costos son altos.

La revista “Food Chemical Contaminants” publicada por la AOAC, mostró un estudio comparativo entre 4 métodos de extracción y purificación para el análisis de patulina en manzanas y jugos de manzana que fueron evaluados posteriormente por HPLC con detección UV bajo las mismas condiciones isocráticas, en el cual las muestras fueron contaminadas con patulina a niveles de 10, 20, 50, 100 y 150ng/mL y extraídas por un método de extracción

líquido - líquido y 3 métodos de extracción en fase sólida. Los métodos fueron validados por recuperación, linealidad y precisión a altas y bajas concentraciones. Como resultado obtuvieron que para las cuatro técnicas de extracción, todas las recuperaciones fueron sobre el 70% para todos los niveles antes mencionados y no se observaron tardías elusiones de picos, todas las corridas cromatográficas están alrededor de 20 minutos. Como ventajas de las técnicas de extracción en fase sólida se observó que existe un ahorro de costos debido al bajo volumen de solvente utilizado en la extracción y corto tiempo de análisis al igual que mejores recuperaciones a bajos niveles de contaminación y muy buenas linealidades. Sin embargo, la extracción líquido – líquido presenta mejor precisión analítica.^[25]

1.4.2 TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y DE CUANTIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA.

En la determinación de patulina en manzanas y productos derivados, el agente interfieran más común es el 5-hidroximetilfurfural (HMF), el cual debe ser considerado en las metodologías analíticas que se utilizan a diario ya que por lo general los niveles de HMF son dos o tres veces superiores a los niveles de patulina normalmente detectados. El HMF es el producto de la deshidratación de Ceto-pentosas en pH bajo o altas temperaturas que pueden ocurrir durante la elaboración o almacenamiento de alimentos.

Existen varias técnicas instrumentales de confirmación para el análisis de patulina las cuales se detallan a continuación:

²⁵ Journal of AOAC International. (2007). Food Chemicals Contaminants. Determination of Patulin in Apple Juice: Comparative evaluation of four analytical methods. Vol. 90. N°1. South Africa.

- **Electroforesis capilar.**- Es una técnica de separación moderna que consiste en la introducción de tensoactivos como sodio dodecil sulfato a una solución acuosa, en donde las micelas formadas en la solución constituyen la fase pseudo estacionaria. El sistema de separación con electroforesis capilar es similar a una columna de partición de cromatografía líquida, excepto por la fase estacionaria que está moviéndose a una velocidad más lenta que la fase móvil. El mecanismo de separación depende de la diferencia de coeficientes de distribución de los analitos entre la fase acuosa y fase de pseudo estacionaria. La ventaja que presenta en relación con la cromatografía líquida es que se puede cambiar la composición de la fase estacionaria cambiando la composición de las micelas del buffer. Otra ventaja es que requiere pequeños volúmenes de muestra, en el orden de 0,1 a 10nL.

Tsao & Zhou (2000) probaron el análisis del contenido de patulina en manzanas mediante electroforesis capilar para la detección y cuantificación de esta toxina. Este método demostró que era eficiente y económicamente factible utilizando una pequeña cantidad de muestra y con un límite de detección de 3,8mg/L. Sin embargo, no se realizó la separación e identificación de pico de interferencia de HMF. Silva (2007) desarrolló un método rápido para determinación simultánea de HMF y patulina por electroforesis capilar empleando sodio dodecil sulfato como tensioactivos aniónicos. Los límites de detección de HMF y patulina fueron 30µg/L y 9µg/L, respectivamente. Este método fue aplicado con éxito a la determinación simultánea de los analitos en muestras de jugo de manzana. ^[26]

²⁶ Revista Brasileira de Fruticultura. (2007). Patulin in food: State of the art and analytical trends, Vol. 29 N°2, Brasil, pp. 406-413

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil que fluye permanente durante el análisis, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria. Dependiendo de la relación carga / tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros.

- **Cromatografía en capa fina.-** La Cromatografía en capa fina (TLC) fue el primer método usado para la determinación de patulina en jugo de manzana. Este método involucra la extracción con acetato de etilo y purificación en una placa que contiene silica gel. La detección es observada por revelación con hidrazona de metil-2-benzothiazolinona (MBTH), lográndose obtener límites de detección de 20µg/L. También se reportaron dos métodos alternativos para la cuantificación de patulina. Leming (1993) utiliza la metodología de densitometría para cuantificar la intensidad de los puntos de patulina extraído de una matriz de maíz. Durakovic (1993) utilizó fluorodensitometría después de la formación de fluorescentes derivados obtenidos por la exposición de los puntos de cromatografía de patulina a vapor de amoníaco.^[27]
- **Cromatografía de gases.-** Esta técnica es utilizada para el análisis de alrededor del 60% de las micotoxinas, el detector más sensible es el de captura de electrones y generalmente se utiliza la técnica acoplada a un espectrómetro de masas. La ventaja es que se requiere cantidades pequeñas de muestra y los límites de detección y cuantificación son mucho menores.

²⁷ Idem 26.

- **Cromatografía líquida.**- Debido a la polaridad de la molécula de patulina y su característica de absorción de luz ultravioleta, métodos analíticos basados en cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa conectado a un detector ultravioleta son muy utilizados. Estos métodos han ofrecido buenos resultados para la separación y la cuantificación de patulina y HMF simultáneamente con un detector ultravioleta a una longitud de onda de 280nm. Espectrometría de masas y arreglo de diodos también han sido utilizados como complemento para la detección UV. La patulina es una molécula de bajo peso molecular y alta polaridad, y puede ser removida de las columnas de fase reversa usando una fase móvil con alto porcentaje de agua. Las fases móviles que se utilizan en la mayoría de los análisis son mezclas de acetonitrilo y agua en proporciones diferentes, mezclas de agua-etanol y ácido acético, agua-metanol también son consideradas. Se trabaja en condiciones isocráticas.^[28]

La confirmación de patulina puede realizarse por espectrometría de masas después de la separación y la identificación por cromatografía líquida o cromatografía gaseosa. El método de espectrometría de masas proporciona información sobre la estructura molecular y masa de compuestos químicos. Este método tiene una alta sensibilidad y la posibilidad de detectar compuestos en concentraciones extremadamente bajas.

Recientemente se han aplicado métodos de biología molecular en el estudio de patulina. El uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) ha atraído considerable atención de los investigadores. Este método permite la detección de la presencia del gen IDH (isoeoxydon deshidrogenasa) en el hongo que produce probablemente patulina. La detección de este gen, presente en la vía que conduce a la biosíntesis de patulina, tiene la ventaja para confirmar los

²⁸ Idem 26.

resultados de las metodologías tradicionales y podría convertirse en una nueva estrategia para la identificación de las especies que producen este metabolito tóxico. Esta técnica ofrece nuevas posibilidades para estudiar la influencia de los parámetros ambientales como actividad de sustrato, pH, temperatura y actividad de agua de los genes de la biosíntesis de la micotoxina y por tanto en la biosíntesis de micotoxinas. [29]

En la tabla 5 se muestran los criterios exigibles a los métodos de análisis fijados por Directivas de la Comunidad Europea, en donde, debido a la complejidad de los métodos analíticos e inestabilidad de las micotoxinas, se aceptan niveles de recuperación entre 50 y 120%, porcentajes de repetibilidad entre el 15 y 40% y porcentajes de reproducibilidad entre 30 y 60%. Esta tabla se utilizará para comprobar la eficiencia del método analítico seleccionado.

Tabla 5. Criterios exigibles a los métodos de análisis de ocratoxina A, patulina y toxinas de *Fusarium*.

Contenido (µg/kg)	RSD _r %	RSD _R %	Recuperación %
Ocratoxina A			
<1	40	60	50 a 120
1-10	20	30	70 a 110
Patulina			
<20	30	40	50 a 120
20-50	20	30	70 a 105
<50	15	25	75 a 105
Deoxinivalenol			
>100-500	20	40	60 a 110
>500	20	40	70 a 120
Zearalenona			
50	40	50	60 a 120
>50	25	40	70 a 120
Fumonisinina B ₁ +B ₂			
500	30	60	60 a 120
>500	20	30	70 a 110
Toxina T-2			
50-250	40	60	60 a 130
>250	30	50	60 a 130
Toxina HT-2			
100-200	40	60	60 a 130
>200	30	50	60 a 130

Fuente: Codex Alimentarius (2009)

²⁹ Idem 26.

1.5 LA MANZANA

La manzana es susceptible a la producción de patulina debido a que contiene azúcares como fructosa y en menor proporción glucosa y sacarosa, constituyentes principales de la fuente de carbono necesaria para el desarrollo del hongo, así como ácido málico importante para el aumento y estabilidad química de la patulina. La patulina se puede desarrollar en distintas variedades de manzana siempre y cuando encuentre la temperatura y tenga una a_w adecuada.

1.5.1 PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE MANZANA EN ECUADOR

Actualmente en el Ecuador existen aproximadamente 54.364 árboles de manzana que generan una producción de alrededor 4814 toneladas métricas de manzanas frescas entre noviembre y junio de cada año y se venden 3850 toneladas métricas de esta producción; durante los meses de julio a octubre las manzanas que consumimos en el país son mayormente de origen chileno, haciendo de esta fruta un alimento disponible durante todo el año y grandemente demandado en el Ecuador. ^[30]

Existen cientos de variedades de manzana en todo el mundo, sin embargo, la gama que nos ofrece el mercado es limitada ya que tan solo podemos elegir entre un poco más de media docena de variedades. En la tabla 6 se detallan las variedades de manzana más comunes junto con los meses del año en los que es más frecuente su producción.

³⁰ Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2007). III Censo Nacional Agropecuario. Cultivos permanentes y transitorios. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Ecuador

Tabla 6. Variedades que se cultivan en las zonas altas del Ecuador y la época de cosecha

VARIEDAD	ÉPOCA DE COSECHA
Gravenstein	Diciembre – enero
Emilia	Febrero – abril
Gala	Marzo – abril
Royal Gala	Marzo – abril
Rome Beauty	Febrero – marzo
Winter. Banana	Enero – febrero
Jona Gold	Abril - mayo
Gold Delicious	Abril - mayo
Belgolden	Abril - mayo
Granny Smith	Mayo - junio

Fuente: INIAP. (1992)

Debido a que las necesidades del mercado no satisfacen la demanda local, es necesario recurrir a las importaciones provenientes mayoritariamente de Chile y Estados Unidos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 ÁREA DE ESTUDIO

La toma de muestras para la determinación de patulina en manzanas frescas se realizó en 10 puntos del Distrito Metropolitano de Quito:

- 4 cadenas de supermercados: Supermaxi, Mi Comisaritao, Santa María, AKI y;
- 6 mercados populares: Mercado de La Ofelia y Mercado de Iñaquito en el norte de la ciudad, Mercado Santa Clara y Mercado de San Roque en el centro de la ciudad, Mercado del Camal y Mercado Mayorista en el sur de la ciudad.

La toma de muestras para la determinación de patulina en jugos y néctares de manzana se realizó únicamente en las 4 cadenas de supermercados antes mencionadas.

De esta manera se trató de cubrir la mayor parte de los centros de acopio donde se abastece la población quiteña.

2.2 MUESTREO

Debido a la heterogeneidad de distribución de las toxinas en los alimentos, organismos internacionales han descrito procedimientos generales para la toma de muestras de alimentos para la posterior determinación de toxinas naturales; es por ello que el muestreo para el presente trabajo se realizó conforme a la “Directiva 2003/78/Comunidad Europea de la Comisión de 11 de agosto de 2003, por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios”, en la cual se indica que se deben “tomar mínimo 5 muestras elementales para un lote que pesa de 50

a 500kg; y, aproximadamente 5% (al menos 2 envases o unidades) de un lote que contenga de 26 a 100 unidades en total". (Ver Anexo 5).

Es decir, se debe tomar alrededor de 1kg de cada variedad de manzanas frescas por punto de muestreo debido a que el tamaño del lote o punto en el que se toma la muestra está en el rango de 50 a 500kg, y al menos 2 envases de jugos y néctares de manzana por punto de muestreo debido a que el tamaño del lote o punto en el que se toma la muestra está en el rango de 26 a 100 unidades.

El procedimiento de toma de muestras de manzanas frescas se realizó aleatoriamente. Se adquirieron alrededor de 1kg de manzanas frescas por punto de muestreo (1kg por cada variedad y punto de muestreo) y al final de cada día se homogeneizaron las variedades de las muestras tomadas en los 10 puntos de muestreo obteniéndose una muestra total 4 muestras de 10kg cada una. Cada muestra fue etiquetada, conservada en refrigeración y luego trasladada al laboratorio. Este procedimiento se repitió quincenalmente por un periodo de 5 meses consecutivos dando un total de 40 muestras. Un resumen de la toma de muestras de manzanas frescas se detalla en la tabla 7.

Las variedades de manzanas fueron reconocidas visualmente y la codificación utilizada se detalla a continuación y es en base a las iniciales de las manzanas:

Manzana Granny Smith: Manzana verde (MGS)

Manzana Emilia: Manzana amarillo rojiza (ME)

Manzana Gala: Manzana roja (MG)

Manzana Gold Delicious: Manzana amarilla (MGD)

Tabla 7. Resumen de la toma de muestras de manzanas frescas.

Lugar de Muestreo	Variedades de manzana			
	MGS	ME	MG	MGD
Supermaxi	1kg	1kg	1kg	1kg
Supermercado Mi Comisaritao	1kg	1kg	1kg	1kg
Supermercado Santa María	1kg	1kg	1kg	1kg
Supermercado AKI	1kg	1kg	1kg	1kg
Mercado de La Ofelia	1kg	1kg	1kg	1kg
Mercado de Ñaquito	1kg	1kg	1kg	1kg
Mercado Santa Clara	1kg	1kg	1kg	1kg
Mercado de San Roque	1kg	1kg	1kg	1kg
Mercado del Camal	1kg	1kg	1kg	1kg
Mercado Mayorista	1kg	1kg	1kg	1kg
Total de kg por variedad	10kg	10kg	10kg	10kg
Número de muestras obtenidas debido a homogeneización por quincena de muestreo	1	1	1	1
Número de muestras totales del estudio (1 toma de muestra quincenal * 5 meses)	10	10	10	10
Suma de muestras totales	40			

El procedimiento de toma de muestras de jugos y néctares de manzana se realizó aleatoriamente. Se adquirieron 3 unidades de 16 marcas diferentes de jugos y néctares de manzana que incluyen productos nacionales e importados de diferentes lotes por punto de muestreo. Al final de cada día se homogeneizaron las marcas de jugos y néctares de manzana obteniéndose 16 muestras en total. Cada muestra fue etiquetada y luego trasladada al laboratorio. Este procedimiento se repitió quincenalmente por un periodo de 5 meses consecutivos dando un total de 160 muestras. Un resumen de la toma de muestras de jugos y néctares de manzana se detalla en la tabla 8.

El número 3 corresponde a las unidades adquiridas. La codificación utilizada para los jugos y néctares inicia en PA para la primera marca comercial y continúa sucesivamente hasta PP que corresponde a la marca comercial N° 16. La primera letra de la codificación corresponde a la inicial de producto (P) y la segunda letra de la codificación corresponde a las diferentes marcas. Es decir, PA significa producto de la marca A. Las codificaciones que se encuentran subrayadas corresponden a manzanas ó jugos / néctares de manzana de origen nacional.

Se consideró una toma de muestra quincenal debido a la rotación de los productos en los supermercados y un estudio por el periodo de 5 meses debido a que se consideró un tiempo prudencial para obtener datos amplios y representativos de las muestras.

Tabla 8. Resumen de la toma de muestras de jugos y néctares de manzana.

Lugar de Muestreo	Variedades de manzana															
	<u>PA</u>	<u>PB</u>	<u>PC</u>	<u>PD</u>	<u>PE</u>	<u>PF</u>	<u>PG</u>	<u>PH</u>	PI	PJ	PK	PL	PM	PN	PO	PP
Supermaxi	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mi Comisaritao	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Supermercado Santa María	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Supermercado AKI	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Total de unidades por marca	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Número de muestras obtenidas debido a homogeneización por quincena de muestreo	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Número de muestras totales del estudio (1 toma de muestra quincenal * 5 meses)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Suma de muestras totales	160															

2.3 MÉTODO ANALÍTICO SELECCIONADO

Se decidió utilizar el método de extracción líquido - líquido debido a que es un método aprobado por la Unión Europea para este tipo de determinación y existe disponibilidad de materiales y reactivos. No se requiere de cartuchos de extracción lo que disminuye los costos de análisis y se obtienen buenos porcentajes de recuperación y repetibilidad.

Se decidió utilizar la técnica de cromatografía líquida debido a que la patulina es retenida en columnas de fase reversa por su peso molecular bajo y se la puede remover usando una fase móvil altamente acuosa (al menos 90%) con una combinación de acetonitrilo. Se utilizó un detector de arreglo de diodos debido a la fuerte característica de absorción de luz ultravioleta que tiene la molécula de patulina por la presencia de grupos cromóforos, además con este tipo de detector eliminamos la interferencia del 5 hidroximetilfurfural.

Para la realización del trabajo se utilizó el método estándar. AOAC 995.10 Patulin in Apple Juice. Liquid Chromatographic Method. Chapter 49 (Natural Toxins). Section 49.7.02, año 2005.

Se realizaron pruebas para comprobar la eficiencia del método tales como:

- Determinación del límite de detección y cuantificación. (Ver punto 3.1.1)
- Establecimiento del rango lineal en la curva de calibración. (Ver punto 3.1.2)
- Recuperación en 2 niveles de concentración. (Ver punto 3.1.3)

2.3.1 RESUMEN DEL MÉTODO ANALÍTICO SELECCIONADO

La patulina fue extraída con acetato de etilo. El extracto de la muestra fue limpiado por partición a través de una extracción líquido - líquido con una solución de carbonato de sodio y luego es secado con sulfato de sodio anhidro. Luego de la evaporación del etil acetato y la reconstitución con la fase móvil, la patulina fue cuantificada por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa con un detector de arreglo de diodos a una longitud de 276nm.

2.3.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

2.3.2.1 MATERIALES

- Pipetas pasteur
- Tubos de vidrio de 20 x 150mm y 16 x 150mm con sus respectivas tapas de teflón
- Tubos de fondo cónico de vidrio o polietileno para centrifuga de 25mL
- Pipetas volumétricas de 2, 5 y 10mL
- Balones volumétricos de 5, 10 y 100mL
- Balones corazón de 50mL
- Embudos de separación de 50mL
- Micro jeringa en el rango de 5 – 500 μ L
- Micro pipeta en el rango de 100 – 1000 μ L
- Columna ODS Hypersil, 250 mm x 4.6 mm, 3 μ m

2.3.2.2 REACTIVOS

- Estándar de patulina marca sigma N° P-1639 \geq 98% (TLC)
- Acetato de Etilo grado HPLC
- Carbonato de Sodio
- Agua destilada
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido acético

2.3.2.3 EQUIPOS

- Vortex
- Baño de agua
- Rotavapor
- Cromatógrafo Líquido Waters Alliance 2695
- Detector de arreglo de diodos Waters 2996

2.3.2.4 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Columna: ODH Hypersil 3 μ m 250 mm x 4.6 mm

Fase móvil: agua / acetonitrilo (9:1)

Flujo: 1mL /min

Volumen de inyección: 50 μ L

Detección: UV 276nm

2.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de manzana fresca se lavaron y picaron en finos trozos, posteriormente se licuaron hasta obtener una pasta homogénea. Se tomaron 15g de la masa y se diluyeron a 100mL con agua destilada, se centrifugó por 6 ocasiones y se obtuvo el extracto para el análisis.

Los jugos y néctares de manzana se homogeneizaron con agitación

2.3.4 PROCEDIMIENTO

- Transferir 5mL del jugo/néctar homogeneizado, y/o 5mL de la dilución de manzana a un tubo cónico y extraer la patulina con 10mL de acetato de etilo.
- Repetir la extracción con otra porción de 10mL de acetato de etilo y recoger las dos fases orgánicas en un embudo de separación
- Adicionar 2mL de solución de carbonato de sodio al 1.5%, agitar por un minuto, permitir que las fases se separen y transferir la capa de acetato de etilo a un tubo de ensayo
- Extraer la toxina que pudo haber quedado en el carbonato de sodio con 5mL de acetato de etilo y agregar al tubo de ensayo
- Adicionar 1g de sulfato de sodio anhidro, tapar el tubo, agitar vigorosamente por 30 segundos y permitir que el sólido se decante.
- Transferir el líquido a un balón en forma de pera y evaporar en un baño maría a 40° con corriente de nitrógeno hasta obtener 1-2mL.
- Transferir cuantitativamente a un balón de 5mL y evaporar a sequedad con una corriente de nitrógeno en un baño a 40°C.

- Inmediatamente reconstituir el residuo con 500 μ L de la solución de ácido acético a pH4. Inyectar 50 μ L en el HPLC.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 COMPROBACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL MÉTODO

Todo procedimiento analítico debe ser probado en el laboratorio donde se va a realizar un estudio con el fin de medir la eficiencia o grado de recuperación del analito en cuestión en los procesos de extracción, limpieza e instrumentación. Para comprobar la eficiencia de este método se realizaron pruebas para determinar los límites de detección y cuantificación del método, análisis de regresión para determinar la curva de calibración a un 95% de confianza y ensayos de recuperación a dos niveles.

3.1.1 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

Se determinaron los límites de detección y cuantificación del método analíticamente mediante la preparación de una curva de calibración en el rango de $0,006\mu\text{g/mL}$ hasta $1,287\mu\text{g/mL}$. Se inyectaron las muestras por triplicado y se obtuvo que el límite de detección del método es $0,006\mu\text{g/mL}$ y el límite de cuantificación es $0,013\mu\text{g/mL}$ que corresponde a $1,29\mu\text{g/L}$ para muestras líquidas y $8,58\mu\text{g/kg}$ para muestras sólidas, la diferencia entre los dos límites radica principalmente en la porción de muestra tomada para realizar el análisis, en el caso de muestras líquidas se toman 5mL de muestra y en el caso de muestras sólidas se toman 15g de la muestra y se diluyen a 100mL, luego se toman 5mL de esta dilución.

Adicionalmente se inyectaron cantidades inferiores a $0,006\mu\text{g/mL}$ de patulina ($0,005\mu\text{g/mL}$, $0,004\mu\text{g/mL}$ y $0,003\mu\text{g/mL}$), pero no se obtuvo señal por lo que se considera como límite de

- Inmediatamente reconstituir el residuo con 500 μ L de la solución de ácido acético a pH4. Inyectar 50 μ L en el HPLC.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 COMPROBACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL MÉTODO

Todo procedimiento analítico debe ser probado en el laboratorio donde se va a realizar un estudio con el fin de medir la eficiencia o grado de recuperación del analito en cuestión en los procesos de extracción, limpieza e instrumentación. Para comprobar la eficiencia de este método se realizaron pruebas para determinar los límites de detección y cuantificación del método, análisis de regresión para determinar la curva de calibración a un 95% de confianza y ensayos de recuperación a dos niveles.

3.1.1 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

Se determinaron los límites de detección y cuantificación del método analíticamente mediante la preparación de una curva de calibración en el rango de $0,006\mu\text{g/mL}$ hasta $1,287\mu\text{g/mL}$. Se inyectaron las muestras por triplicado y se obtuvo que el límite de detección del método es $0,006\mu\text{g/mL}$ y el límite de cuantificación es $0,013\mu\text{g/mL}$ que corresponde a $1.29\mu\text{g/L}$ para muestras líquidas y $8,58\mu\text{g/kg}$ para muestras sólidas, la diferencia entre los dos límites radica principalmente en la porción de muestra tomada para realizar el análisis, en el caso de muestras líquidas se toman 5mL de muestra y en el caso de muestras sólidas se toman 15g de la muestra y se diluyen a 100mL, luego se toman 5mL de esta dilución.

Adicionalmente se inyectaron cantidades inferiores a $0,006\mu\text{g/mL}$ de patulina ($0,005\mu\text{g/mL}$, $0,004\mu\text{g/mL}$ y $0,003\mu\text{g/mL}$), pero no se obtuvo señal por lo que se considera como límite de

detección del método la menor cantidad de patulina que pudo ser detectada por el equipo que fue de 0,006 μ g/mL.

Para comprobar los límites de detección y cuantificación del método se realizó el análisis del blanco, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 9, en donde se obtiene un promedio de señal de 141 unidades de absorbancia y aplicando la regla del promedio más 3 desviaciones estándar para la determinación del límite de detección del método obtenemos una señal de 175 unidades de absorbancia que corresponde a una concentración de 0,006 μ g/mL de patulina según los datos que se muestran en la tabla 10, para la determinación del límite de cuantificación del método se aplica la regla del promedio más 6 desviaciones estándar obteniéndose una señal de 208 unidades de absorbancia que corresponde a una concentración de 0,013 μ g/mL.

Tabla 9. Análisis de la señal del blanco para la determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Señal del blanco (Unidades de absorbancia)	
155	
122	
128	
134	
143	
148	
156	
144	
136	
146	
141	Promedio
11.1	Desviación estándar
175	Promedio + 3 σ
208	Promedio + 6 σ

Tabla 10. Datos de concentraciones y señales promedios obtenidos de la curva de calibración para la determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Estándar N°	Concentración µg/mL Patulina	Alturas de pico			
		1	2	3	Promedio
1	0,006	150	198	180	176
2	0,013	214	195	229	213
3	0,064	946	955	953	951
4	0,129	1919	1924	1942	1928
5	0,257	3753	3738	3701	3731
6	0,643	8829	8867	8887	8861
7	1,287	18450	18435	18469	18451

3.1.2 ESTABLECIMIENTO DEL RANGO LINEAL DE CURVA DE CALIBRACIÓN

Para establecer el rango lineal de la curva de calibración a un 95% de confianza se realizó un análisis de regresión. Analíticamente se preparó una curva de calibración en el rango de 0,013µg/mL a 1,287mL, cuyos valores se observan en la tabla 11, cada solución se inyectó por triplicado y se observó que el rango era lineal con un coeficiente de correlación de 0,99996. (Ver Tabla 12)

Para que los parámetros comprobados anteriormente sean aplicables a los diferentes grupos analíticos, se realizó un análisis de calibración de la curva de calibración mediante la herramienta estadística Q-Stat cuyos cálculos se detallan en el anexo 6 obteniéndose los siguientes resultados:

- El coeficiente de correlación de la curva es 0.99996.
- El modelo o ecuación de la recta es $Y = -3.5 + 19872.1X$
- El rango de la pendiente con un nivel de confianza del 95% está entre 19782.6 y 19961.7
- El rango del intercepto con un nivel de confianza del 95% está entre -53.2 y 46.2.

Tabla 11. Datos de la curva de calibración para la determinación del rango lineal.

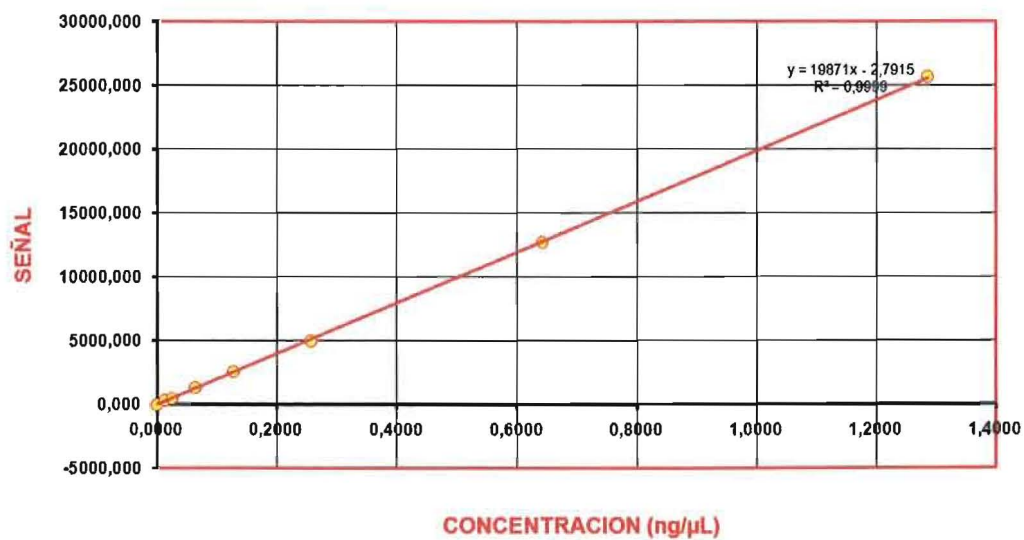
Estándar N°	Concentración µg/mL Patulina	Alturas de picos			
		1	2	3	Prom.
1	0,013	339	323	313	325
2	0,026	510	489	507	502
3	0,064	1314	1333	1348	1332
4	0,129	2615	2592	2598	2602
5	0,257	4956	4956	4956	4956
6	0,643	12718	12716	12681	12705
7	1,287	25604	25657	25631	25631

Tabla 12. Calculo de regresión lineal utilizando la curva de calibración en el rango de 0,0129µg/mL a 1,2869µg/mL y su respectiva gráfica.

CALCULO DE REGRESIONES LINEALES	
CONCENTRACIÓN (X) µg/mL	PROMEDIO SEÑAL (Y)
0,000	0
0,013	325
0,026	502
0,064	1332
0,129	2602
0,257	4956
0,643	12705
1,287	25631

RESUMEN ESTADISTICO	
PENDIENTE	19871,2861
INTERCEPTO	-2,7915
r	0,99996
n	8

CURVA DE CALIBRACION PATULINA



3.1.3 ENSAYOS DE RECUPERACIÓN

Se realizaron ensayos de recuperación sobre néctares de manzana en dos niveles: a) uno a un nivel de concentración de 0,026µg/mL de patulina, para lo cual se añadieron 100µL de una solución de 1,287µg/mL de patulina a 5mL de néctar y, b) otro a un nivel de concentración de 0.900µg/mL de patulina, para lo cual se añadieron 350µL de una solución de 1,287µg/mL de patulina a 5mL de néctar, obteniéndose los siguientes resultados:

- a) Porcentaje de recuperación del 75%, con un valor medio de 0.0194µg/mL y una desviación estándar de 0.003.

Recuperación de 0,026 µg/mL

Concentración (µg/mL)
0,018
0,019
0,019
0,018
0,025
0,017

Media: 0,019

SDr: 0,003

% Rec: 75

- b) Porcentaje de recuperación del 88%, con un valor medio de 0.793µg/mL y una desviación estándar de 0.002.

Recuperación de 0,9008 µg/mL

Concentración (µg/mL)
0,793
0,795
0,794
0,794
0,791
0,789

Media: 0,793

SDr: 0,002

% Rec: 88

Como resultado final de estos ensayos podemos decir que nuestro método cumple con los criterios exigibles a los métodos de análisis de patulina fijados por el Codex Alimentarius el cual menciona un rango de recuperaciones entre 50 y 120% para concentraciones menores a 20µg/kg que se mencionan en la tabla 5. Sin embargo, podemos decir que para mayores concentraciones, mayores son los límites de recuperación obtenidos.

3.2 OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS DATOS

Los análisis de laboratorio se ejecutaron quincenalmente luego de haber realizado la toma de muestras. Cada grupo de muestras se evaluaron con una curva de calibración que debió cumplir con los criterios de linealidad previamente establecidos. Para validar los resultados del grupo de muestras se analizaron dos muestras contaminadas con 0.9µg/mL de patulina obteniéndose recuperaciones de al menos 88%.

3.3 CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE PATULINA EN LAS MUESTRAS

Los cálculos para determinar la concentración de patulina en las muestras de jugos y néctares de manzana se realizaron a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de patulina en jugos y néctares expresada en } \mu\text{g/L (Cj)} = \frac{C_i \times V_1}{V_2} \times F, \quad (3.1)$$

Siendo:

C_i la concentración interpolada de patulina, obtenida a partir de la curva de calibración utilizando la ecuación de la recta, en µg/L.

V_1 el volumen final de reconstitución de la muestra, en litros.

V_2 el volumen inicial de la alícuota tomada para la extracción, en litros.

F el factor de dilución.

Los cálculos para determinar la concentración de patulina en las muestras de manzanas frescas se realizaron a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de patulina en manzanas frescas expresada en } \mu\text{g/kg (Cm)} = \frac{C_j \times V_3}{M_1}, \quad (3.2)$$

Siendo:

C_j la concentración de patulina, en $\mu\text{g/L}$, obtenida a partir de la ecuación 3.1

V_3 el volumen de aforo al cual se llevó la muestra pesada, en litros.

M_1 la masa de manzana fresca pesada para el análisis, en kilogramos.

Los datos obtenidos en las muestras de manzanas frescas y jugos y néctares de manzana se muestran en las tablas 13 y 14 cuyos valores están expresados en $\mu\text{g/L}$ para jugos y néctares de manzana y $\mu\text{g/kg}$ para manzanas frescas. El valor $<8,58\mu\text{g/kg}$ corresponde al límite de cuantificación para manzanas frescas y el valor $<1,29\mu\text{g/L}$ corresponde al límite de cuantificación para jugos y néctares de manzana. Los datos de la quincena 2 de las muestras de manzanas frescas corresponden al análisis de muestras visiblemente dañadas que presentan una concentración de patulina superior al límite máximo permitido por la legislación de $50\mu\text{g/Kg}$.

Tabla 13. Resultados obtenidos en manzanas frescas

Muestra	Quincena									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Datos expresados en $\mu\text{g/kg}$									
MGS	21,62	237,44	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	171,82	<8,58	<8,58	<8,58
ME	<8,58	138,56	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	10,27
MG	30,77	215,93	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58
MGD	<8,58	76,52	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58	<8,58

En la figura 7 se muestra un estudio comparativo de la concentración de patulina en $\mu\text{g}/\text{kg}$ con relación a la variedad de manzanas, en donde podemos observar que todas las variedades de manzana contienen patulina.

Figura 7. Gráfico de barras de los resultados del análisis de patulina que relaciona la concentración de patulina en $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs variedad de manzana

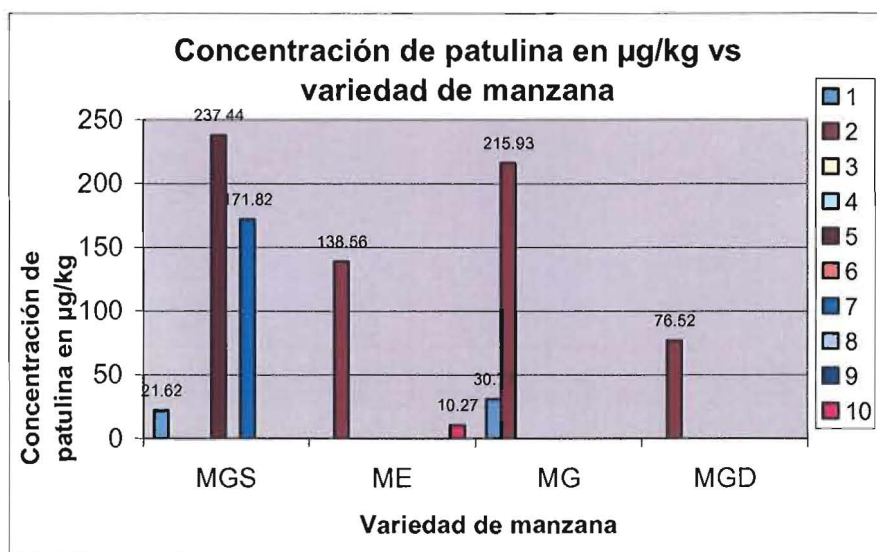


Tabla 14. Resultados obtenidos en jugos y néctares de manzana.

Muestra	Quincena									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Datos expresados en $\mu\text{g/L}$									
PA	3,40	23,17	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	3,93	4,40
PB	6,13	2,21	124,53	< 1,29	< 1,29	< 1,29	1,76	< 1,29	1,72	1,66
PC	1,39	9,51	< 1,29	< 1,29	4,67	6,58	3,66	6,51	2,38	2,40
PD	11,10	67,02	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	2,63	< 1,29	2,37	2,40
PE	14,18	6,51	< 1,29	< 1,29	< 1,29	3,44	2,61	6,17	3,50	3,66
PF	3,70	21,84	4,41	4,25	1,50	18,69	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29
PG	6,51	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	4,34	5,60	2,14	< 1,29
PH	5,28	2,96	< 1,29	< 1,29	4,99	6,37	3,76	6,58	< 1,29	< 1,29
PI	< 1,29	66,31	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	2,18	< 1,29	1,48	1,46
PJ	14,29	6,33	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	3,45	19,64	11,49	10,61
PK	7,38	27,24	17,42	< 1,29	2,88	4,56	14,16	10,99	< 1,29	< 1,29
PL	16,34	< 1,29	6,60	6,74	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	10,90	10,83
PM	< 1,29	7,38	< 1,29	3,94	< 1,29	< 1,29	15,27	< 1,29	21,51	21,01
PN	< 1,29	23,27	< 1,29	< 1,29	< 1,29	2,00	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29
PO	24,45	3,25	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29	< 1,29
PP	10,32	25,35	8,83	8,78	< 1,29	5,25	26,56	9,00	< 1,29	< 1,29

En la figura 8 se muestra un estudio comparativo de la concentración de patulina en $\mu\text{g/L}$ con relación a la marca de los jugos y néctares de manzanas y en la figura 9 un estudio comparativo entre la concentración de patulina en $\mu\text{g/L}$ con relación al periodo de muestreo, en donde podemos observar que todas las marcas de jugos y néctares de manzana contienen patulina, sin embargo la presencia de esta micotoxina no es constante a lo largo de las quincenas de muestreo, es decir, los lotes no son consistentes en relación a su contenido de patulina.

Figura 8. Gráfico de barras de los resultados del análisis de patulina que relaciona la concentración de patulina en $\mu\text{g/L}$ vs marcas de jugos y néctares de manzana

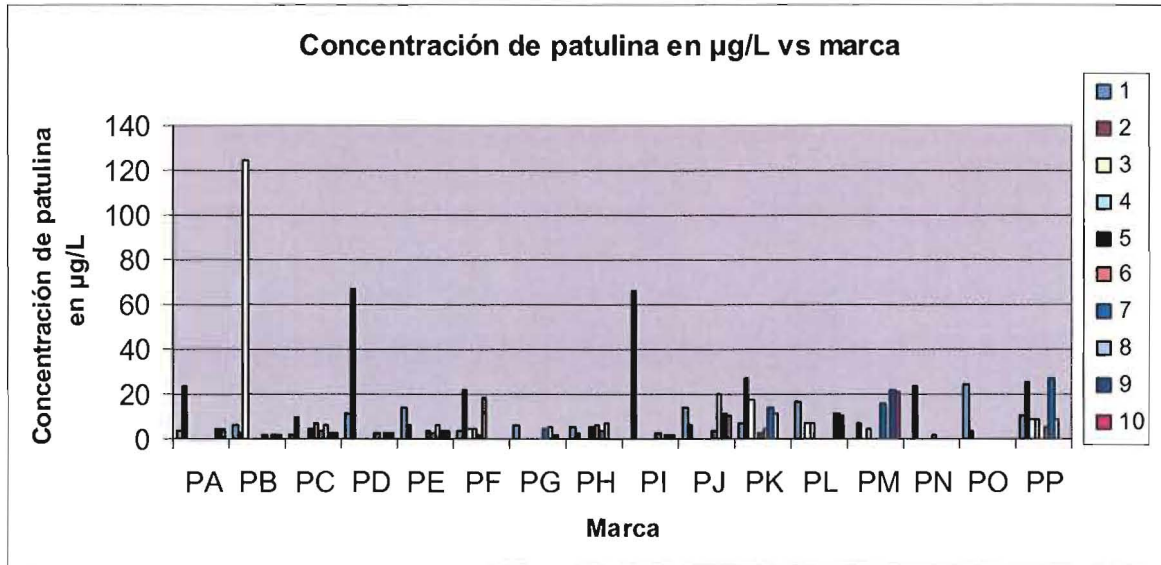
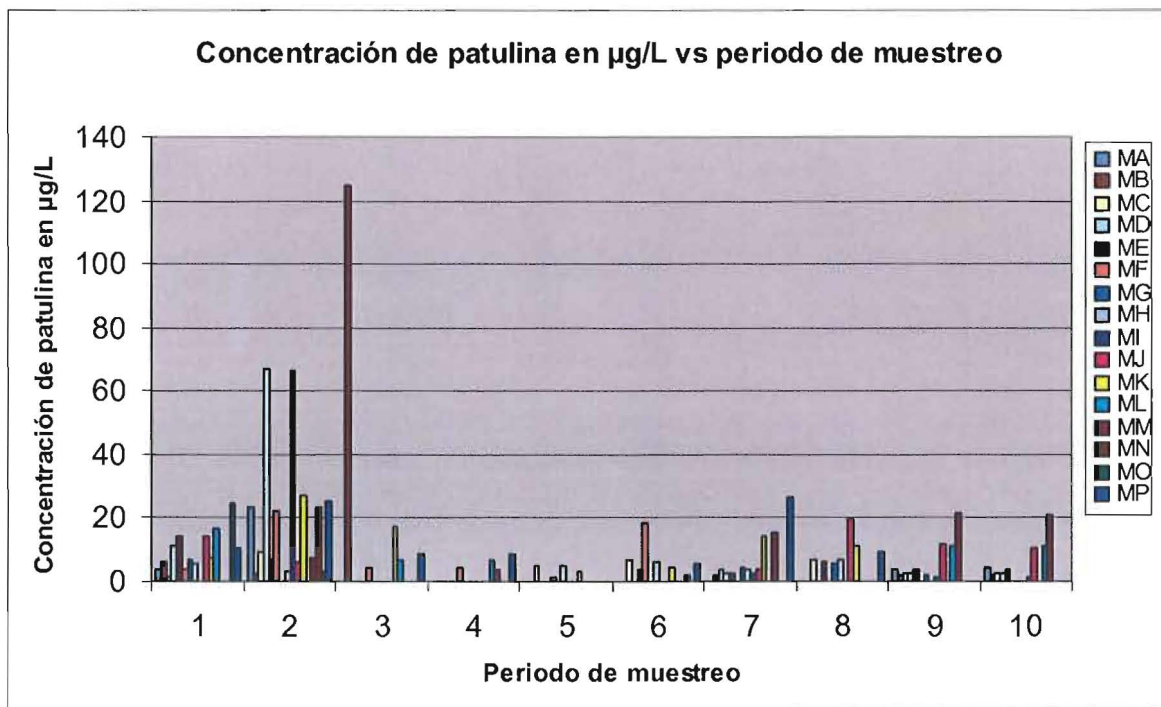


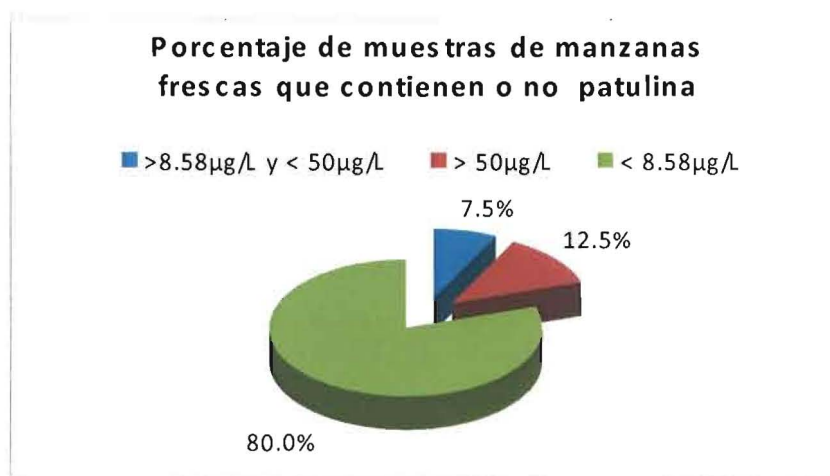
Figura 9. Gráfico de barras de los resultados del análisis de patulina que relaciona la concentración de patulina en $\mu\text{g/L}$ vs periodo de muestreo de jugos y néctares de manzana



Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos obtener un porcentaje respecto de cuántas muestras de manzanas frescas, jugos y néctares de manzana contienen patulina para poder compararlos con la legislación mundial vigente y determinar si se encuentran o no dentro de los parámetros máximos permisibles.

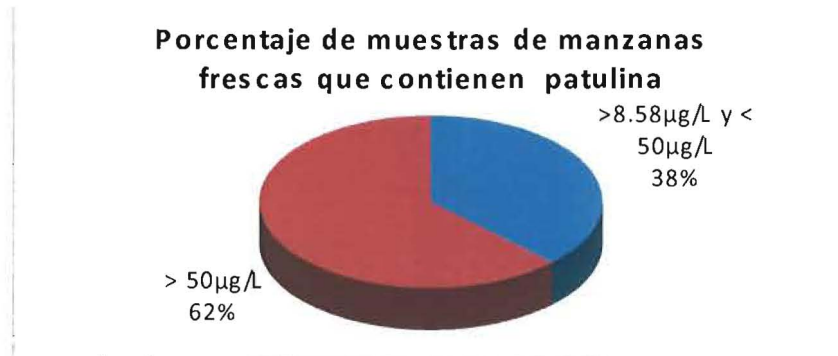
En la figura 10 podemos observar que el 80% de las muestras de manzana tienen contenidos de patulina bajo el límite de cuantificación del método, el 12.5% tienen contenidos que superan los límites máximos permitidos en la legislación vigente y el 7.5% presentan un contenido de patulina mayor al límite de cuantificación del método pero menor a los límites máximos permisibles.

Figura 10. Diagrama pastel del porcentaje de muestras de manzanas frescas que contienen o no patulina.



En la figura 11 podemos observar que el 38% de las muestras de manzana fresca contienen patulina dentro de los límites máximos permitidos por la legislación vigente. El 62% corresponde a muestras que contienen mayor a $50\mu\text{g/kg}$ de patulina, de los cuales el 37.5% corresponden al análisis de la parte visiblemente dañada de las muestras de manzana fresca.

Figura 11. Diagrama pastel del porcentaje de muestras de manzanas frescas que contienen patulina.



En la figura 12 podemos observar que el 48% de los jugos y néctares de manzana no contienen patulina, el 50% contienen patulina pero dentro de los límites máximos permitidos y el 2% de las muestras contiene patulina sobre los límites máximos permitidos, es decir, mayor a 50 µg/kg.

Figura 12. Diagrama pastel del porcentaje de muestras de jugos y néctares de manzana que contienen o no patulina.



3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los resultados se escogió como herramienta el diseño completamente al azar (D.C.A) o ANOVA, debido a que el material utilizado y las condiciones en las que se realizó el trabajo fueron homogéneos. Este diseño se lo emplea usualmente en investigaciones hechas en el laboratorio para evaluar la significancia estadística de la eficiencia de los tratamientos, sobre la base del error experimental.

Luego de haber realizado el análisis de ANOVA que se muestra en la tabla 15 para las muestras de manzanas frescas, podemos observar que el valor p de la prueba para las diferentes variedades de manzana, los diferentes lotes y la interacción entre variedades y lotes es mayor a 0.05 en todos los casos, por lo tanto los tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí. Es decir, la concentración de patulina en manzanas frescas no depende de la variedad ni el período de muestreo.

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) para manzanas frescas.

Fuente de Varianza	\sum de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado de la media	F Calculado	Valor p
Entre Grupos	6,052300071	35	0,172922859	2725181,44	>0,05
Variedades	0,616615066	3	0,205538355	3239186,03	>0,05
Lotes	1,505996258	8	0,188249532	2966722,46	>0,05
Variedades x Lotes	3,929688746	24	0,163737031	2580417,18	>0,05
Intra Grupos	4,56867E-06	72	6,34537E-08		
Total	6,05230464	107			

Luego de haber realizado el análisis de ANOVA que se muestra en la tabla 16 para las muestras de jugos y néctares de manzana, podemos observar que el valor p de la prueba para las diferentes variedades marcas de producto, los diferentes lotes y la interacción entre marcas y lotes es menor a 0.05 en todos los casos, por lo tanto los tratamientos presentan diferencias significativas entre sí. Es decir, la concentración de patulina en jugos y néctares de manzana depende de la marca y lote de producto.

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) para muestras de jugos y néctares de manzana.

Fuente de Varianza	\sum de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado de la media	F Calculado	Valor p
Entre Grupos	101,572408	159	0,6388	130880	<0,05
Marcas	10,2393845	15	0,6826	139855	<0,05
Lotes	21,4322827	9	2,3814	487890	<0,05
Marcas x Lotes	69,9007404	135	0,5178	106082	<0,05
Intra G	0,0015619	320	5E-06		
Total	101,573969	479			

Adicionalmente se realizó el análisis de ANOVA para establecer si existen diferencias significativas entre el origen de las marcas y los diferentes lotes, como resultado se comprueba que las variaciones entre lotes tienen efectos significativos, sin embargo como el valor p de la prueba es mayor a 0.05 para el origen se acepta la nulidad en su interacción. En conclusión los efectos de variación derivan de los lotes mas no del origen, los resultados pueden ser observados en la tabla 17.

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) para muestras de origen nacional e importado.

Fuente de Varianza	\sum de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado de la media	F Calculado	Valor p
Entre Grupos	20,4529005	19	1,0765	5,4179	<0,05
Lotes	18,8973571	1	18,897	95,112	<0,05
Origen	0,5784823	9	0,0643	0,3235	>0,05
Origen x Lote	0,9770611	9	0,1086	0,5464	>0,05
Intra Grupos	91,3956012	460	0,1987		
Total	111,848502	479			

Luego de que los resultados fueron sometidos al ANOVA y haber advertido que existen diferencias significativas entre marcas y lotes de néctares y jugos de manzana, se procede a realizar las pruebas de significación a través de la localización de las medias en rangos, para lo cual se empleo la prueba de Tukey. Con esta prueba se obtuvo que cualquier marca de producto, en cualquier lote puede contener patulina, siendo el rango de medias con valores correspondientes al límite de cuantificación al método el rango más predominante. (Ver anexo 7).

4. CONCLUSIONES

Luego de haber realizado el presente trabajo podemos concluir que:

- El 80% de manzanas frescas no contienen patulina, el 7.5% contienen patulina pero dentro de los límites máximos permitidos y el 12.5% de las muestras contiene patulina sobre los límites máximos permitidos, es decir, mayor a $50\mu\text{g}/\text{kg}$.
- Del 20% de las muestras de manzanas frescas que contienen patulina, 37.5% corresponde a muestras dentro de norma y el 62.5% corresponde a muestras que contienen mayor a $50\mu\text{g}/\text{kg}$ de patulina de los cuales el 37.5% corresponde únicamente a la parte visiblemente dañada de la muestras de manzanas frescas.
- El 48% de los jugos y néctares de manzana no contienen patulina, el 50% contienen patulina pero dentro de los límites máximos permitidos y el 2% de las muestras contiene patulina sobre los límites máximos permitidos, es decir, mayor a $50\mu\text{g}/\text{kg}$.
- La concentración de patulina en las muestras de manzanas frescas no depende de la variedad de manzana. Esta puede estar relacionada con las condiciones de cosecha, transporte y almacenamiento a las que ha sido sometido el fruto fresco. Sin embargo, todas las variedades tienen una potencial probabilidad de contener patulina.
- Cualquier marca de jugo ó néctar de manzana tiene una potencial probabilidad de contener patulina, cuya concentración está directamente relacionada con el lote de producción, es decir la calidad de la materia prima que haya sido utilizada para la elaboración de los mismos, así como las condiciones de producción y almacenamiento.
- El método presenta recuperaciones del 75% a niveles de $0,026\mu\text{g}/\text{mL}$ y del 88% a niveles de $0,900\mu\text{g}/\text{mL}$ los cuales cumplen con los criterios exigibles a los métodos de

análisis de patulina fijados por el Codex Alimentarius que señalan un rango de recuperaciones entre 50 y 120%, lo que hace del método confiable para su aplicación.

- La extracción líquido – líquido es una técnica que no requiere de un instrumental sofisticado para su ejecución, además los volúmenes de solvente necesarios para su aplicación son relativamente pequeños lo que hace que la técnica tenga un bajo costo comparado con aquellas que requieren columnas de inmunoafinidad.
- El límite de detección del método para muestras líquidas es de $1,29\mu\text{g/L}$ y para muestras sólidas de $8,58\mu\text{g/kg}$ lo que permite que el método sea utilizado para este tipo de investigaciones donde se pretende establecer si una muestra contiene o no patulina, y si el contenido de patulina está sobre los límites máximos permitidos por la legislación vigente que señala un límite de $50\mu\text{g/kg}$.
- La determinación de patulina se realiza mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa debido a que la patulina es una molécula de bajo peso molecular y alta polaridad que puede ser removida de la fase estacionaria utilizando una fase móvil con alto porcentaje de agua, lo que hace a la técnica menos costosa respecto de otras técnicas como cromatografía de gases.
- Se utiliza un detector UV con arreglo de diodos debido a que la molécula de patulina presenta dobles enlaces conjugados que son detectados en el rango UV. La ventaja de disponer de un arreglo de diodos es que se puede hacer un barrido de longitudes de onda y tener un espectro de la molécula que nos ayuda a identificar el analito y eliminar las interferencias.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el consumo de manzanas frescas debido a que podemos identificar si la fruta se encuentra en buen estado ó presenta señales de podredumbre con una fuente potencial de patulina.
- Para la determinación de patulina en manzanas, jugos y néctares de manzana se recomienda el uso de la técnica de cromatografía líquida en fase reversa con detector de arreglo de diodos, utilizando una extracción líquido - líquido debido a que es una técnica no muy costosa y los límites de detección que presenta el método se encuentran bajo de los límites máximos permisibles por la legislación internacional de 50µg/kg.
- Debido a la presencia de patulina en jugos y néctares de manzana, se recomienda realizar estudios más profundos considerando variables como concentración de fruta en la bebida, origen del producto, forma del ingrediente principal (pulpa o concentrado) que podrían influir en el contenido de patulina en productos terminados.
- Se recomienda realizar nuevos estudios de micotoxinas presente en los alimentos debido a que constituye un peligro latente para la salud de los seres vivos.
- Trabajar en conjunto con entidades gubernamentales para promover el establecimiento de programas nacionales de prevención, monitoreo y control de micotoxinas en los alimentos.

6. REFERENCIAS

1. Carrillo, Leonor (2007). Los hongos de los alimentos y forrajes. Mohos y Micotoxinas. Penicillium. <http://www.unsa.edu.ar/>. 25 de octubre de 2008.
2. FAO (2003) Legislación Micotoxinas
3. Codex Alimentarius Commission (2003) Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. CA/RCP-2003. Pre-publication. Food and Agricultura Organization, Rome, Italy.
4. Consejo de la Unión Europea. (2003). Reglamento CE N° 1425/2003 de la Comisión del 11 de agosto de 2003 que modifica el reglamento CE N° 466/2001 en lo relativo a la patulina. Bruselas.
5. KnowMycotoxins (2008). Crecimiento de los hongos, <http://www.knowmycotoxins.com/es/ndairy.htm>, 05 de abril de 2009.
6. Smith, Jhon E. (1985). *Micotoxins Formation, Analysis and Significance*, John Wiley & Sons Ltda., Great Britain.
7. Soriano Del Castillo, José. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*, Díaz de Santos, México.
11. Cole, Richard J. (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academia Press Inc., United States of America.
12. Woodward, RB; Singh, G. (1949). *Journal of American Chemistry Society*, Vol 71, pp 758-759.
15. Codex Alimentarius Commission (2004). Joint FAO/WHO Food Standard programme. Codex Comité on Food additives and contaminants. Maximum level for patulin in

- apple juice and apple juice ingredients in other beverages. Thirty-sixth session. Róterdam, The Netherlands.
16. Official Methods of Analysis. (2005). Patulin. WHO Food Additives Series 35. pp 21-24.
 22. World Health Organization. (1995). *44th Report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technology Report Series*, 859 Geneva, Switzerland.
 23. Tercera Conferencia Internacional Mixta entre la FAO, OMS, PNUMA sobre Micotoxinas. (1999). Análisis de riesgo de las micotoxinas por el comité mixto de expertos FAO/OMS sobre Aditivos alimentarios (JECFA). Túnez
 25. Journal of AOAC International. (2007). Food Chemicals Contaminants. Determination of Patulin in Apple Juice: Comparative evaluation of four analytical methods. Vol. 90. N°1. South África.
 26. Revista Brasileira de Fruticultura. (2007). Patulin in food: State of the art and analytical trends, Vol. 29 N°2, Brasil, pp406-413
 30. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2007). III Censo Nacional Agropecuario. Cultivos permanentes y transitorios. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Ecuador
 31. Bissessur, J; Permaul, K. (2001). *Reduction of Patulin during apple juice clarification*, Journal of Food Protection, Vol 64, pp 1216-1219.
 32. Bolet Astoviza, Miriam y Socarras Suarez, Matilde. (2005). *Micotoxinas y cáncer*. *Revista cubana Invest Biomed. (on line)*, Vol. 24, pp 54-59.
 33. Burda, K. (1992). *Incidence of Patulin in apple, pear and mixed fruit products marketed in New South Wales*, Journal of Food Protection, Vol 55., pp 796-798.

34. Ciegler, A., Beckwith, A. C., Jackson, L. K.; 1976; *Teratogenicity of Patulin and Patulin Adducts Formed with Cysteine A*; Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology; 31,5:664-667
35. Consejo de la Unión Europea. (2003). Directiva 2003/78/CE de la Comisión del 11 de agosto de 2003 por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios. Bruselas.
36. Esquivel Benjamin. (1973). *Cromatografía Líquida de Alta Presión*, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington D.C.
37. Jalón, Mercedes. (2006). *Seguridad Química de los Alimentos*, Asociación Vasca de Pediatría de Atención Primaria. XVIII Jornadas de Pediatría en Atención Primaria, Vitoria.
38. Kirk, Ronald S.; Sawyer, Ronald. (1999). *Composición y análisis de alimentos de Pearson*, Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., 2da ed., México.
39. National Academy of Science. (1966). *Toxicants Occurring Naturally in Foods*, National Research Council, Washington, D.C.
40. Neogen Corporation. (2008). *Product Catalog*, 4th edition, pp 5-7.
41. Observaciones de la Comunidad Europea para la Comisión del Codex Alimentarius, (2001), Tema 10 a) del programa: Examen de normas y textos afines en el trámite 8 o un trámite equivalente, 24º reunión, Ginebra, Suiza.
42. Official Methods of Analysis. (2005). AOAC 995.10 *Patulin in Apple Juice*. Liquid Chromatographic Method. En: Chapter 49 (Natural Toxins), section 49.7.02.
43. Organización Panamericana de la Salud. (1983). *Criterios de salud Ambiental 11. Micotoxinas*, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Organización Mundial de la Salud. Publicación científica N°453. Washington, D.C.

44. Programa Cooperativo para el desarrollo tecnológico agropecuario del cono Sur (1998). DreamSur. Una herramienta para apoyar el proceso de priorización de la investigación agropecuaria. Montevideo. Uruguay.
45. Saltos, Héctor A. (1998). *Componentes principales en el análisis sensorial de pulpa de manzana "Emilia"*, Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
46. Sánchez Otero, Julio. (2005). *Introducción al Diseño Experimental*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ecuador.
47. Shibatomo, Takayuki. (1996). *Introducción a la Toxicología de Alimentos*, Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.
48. Soria, Norma. (1992). *El cultivo del manzano en la zona alta del Ecuador*, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Programa de frutales, manual N°20, Ecuador.
49. De Luca, Leonardo J. (2007). Micotoxinas (Laboratorios Burnet), http://64.76.120.161/micotoxinas_laboratorios_burnet_s_articulos_464_MYC.htm, 05 de julio de 2007.
50. Consuma Seguridad (2003) Aprobado un real decreto que regula el control del contenido de patulina en productos alimenticios. /www.consumaseguridad.com/. 12 de agosto de 2008
51. Ergonomix (2006) Riesgos de micotoxicosis que algunas micotoxinas (como contaminantes de alimentos) pueden provocar en humanos. /www.engormix.com/. 25 de septiembre de 2008.
52. Alimentación Sana (2007). La Manzana. <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/manzana.htm>. 08 de enero de 2009.

53. FAO. (2003). <http://www.fao.org>. Worldwide regulations for mycotoxins in Food and feed in 2003. Mycotoxin regulations in 2003 and current developments. 03 de febrero de 2009.
54. Fundación Eroski. (2007). Nuevas normas para limitar la presencia de patulina en productos derivados de la manzana, <http://www.consumer.es/web/es/alimentación/2003/08/13/64392.php?print=true>., 05 de abril de 2009.
55. CORPEI, Banco Central del Ecuador. (2008). Exportaciones e Importaciones Ecuatorianas. http://www.ecuadorexporta.org/cgi-bin/corpei2/exportal_resul.cgi. 10 de abril de 2009.

ANEXOS

Anexo 1. Información general del estándar de patulina.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-521-8956 • (314) 771-5765
Fax 800-325-5052 • (314) 771-5757
email: sigma-techserv@sial.com
Internet: http://www.sigma.sial.com

Product Information

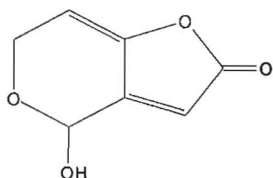
PATULIN

Product Number P1639
Storage Temperature -0°C

CAS #: 149-29-1

Synonyms: 4-Hydroxy-4H-furo 3,2-C-pyran-2(6H)-one;
claviformin; clavitin; expansin; clavacin; penicidin;
mycoicin C; mycoicin; leucopin; tercinin

Product Description



Molecular formula: C₇H₆O₄

Formula weight: 154.1

E^M(276 nm) = 14,600 (methanol)¹

P1639 is produced by fermentation and purified by chromatography. It is a white crystalline powder, with melting point range 110-111°C. It can be crystallized from benzene. Conditions for analysis by TLC, GLC, and NMR are reported. A molar extinction coefficient of 16,600 is reported for absorbance at 276 nm¹ (although Sigma data indicate a value closer to 14,600 in methanol).

Patulin is a mycotoxin produced by various species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssosclamyces* fungi. It has been found to be carcinogenic in rats^{2,3} and acutely toxic in many animal species.^{4,5,6} It has been detected in rotten apples and cider produced from them.⁷ Analytical methods for the detection of patulin in apple juice^{8,9} and other food products¹⁰ have been published.

Patulin has a wide antibiotic activity and has appeared in the literature under the names of clavacin, claviformin, expansin, mycoicin C and penicidin^{11,12} and was at one time used in human clinical trials as an antibiotic, but was found to be too toxic for use in humans.^{1,13}

Storage/Stability

The stability of patulin has been investigated by several groups.^{4,14,15,16}

Patulin is stable at least two years stored frozen.

Sigma tests solubility at 50 mg/mL in ethyl acetate; a clear colorless solution is obtained. It is also reported to be soluble in water, alcohols, acetone; sparingly soluble in ethyl ether or benzene. Although soluble in water, it is somewhat unstable in polar solvents such as water and methanol and loses its biological potency in alkaline conditions.^{1,17} Sigma has not tested solution stability.

References

1. Handbook of Toxic Fungal Metabolites, R.J. Cole and R.H. Cox, Eds., Academic Press (1981) p. 511.
2. Dickens, F. and Jones, H.E. H, Brit. J. Cancer, 15, 85 (1961).
3. Dickens, F. et al., Brit. J. Cancer, 20, 134 (1966).
4. Chain, E. et al., Brit. J. Explt. Pathol., 23, 202 (1942).
5. Broom, W.A. et al., Brit. J. Explt. Pathol., 25, 195 (1944).
6. Schweitzer, A., Explt. Med. Surg., 4, 289 (1946).
7. Wilson, D.M. and Nuovo, G.J., Appl. Microbiol., 26, 124 (1973).
8. Pohland, A.E., et al., J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 53, 692 (1970).
9. Helrich, K. Editor, Official Methods of Analysis of the A.O.A.C., 15th ed., 1209-1210 (1990).
10. Pohland, A.E. and Allen, R., J. Ass. Offic. Anal. Chem., 56, 686 (1970).
11. Florey, H.W. et al., in Antibiotics (2 vol.), p. 1774, Oxford Univ. Press, London and New York (1949).
12. Singh, J., Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana, Illinois, (1966).
13. Boyd, E.M., Can. Med. Assoc., 50, 159 (1944).

Anexo 2. Hoja de especificación del estándar de patulina.

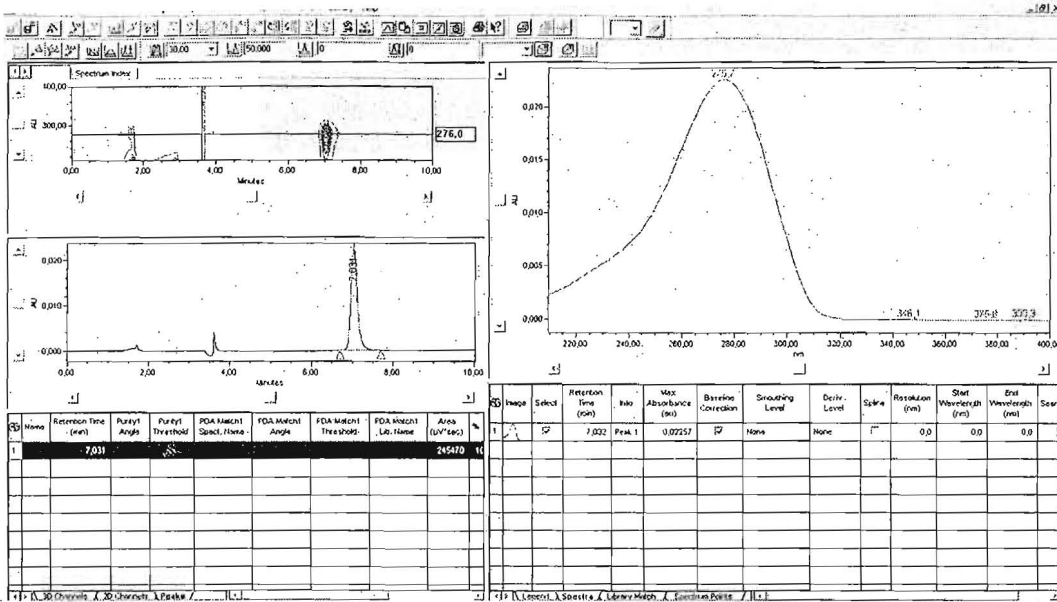
Specification Sheet

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Patulin, ≥98% (TLC)
Product Number	P1639
Product Brand	SIGMA
CAS Number	149-29-1
Molecular Weight	154.12
Storage Temp	-20°C

TEST	SPECIFICATION
APPEARANCE	WHITE TO WHITE WITH A FAINT YELLOW CAST POWDER
SOLUBILITY	CLEAR COLORLESS TO FAINT YELLOW SOLUTION AT 50MG/ML IN ETHYL ACETATE
H-NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE
PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY	NLT 98%
RECOMMENDED RETEST	3 YEARS
	DOCUMENT # P1639/11/13/95/1

Anexo 3. Cromatograma junto a espectro de absorción de la patulina a la longitud de onda máxima (276nm).



Peak	Retention Time (min)	Purity Angle	Purity Threshold	FDA MATCH Stand. Name	FDA MATCH Angle	FDA MATCH Threshold	FDA MATCH Lib. Name	Area (mV*sec)	%
1	7.031							24570	100

Image	Select	Retention Time (min)	Wavelength (nm)	Max Absorbance (AU)	Baseline Correction	Smoothing Level	Deriv. Level	Scale	Resolution (nm)	Start Wavelength (nm)	End Wavelength (nm)	Scan
1	SP	7.032	Peak 1	0.02257	<input checked="" type="checkbox"/>	None	None		0.0	0.0	0.0	F

Anexo 4. Método AOAC 995.10 Patulin in Apple Juice. Liquid

Chromatographic Method. Chapter 49 (Natural Toxins). Section

49.7.02, año 2005.

49.7.02

AOAC Official Method 995.10
Patulin in Apple Juice

Liquid Chromatographic Method
First Action 1995
Final Action 1999

AOAC-IUPAC-IFJU Method

(Applicable to determination of 20–200 µg patulin/L of apple juice.)

See Table 995.10 for results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

A. Principle

Patulin is extracted with ethyl acetate and isolated by extraction with Na₂CO₃ solution. Extract is dried with anhydrous Na₂SO₄. After evaporation of ethyl acetate, patulin is determined by reverse phase LC column with UV detection.

B. Apparatus

- (a) *Vortex mixer*.—Equivalent tube shaker is suitable.
- (b) *Pasteur pipet*.—9 in. length (ca 23 cm).
- (c) *Glass tubes*.—20 × 150 mm and 16 × 150 mm disposable glass culture tubes with Teflon-lined screw caps.
- (d) *Centrifuge tubes*.—25 mL conical bottom; polypropylene or glass.
- (e) *Volumetric pipet*.—5 mL, glass.
- (f) *Heating block or water bath*.—Maintaining 40° ± 1°C.
- (g) *Injection system*.—Syringe loading injection valve with 50 µL loop. (Autosampler can be used.)
- (h) *Liquid chromatographic (LC) pump*.—Delivering 1.0 mL/min.
- (i) *LC column*.—Either column may be used: (1) 3.9 × 250 mm, 5 µm, 100 Å, C18, non-end-capped, carbon load 16%; (2) 3.9 × 150 mm, 5 µm, 90 Å, non-end-capped, C18, carbon load 10%. Store column with 80% acetonitrile–water or as recommended by column manufacturer.
- (j) *UV detector*.—Set at 276 nm for D₂ or Xe lamp and at 254 nm for Hg lamp.
- (k) *Volumetric flasks*.—1, 10, and 25 mL.

C. Reagents

- (a) *Ethyl acetate*.—LC grade; UV cut off, 252 nm.
- (b) *Sodium carbonate solution*.—1.5%. Dissolve 1.5 g Na₂CO₃ (reagent grade) in 100 mL deionized H₂O.
- (c) *LC mobile phases*.—(1) For 250 mm C18 column.—Mix 100 mL H₂O with 0.8 mL tetrahydrofuran (THF) (LC grade); (2) For 150 mm C18 column.—H₂O; (3) Alternative mobile phases using various amounts of acetonitrile (up to 10%) or THF (up to 5%) as needed for separation or to decrease retention time.
Filter mobile phase through 0.45 µm filter before use.
- (d) *Acetic acid solution*.—H₂O adjusted to pH 4 with acetic acid (reagent grade).
- (e) *Patulin standard stock solution (200 µg/mL)*.—Accurately weigh ca 5 mg pure crystalline patulin into 25 mL volumetric flask, record weight and dissolve patulin in ethyl acetate. Dilute to volume with ethyl acetate. Store flask containing patulin standard stock solution wrapped tightly in Al foil in refrigerator at 2°–5°C. Solution is stable ca 1 month.

Pipet 250 µL solution into 5 mL volumetric flask and evaporate to dryness under nitrogen. Immediately add absolute alcohol, mix, and dilute to volume with absolute alcohol (10 µg/mL). Record UV spectrum of patulin standard stock solution and calculate patulin concentration as in 974.18C(d) (see 49.7.01).

(f) *Patulin standard working solutions*.—0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 µg patulin/mL acetic acid solution corresponding to 5, 10, 25, and 50 ng patulin/50 µL injection. To prepare, transfer 100 µL patulin standard stock solution, (e), into 10 mL volumetric flask. Evaporate just to dryness under stream of nitrogen at room temperature. Immediately dilute to volume with acetic acid solution, (d), and mix well. Transfer 50, 100, 250, and 500 µL portions to separate 1 mL volumetric flasks and dilute to volume with acetic acid solution. Store patulin working standard solutions wrapped in aluminum foil in refrigerator at 2°–5°C. Make new patulin working standard solutions weekly.

(g) *Sodium sulfate*.—Reagent grade, anhydrous granular or powdered.

(h) *5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF) solution*.—Dissolve 5 mg in 25 mL ethyl acetate.

D. Preparation of Test Solution

[Note: All glassware must be cleaned with organic solvent (e.g., ethyl acetate) and deionized water before use, especially if previously used for patulin determination.]

Pipet 5 mL apple juice or concentrate, diluted as recommended for consumption, to 20 × 150 mm glass culture tube, add 10 mL ethyl acetate, and shake tube vigorously 1 min using Vortex mixer. Let layers separate and, using Pasteur pipet, transfer upper organic layer to 16 × 150 mm glass culture tube.

[Note: If emulsion forms, particularly with cloudy juices, pretreat juice with commercial pectinase according to manufacturer's directions and then centrifuge. Use 5 mL centrifugate for extraction.]

Add second 10 mL portion ethyl acetate to original 20 × 150 mm tube and shake vigorously. Let layers separate and combine the two organic layers in 16 × 150 mm tube. Add 2 mL 1.5% Na₂CO₃ solution to the combined ethyl acetate layers and mix tube vigorously on Vortex mixer. Let layers separate.

Using Pasteur pipet, transfer upper ethyl acetate layer to clean tube, and extract lower aqueous layer with 5 mL ethyl acetate. Transfer upper ethyl acetate layer to the tube with first extract. Discard lower aqueous layer.

Add 1 g Na₂SO₄ to ethyl acetate layer, cap tube tightly. Invert and shake tube vigorously ca 30 s.

[Note: It is important that ethyl acetate extract is dried with anhydrous Na₂SO₄. Patulin may be destroyed when wet ethyl acetate extract is evaporated to dryness.]

Let solids settle and decant solution to 25 mL polypropylene or glass tube with conical bottom, without transferring solids.

Place tube in heating block at 40°C and evaporate to 1–2 mL under stream of nitrogen. Quantitatively transfer extract to 7–8 mL (2 dram) vial, rinsing tube with ca 1 mL ethyl acetate, and complete evaporation to dryness in vial. Dissolve residue in 0.5 mL acetic acid solution and retain for LC determination. If necessary, store test solution in freezer at <–20°C. Store no longer than 1 week. Do not store purified extracts as dry film. Run reagent blank by extracting 5 mL deionized water instead of apple juice. Inject reagent blank before injecting test solution.

Table 995.10. Interlaboratory study results for determination of patulin in apple juice by liquid chromatographic method

No. of labs ^a	Patulin added, µg/L	Mean recovery ^b , %	s _r	s _R	RSD _r ^c , %	RSD _R ^c , %	r ^d	R ^e	HorRat
19	Bl ^f	—	3.8	4.9	53.8	68.8	10.6	13.7	—
19	20	108	4.6	5.9	18.1	23.5	12.9	16.5	0.82
20	50	96	6.6	11.5	13.1	22.8	18.5	32.2	0.92
20	100	93	10.5	20.2	10.9	20.9	29.4	56.6	0.93
19	200	91	23.7	28.0	12.8	15.1	66.4	78.4	0.75
17	NC ^g	—	6.9	10.2	19.9	29.2	19.3	28.6	1.09

^a Number of laboratories included in statistics (values of outliers are rejected).

^b Recoveries corrected for background levels 4 µg patulin/L.

^c Average concentration found used in calculating RSD values.

^d $r = 2.8 \times s_r$.

^e $R = 2.8 \times s_R$.

^f BL = Blank, concentration found by studied method in originator's laboratory, 4 µg/L.

^g NC = Naturally contaminated, concentration found by studied method in originator's laboratory, 31 µg/L. Mean found (for which statistics were generated), 35 µg/L.

E. LC Determination

Set flow rate of LC to 0.5 mL/min with column and mobile phase of choice. Set UV detector to 276 nm and sensitivity to 0.02 absorbance unit full scale (AUFs) or as appropriate for detector and recorder system to obtain 50% full scale deflection for patulin working standard solution 0.5 µg/mL.

To evaluate LC column performance, transfer 100 µL patulin standard stock solution and 100 µL HMF solution to 10 mL volumetric flask, evaporate solvent under stream of nitrogen at room temperature and dilute residue to volume with acetic acid solution.

Inject 50 µL HMF–patulin solution onto LC column using 20 µL excess to ensure that injection loop is completely filled. (See manufacturer's instructions for excess required for specific loop used.) When using 250 mm column with THF–H₂O as mobile phase, HMF and patulin should elute as 2 separate peaks with baseline separation in ca 9 and 11 min, respectively. When using 150 mm column with H₂O as mobile phase, patulin and HMF should elute in ca 19 and 22 min, respectively. (Note: For large concentrations of HMF, the latter system may be preferable.)

If HMF and patulin are not completely separated, different column should be selected for the analysis. Analysis cannot be performed unless HMF and patulin separation is achieved.

Inject 50 µL each patulin working standard solution. Inject mobile phase following injection of high positive test solutions. Using measured peak heights from recorder, prepare standard curve by plotting peak heights versus concentrations of patulin working standard solutions.

Inject 50 µL test solution from D. Patulin concentration in test solution can be read directly from plotted graph or calculated from peak height of patulin working standard solutions.

If peak height of test solution is outside the range of the standard curve, dilute test solution and re-run LC analysis.

G. Calculations

Calculate concentration of patulin in test solution (C_T, µg/mL) as follows:

$$C_T = \frac{C_S \times H_T}{H_S} \times F$$

where C_S = concentration of patulin in patulin working standard solution used for quantitation, µg/mL; H_T = recorder response for injected test solution (peak height); H_S = recorder response for injected patulin standard working solution (peak height); F = dilution factor (1, unless test solution requires dilution or concentration).

Calculate concentration of patulin in apple juice (µg/L) as follows:

$$\text{Patulin in apple juice} = \frac{C_T \times 1000}{10}$$

where 10 = ratio of apple juice: test solution, volumes, since 5 mL apple juice is represented by 0.5 mL test solution.

Reference: J. AOAC Int. 79, 451(1996).

Anexo 5. Directiva 2003/78/Comunidad Europea de la Comisión de 11 de agosto de 2003 por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios.

DIRECTIVA 2003/78/CE DE LA COMISIÓN

de 11 de agosto de 2003

por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 85/591/CEE del Consejo, de 20 de diciembre de 1985, referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control de los productos destinados a la alimentación humana ⁽¹⁾ y, en particular, su artículo 1,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) n° 466/2001 de la Comisión, de 8 de marzo de 2001, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios ⁽²⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 1425/2003 de la Comisión ⁽³⁾, fija el contenido máximo de patulina en determinados productos alimenticios.
- (2) La Directiva 93/99/CEE del Consejo, de 29 de octubre de 1993, sobre medidas adicionales relativas al control oficial de los productos alimenticios ⁽⁴⁾ establece un sistema de normas de calidad para los laboratorios a los que los Estados miembros han confiado el control oficial de los productos alimenticios.
- (3) Parece necesario fijar los criterios generales que deben cumplir los métodos de análisis para que los laboratorios encargados de los controles utilicen métodos de análisis cuyos resultados sean comparables. Es también esencial que los resultados analíticos se comuniquen e interpreten de manera uniforme a fin de garantizar un enfoque armonizado en el conjunto de la Unión Europea. Dichas normas de interpretación son aplicables a los resultados analíticos obtenidos de las muestras destinadas al control oficial. En caso de análisis con fines de defensa o de arbitraje se aplican las normas nacionales.
- (4) Las disposiciones que se refieren a los métodos de toma de muestras y de análisis se establecen sobre la base de los conocimientos actuales, y podrán adaptarse a la evolución de los conocimientos científicos y tecnológicos.
- (5) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros adoptarán todas las medidas necesarias a fin de que la toma de muestras para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios se efectúe de acuerdo con los métodos descritos en el anexo I de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros adoptarán todas las medidas necesarias para que la preparación de la muestra y el método de análisis utilizado para el control oficial del contenido de patulina en los productos alimenticios cumplan los criterios descritos en el anexo II de la presente Directiva.

Artículo 3

1. Los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo dispuesto en la presente Directiva a más tardar el 1 de septiembre de 2004. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Cuando los Estados miembros adopten las citadas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones de la legislación nacional que adopten en el ámbito al que se refiere la presente Directiva.

Artículo 4

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Artículo 5

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 11 de agosto de 2003.

Por la Comisión

David BYRNE

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 372 de 31.12.1985, p. 50.

⁽²⁾ DO L 77 de 16.3.2001, p. 1.

⁽³⁾ Véase la página 1 del presente Diario Oficial.

⁽⁴⁾ DO L 290 de 24.11.1993, p. 14.

ANEXO I

MÉTODOS DE TOMA DE MUESTRAS PARA EL CONTROL OFICIAL DEL CONTENIDO DE PATULINA EN DETERMINADOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS.

1. Objeto y ámbito de aplicación

Las muestras destinadas a los controles oficiales del contenido de patulina en los productos alimenticios se tomarán de acuerdo con los métodos descritos a continuación. Las muestras globales así obtenidas se considerarán representativas de los lotes. La conformidad de los lotes, por lo que se refiere a los contenidos máximos fijados en el Reglamento (CE) nº 466/2001 de la Comisión, se determinará en función del contenido encontrado en las muestras de laboratorio.

2. Definiciones

- Lote:** Cantidad de producto alimenticio identificable, entregada en una vez y que presenta, a juicio del agente responsable, características comunes, como el origen, la variedad, el tipo de envase, el envasador, el expedidor o el marcado.
- Sublote:** Parte de un lote más grande designada para aplicar sobre ella el método de toma de muestras. Cada sublote deberá estar separado físicamente y ser identificable.
- Muestra elemental:** Cantidad de material tomado en un único punto del lote o sublote.
- Muestra global:** Agregación de todas las muestras elementales tomadas del lote o sublote.

3. Disposiciones generales

3.1. Personal

La toma de muestras deberá ser efectuada por una persona autorizada a tal efecto, según las disposiciones vigentes en el Estado miembro.

3.2. Producto

Todo lote para analizar será objeto de un muestreo separado.

3.3. Precauciones

Durante el muestreo y la preparación de las muestras, deberán tomarse precauciones con el fin de evitar toda alteración que pueda modificar el contenido de patulina o afectar a los análisis o a la representatividad de la muestra global.

3.4. Muestras elementales

En la medida de lo posible, las muestras elementales se tomarán en distintos puntos del lote o sublote. Toda excepción a esta norma deberá señalarse en el acta.

3.5. Preparación de la muestra global

La muestra global se obtiene agrupando las muestras elementales. Deberá pesar como mínimo 1 kg, a menos que no sea posible, por ejemplo cuando se hayan tomado muestras de un único envase.

3.6. Muestras idénticas

Las muestras idénticas tomadas para garantizar el cumplimiento de la normativa o con fines de defensa del comerciante o de arbitraje deberán proceder de la muestra homogeneizada global, a condición de que este procedimiento no contravenga la normativa de los Estados miembros en materia de toma de muestras.

3.7. Acondicionamiento y envío de las muestras

Cada muestra deberá colocarse en un recipiente limpio, de material inerte, que ofrezca protección adecuada contra la contaminación y el deterioro que pudieran resultar del transporte. Habrán de tomarse también todas las precauciones necesarias para evitar cualquier modificación de la composición de la muestra que pudiera ocurrir durante el transporte o el almacenamiento.

3.8. Precintado y etiquetado de las muestras

Cada muestra oficial se precintará en el lugar del muestreo y se identificará según las disposiciones vigentes en el Estado miembro.

De cada toma de muestras deberá establecerse un acta que permita identificar sin ambigüedad cada lote y que indique la fecha y el lugar del muestreo, así como toda información adicional que pueda resultar útil al analista.

4. Planes de muestreo

El método de muestreo utilizado garantizará que la muestra global sea representativa del lote que vaya a controlarse.

Número de muestras elementales

El peso de la muestra global deberá ser de al menos 1 kg (véase el punto 3.5) a menos que no sea posible, por ejemplo cuando se hayan tomado muestras de un único envase.

El número mínimo de muestras elementales que deberán tomarse del lote será el indicado en el cuadro 1. En el caso de los productos líquidos, el lote deberá mezclarse lo más posible por medios manuales o mecánicos inmediatamente antes de proceder a la toma de muestras. En este caso, se supone una distribución homogénea de patulina en un lote determinado, por lo que bastará con tomar tres muestras elementales por lote que forme la muestra global.

Las muestras elementales serán de un peso similar. El peso de una muestra elemental deberá ser de al menos 100 gramos que, en conjunto, constituye una muestra global de al menos 1 kg. Toda excepción a esta norma deberá señalarse en el acta contemplada en el punto 3.8.

Cuadro 1:

Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote

Peso del lote (en kg)	Número mínimo de muestras elementales
< 50	3
50 a 500	5
> 500	10

Si el lote está formado por envases individuales, el número de envases que han de tomarse para formar la muestra global se indica en el cuadro 2.

Cuadro 2:

Número de envases (muestras elementales) que deben tomarse para formar una muestra global si el lote está formado por envases individuales

Número de envases o unidades del lote	Número de envases o unidades que deben tomarse
1 a 25	1 envase o unidad
26 a 100	Aproximadamente 5 %, al menos 2 envases o unidades
> 100	Aproximadamente 5 %, como máximo 10 envases o unidades

5. Conformidad del lote o sublote con la especificación

El laboratorio de control realizará dos análisis de la muestra de laboratorio destinada a medidas sancionadoras en caso de que el resultado obtenido en el primer análisis sea menos de un 20 % inferior o superior al nivel máximo, y calculará la media de los resultados.

El lote será aceptado si el resultado del primer análisis es inferior en más del 20 % al nivel máximo o, en caso de que sea necesario el análisis por duplicado, cuando la media se ajuste al contenido máximo respectivo establecido en el Reglamento (CE) nº 466/2001, teniendo en cuenta la incertidumbre de medición y la corrección para la recuperación.

Se considerará que el lote no respeta el nivel máximo establecido en el Reglamento (CE) nº 466/2001 cuando la media, corregida para la recuperación, sea superior –fuera de toda duda razonable– al nivel máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medición.

ANEXO II

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y CRITERIOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL OFICIAL DEL CONTENIDO DE PATULINA EN DETERMINADOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS

1. Precauciones

Dado que la patulina puede distribuirse en determinados productos alimenticios de manera heterogénea, las muestras deberán prepararse -y, sobre todo, homogeneizarse- con el mayor cuidado.

Para la preparación del material de análisis, deberá utilizarse la totalidad del material recibido en el laboratorio.

2. Tratamiento de la muestra recibida en el laboratorio

En la medida que sea pertinente, se triturará finamente y se mezclará minuciosamente la muestra global en su integridad según un método reconocido que garantice una homogeneización completa.

3. Subdivisión de las muestras con fines de control, de derecho de recurso o de arbitraje

Las muestras idénticas tomadas a efectos de control, de derecho de recurso o de arbitraje deberán proceder de la muestra homogeneizada, a condición de que este procedimiento no contravenga la normativa de los Estados miembros en materia de toma de muestras.

4. Método de análisis que debe utilizar el laboratorio y medidas de control del laboratorio

4.1. Definiciones

A continuación se recogen algunas de las definiciones más comúnmente utilizadas, que los laboratorios deberán aplicar:

Los parámetros de precisión más comúnmente citados son la repetibilidad y la reproducibilidad.

r = Repetibilidad: valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe la diferencia absoluta entre los resultados de dos pruebas particulares, obtenidos en condiciones de repetibilidad (es decir, con la misma muestra, el mismo operario, el mismo instrumental, en el mismo laboratorio y en un breve intervalo de tiempo) dentro de los límites de una probabilidad específica (en principio, 95 %); de donde: $r = 2,8 \times s_r$.

s_r = Desviación típica calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad.

RSD_r = Desviación típica relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad $[(s_r/\bar{x}) \times 100]$, donde \bar{x} representa la media de los resultados de todos los laboratorios y muestras.

R = Reproducibilidad: valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe la diferencia absoluta entre los resultados de dos pruebas particulares, obtenidos en condiciones de reproducibilidad (es decir, con material idéntico tratado por operarios en distintos laboratorios, utilizando el método de ensayo normalizado) dentro de los límites de una probabilidad específica (en principio, 95 %); de donde: $R = 2,8 \times s_R$.

s_R = Desviación típica calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad.

RSD_R = Desviación típica relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad $[(s_R/\bar{x}) \times 100]$.

4.2. Requisitos generales

Los métodos de análisis utilizados para el control de los productos alimenticios deben cumplir las disposiciones de los puntos 1 y 2 del anexo de la Directiva 85/591/CEE del Consejo, de 20 de diciembre de 1985, referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control de los productos destinados a la alimentación humana (¹).

4.3. Requisitos específicos

En tanto no se prescriba a escala comunitaria ningún método específico para la determinación del contenido de patulina en los productos alimenticios, los laboratorios podrán aplicar cualquier método de su elección, a condición de ajustarse a los siguientes criterios:

(¹) DO L 372 de 31.12.1985, p. 50.

Características del método respecto a la patulina

Contenido µg/kg	Patulina		
	RSD, %	RSD _R %	Recuperación %
< 20	≤ 30	≤ 40	50 a 120
20-50	≤ 20	≤ 30	70 a 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 a 105

No se indican los límites de detección de los métodos utilizados, puesto que se dan los valores de precisión para las concentraciones que presentan interés.

Los valores de precisión se calculan a partir de la ecuación de Horwitz:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5logC)}$$

donde:

— RSD_R representa la desviación típica relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad [(s_R/x̄) × 100].

— C es la tasa de concentración (es decir, 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg)

Se trata de una ecuación generalizada de precisión, que se ha revelado independiente del analito y de la matriz y únicamente dependiente de la concentración en la mayoría de los métodos corrientes de análisis.

4.4. Cálculo de la tasa de recuperación y comunicación de los resultados

El resultado analítico se registrará en forma corregida o sin corregir a efectos de recuperación. Deberá indicarse la forma de registro y la tasa de recuperación. El resultado analítico corregido a efectos de recuperación se utiliza para comprobar el cumplimiento (véase el punto 5 del anexo 1).

El resultado analítico se expresará como x +/- U, siendo x el resultado analítico y U la incertidumbre de medición.

4.5. Normas de calidad aplicables a los laboratorios

Los laboratorios deberán ajustarse a las disposiciones de la Directiva 93/99/CEE del Consejo, de 29 de octubre de 1993, sobre medidas adicionales relativas al control oficial de los productos alimenticios.

Anexo 6. Parámetros de regresión lineal.



Study variable: Patulina
 Unit:
 File: \\eccayw0000\Users\ECVillacr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls
 Worksheet: Hoja2 Last update: 28/05/2009 15:44:52
 Reference: \$E\$42:\$E\$62

Study variable:
 Unit: µg/mL
 File: \\eccayw0000\Users\ECVillacr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls
 Worksheet: Hoja2 Last update: 28/05/2009 15:45:16
 Reference: \$F\$42:\$F\$62

BASIC STATISTICS Set 1:Patulina

Independent variable X

Number of used values:	21	Number of removed values:	0	
Range =	1,2739 8	Interquartile range (Q3-Q1) =	0,6	
Minimum	1° Quartile (Q1)	Median	3° Quartile (Q3)	Maximum
0,01287	0,0	0,1	0,6	1,28685

BASIC STATISTICS Set 2:

Dependent variable Y

Number of used values:	21	Number of removed values:	0	
Range =	25344, 0	Interquartile range (Q3-Q1) =	12.171, 0	
Minimum	1° Quartile (Q1)	Median	3° Quartile (Q3)	Maximum
313	510,0	2.598,0	12.681,0	25657

REGRESSION RESULTS

General The two sets are correlated (5% signification level)

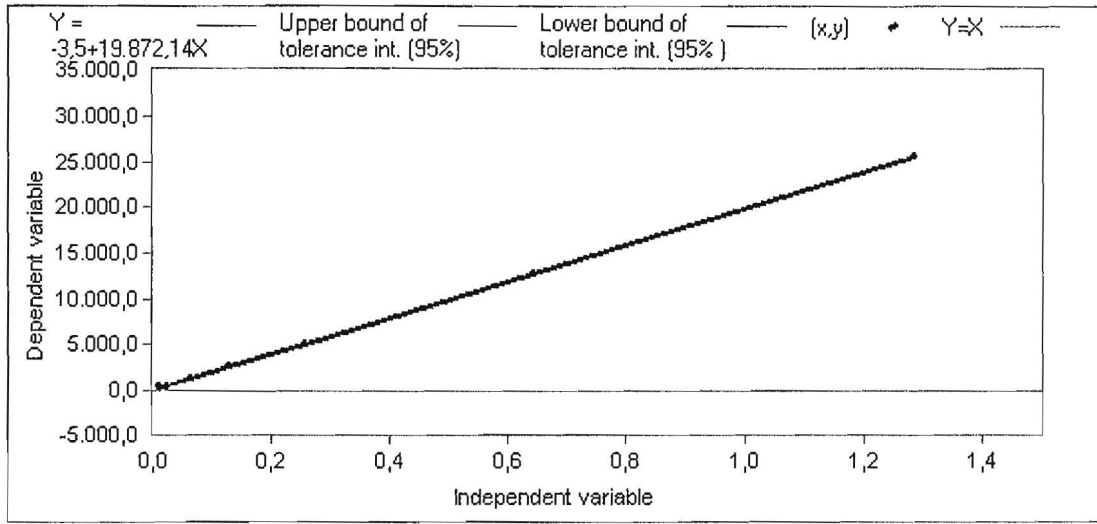
Model:	Y = -3,5 + 19.872,1 X	95% Confidence interval			Decision	
		Lower	Central	Upper		
Coefficient of determination (R2):	0,9999	Slope:	[19.782,6	19.872,1	19.961,7]	does not include 1
Correlation coefficient (r):	1,0	Intercept:	[-53,2	-3,5	46,2]	Includes 0
Residual standard deviation (=SEC): 85,2						

Normality test for residuals (Shapiro-Francia test) THE POPULATION DOES NOT FOLLOW A NORMAL LAW (5% SIGNIFICANCE LEVEL)
 (Rejecting the hypothesis of normality, one has 0,756 % chances of taking a wrong decision)

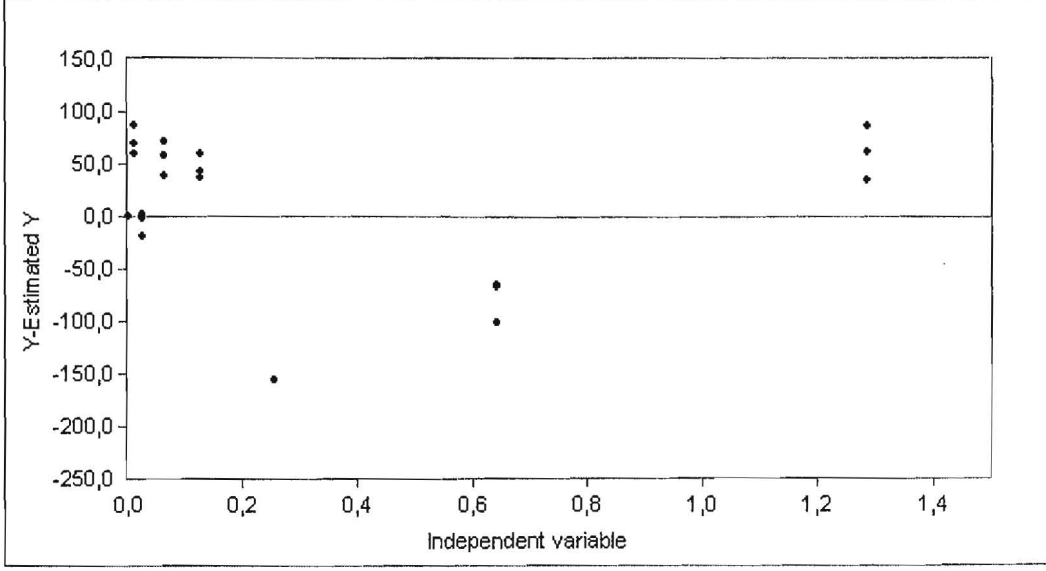
Study variable: Patulina
Unit:
File: \\eccayw0000\Users\ECVillacCr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls
Worksheet: Hoja2 **Last update:** 28/05/2009 15:44:52
Reference: \$E\$42:\$E\$62

Study variable:
Unit: µg/mL
File: \\eccayw0000\Users\ECVillacCr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls
Worksheet: Hoja2 **Last update:** 28/05/2009 15:45:16
Reference: \$F\$42:\$F\$62

Regression line




Graph of residuals



Study variable:	Patulina (Set 1)		
Unit:			
File:	\\eccayw0000\Users\ECVillacr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls		
Worksheet:	Hoja2	Last update:	28/05/2009 15:44:52
Reference:	\$E\$42:\$E\$62		

Study variable:	(Set 2)		
Unit:	µg/mL		
File:	\\eccayw0000\Users\ECVillacr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls		
Worksheet:	Hoja2	Last update:	28/05/2009 15:45:16
Reference:	\$F\$42:\$F\$62		

RESULTS	Set 1	Set 2
Mean:	0,3	6.864,6
Median:	0,1	2.598,0
Standard deviation:	0,4	8.848,3
Robust standard deviation:	0,1	2.735,2
Standard error of the mean SEM:	0,1	1.930,9
Robust standard error of the mean SEMrob:	0,0	596,9
Coefficient of variation (CV):	128,8 %	128,9 %
Robust coefficient of variation (CVrob):	107,3 %	105,3 %

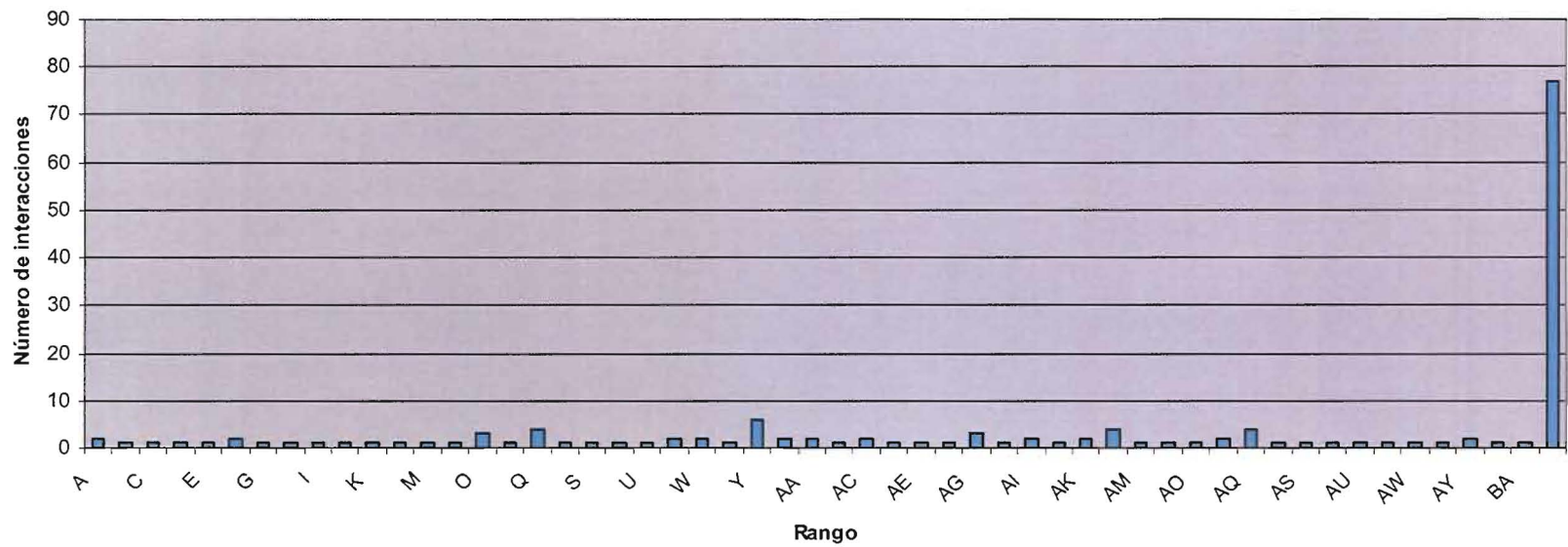
ESTER	Linear regression (least squares)		
Study variable:	Patulina		
Unit:			
File:	\\eccayw0000\Users\ECVillacr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls		
Worksheet:	Hoja2	Last update:	28/05/2009 15:44:52
Reference:	\$E\$42:\$E\$62		
Study variable:			
Unit:	µg/mL		
File:	\\eccayw0000\Users\ECVillacr\PERSONAL\FIash\Patulina\Límites Patulina.xls		
Worksheet:	Hoja2	Last update:	28/05/2009 15:45:16
Reference:	\$F\$42:\$F\$62		

LIST OF VALUES

Nbr.	X	Y
1	0,01287	339,0
2	0,02574	510,0
3	0,06434	1314,0
4	0,12869	2615,0
5	0,25737	4956,0
6	0,64343	12718,0
7	1,28685	25604,0
8	0,01287	323,0
9	0,02574	489,0
10	0,06434	1333,0
11	0,12869	2592,0
12	0,25737	4956,0
13	0,64343	12716,0
14	1,28685	25657,0
15	0,01287	313,0
16	0,02574	507,0
17	0,06434	1348,0
18	0,12869	2598,0
19	0,25737	4956,0
20	0,64343	12681,0
21	1,28685	25631,0

Anexo 7. Prueba de Tuckey. Rangos de significancia entre interacciones de
marcas y lotes

Rangos de significancia entre interacciones de marcas y lotes



Nota. El rango BB corresponde a valores del límite de cuantificación del método.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SECRETARIA

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Cristina Soraya Villacís Reyes, C.I. 1803749645, autor del trabajo de graduación titulado: “Determinación del contenido de Patulina en manzanas, jugos y néctares de manzana, por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa” previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS** en la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:**

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 06 de Junio de 2011

Srta. Cristina Soraya Villacís Reyes

C.I. 180374964-5

