

ASPEC 271: Extração Automatizada de Patulina em Produtos à Base de Maçã



Nota de Aplicação AN0988-01

BENEFÍCIOS DA APLICAÇÃO

As micotoxinas são compostos tóxicos produzidos por fungos que são prejudiciais aos seres humanos e aos animais. A patulina, encontrada em maçãs em decomposição, é um composto regulamentado em muitos países. O monitoramento de segurança alimentar para patulina é essencial para limitar a exposição; no entanto, muitos métodos de limpeza de amostras não removem não eliminam compostos semelhantes, o que pode levar a resultados falso-positivos.

SOLUÇÕES

Automatizamos um método de purificação de amostra por extração em fase sólida (SPE) usando cartuchos AFFINIMIP® empacotados em polímeros molecularmente impressos (MIPs). Este método de purificação isola patulinas de suco de maçã ao mesmo tempo em que remove compostos interferentes. O método automatizado usando um Sistema Gilson ASPEC® 271 é reproduzível, pode funcionar sem supervisão e pode ser aplicado a muitos tipos de produtos de maçã.

MELISSA MULET, DELPHINE DERRIEN, FLORENT ALIX, CELINE PEROLLIER, AND SAMI BAYOUD | AffiniseP; Petite Couronne, France

INTRODUÇÃO

Patulina [4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona] é uma micotoxina produzida por uma variedade de fungos, particularmente espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, que é comumente encontrada em maçãs podres. O teor de patulina é rotineiramente usado como uma medida da qualidade das maçãs usadas na produção. Estudos mostraram que a patulina é genotóxica, resultando em vários países instituindo restrições de patulina em produtos à base de maçã.

Os países-membros da União Europeia estabeleceram níveis máximos permitidos de patulina de 50 µg/kg a 25 µg/kg dependendo do item alimentar, com um limite inferior de 10 µg/kg para produtos destinados ao consumo por lactentes [Regulamento (EC) 1881/2006].¹

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de patulina nos quais uma etapa de limpeza da amostra é necessária e crucial. No entanto, após os métodos clássicos de purificação de amostras, o principal interferente da matriz, 5-Hidroximetilfurfural (HMF), ainda está presente em uma concentração muito alta, impedindo uma determinação quantitativa confiável de patulina.

À medida que as preocupações com a segurança alimentar continuam a crescer, há uma necessidade crescente de melhorar tanto a sensibilidade quanto a especificidade dessa etapa chave de limpeza, bem como fornecer uma solução automatizada para esse processo de extração.

Para alcançar esses objetivos, realizamos extração em fase sólida de patulina em produtos de maçã usando um cartucho SPE com polímero imprimido molecularmente (MIP) que é específico para patulina (AFFINIMIP® Patulin), e automatizamos o processo SPE usando o Sistema Gilson ASPEC 271 (Figura 1).²



Figura 1
Sistema ASPEC® 271

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Todos os reagentes e químicos eram de qualidade ACS ou melhor. A patulina foi obtida da Sigma Aldrich (Fluka). O suco de maçã foi comprado em supermercados locais. Algumas amostras foram adulteradas com patulina para atingir uma concentração final de 25 µg/kg ou 40 µg/kg para permitir a determinação de % de recuperação.

Protocolo de Extração em Fase Sólida (SPE) para Suco de Maçã

Antes do procedimento, 2,5 mL de suco de maçã foram diluídos com 2,5 mL de 2 % (v/v) de ácido acético em água e misturados. O procedimento automatizado de SPE usou cartuchos AFFINIMIP® Patulin de 3 mL selados com tampas de polipropileno Gilson. Os detalhes do método automatizado, realizado em um Sistema ASPEC 271 controlado pelo software TRILUTION® LH, são os seguintes:

1. Condicionar o cartucho SPE com 2 mL de acetonitrila (ACN), depois com 1 mL de água deionizada com uma vazão de 1 mL/min.
2. Adicionar ao cartucho 4 mL da solução contendo a amostra a uma vazão de 0,5 mL/min.
3. Lavar o cartucho com 1 mL de Na-HCO₃ 1 % em água a 1 mL/min.
4. Lavar o cartucho com 2 mL de água deionizada a 1 mL/min, usando um empurrão de ar de 1000 µL para forçar a água a sair pela base do cartucho.
5. Lavar o cartucho com 500 µL de éter dietílico a uma vazão de 1 mL/min.
6. Eluir a patulina com 2 mL de acetato de etila a uma vazão de 0,8 mL/min.

O procedimento de SPE durou aproximadamente 35 minutos.

A fração de eluição foi então evaporada e dissolvida em água contendo 0,1 % de ácido acético. O tempo de evaporação da fração de eluição foi aproximadamente 10 minutos.

Análise

A cromatografia líquida (HPLC) foi realizada em um sistema ThermoFinnigan Spectra com uma coluna Atlantis T3 de 150 mm × 2,1 mm (Waters). A separação foi conduzida usando uma fase móvel de água deionizada/ACN (95/5, v/v) a uma vazão de 0,2 mL/min. O sistema de detecção foi um detector ThermoFinnigan Spectra UV6000LP ajustado para 276 nm. O volume de injeção foi de 100 µL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta nota de aplicação demonstramos a limpeza automatizada de amostras por extração em fase sólida usando cartuchos preenchidos com polímeros imprimidos molecularmente específicos para patulina. O polímero imprimido molecularmente (MIP) é um material sintético com uma rede tridimensional gerada artificialmente capaz de reter especificamente uma molécula alvo. O MIP tem vantagens de ser altamente seletivo e específico, além de ser estável quimicamente e termicamente, compatível com todos os solventes e com bom custo-benefício. Este polímero é usado como técnica poderosa para purificação e pré-concentração de patulina, conforme mostrado na Figura 2.

O método de purificação de amostra foi automatizado em um Sistema ASPEC 271 controlado pelo TRILUTION LH. O sistema ASPEC permite a limpeza de amostras sem intervenção manual e usa SPE por pressão positiva para gerar resultados reproduzíveis. O método automatizado está mostrado na Figura 3.

Figura 2

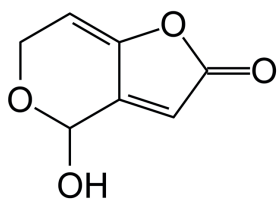
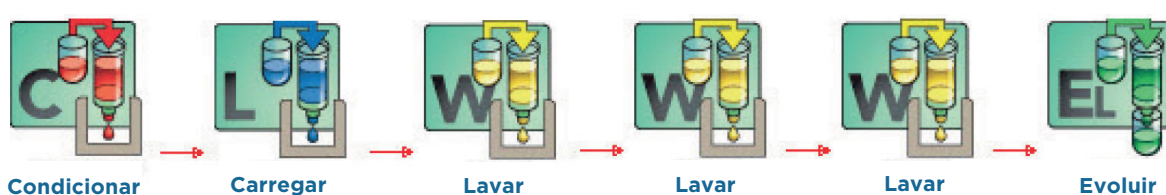


Figura 3



A análise por HPLC foi usada para medir os níveis de patulina nas amostras. A Figura 5 compara os cromatogramas de amostras de suco de maçã (adulteradas com 25 µg/kg de patulina) antes e depois da limpeza com AFFINIMIP Patulin. A Figura 6 mostra dois cromatogramas após a limpeza de suco de maçã adulterado com 40 µg/kg de patulina; os eixos X dos dois cromatogramas foram deslocados para acentuar a reprodutibilidade dos resultados obtidos usando este método.

Este método cumpre os critérios de desempenho para patulina estabelecidos pelo Regulamento CE 401/2006. Esta regulamentação exige valores de recuperação para patulina superiores a 70 % para análises entre 20 e 50 µg/kg e superiores a 50 % para análises abaixo de 20 µg/kg. Como mostrado na Tabela 1, este método automatizado de limpeza com AFFINIMIP Patulin em suco de maçã adulterado em 40 µg/kg atingiu 80 % de recuperação, o que está acima do nível requerido pelo regulamento da CE.

Em conclusão, este método é bem adequado para a análise de patulina em produtos derivados de maçã. Além disso, este protocolo pode ser facilmente automatizado com o Gilson ASPEC 271. O sistema Affinimip SPE foi adotado por mais de 50 clientes, principalmente em laboratórios industriais de controle de qualidade, em 20 países diferentes. A performance dos cartuchos AFFINIMIP Patulin foi confirmada e ampliada por meio de testes com diversos produtos de maçã e diferentes concentrações de patulina adicionada.

CONCLUSÕES E BENEFÍCIOS

- O uso de um cartucho AFFINIMIP Patulin SPE é uma ferramenta simples, rápida, sensível e seletiva para a extração de patulina de produtos de maçã.
- O método de purificação SPE usando cartuchos AFFINIMIP Patulin foi automatizado com o ASPEC 271, proporcionando resultados reproduzíveis.
- A recuperação de patulina de suco de maçã foi de 80 %, bem acima do nível exigido pela regulamentação da CE.

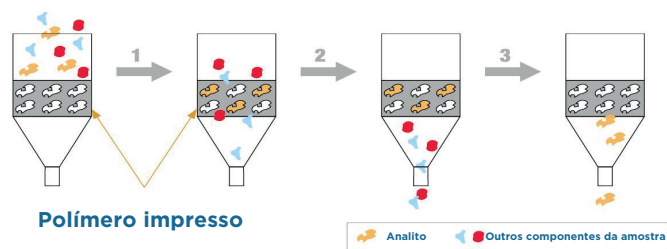


Figura 4
Processo de Purificação (Limpeza) com AFFINIMIP® Patulin

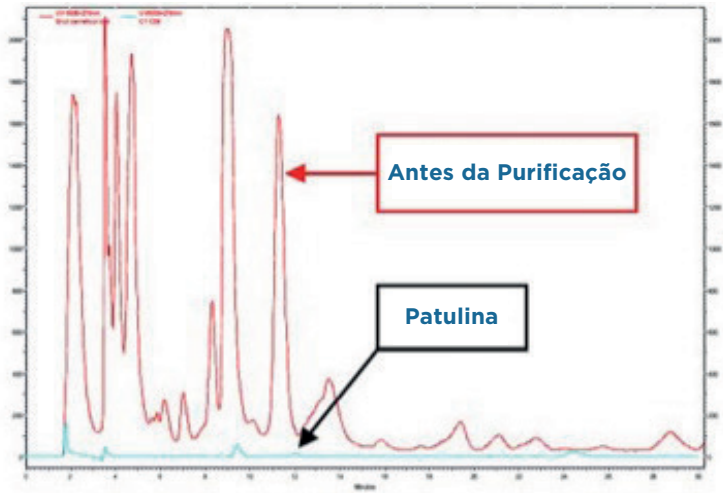


Figura 5
Cromatogramas de suco de maçã contendo 25 µg/kg de patulina, antes (Vermelho) e após (Azul) a purificação com AFFINIMIP® Patulin

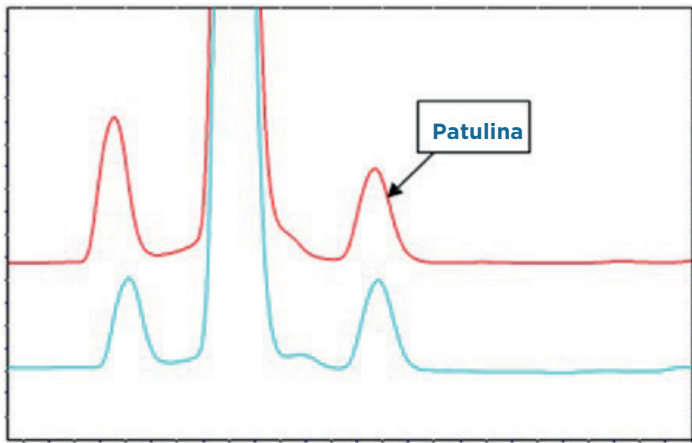


Figura 6
Cromatogramas obtidos após a purificação com AFFINIMIP® Patulin de um suco de maçã fortificado com 40 µg/kg (testado duas vezes, vermelho e azul) utilizando um Sistema ASPEC® 271

Tabela 1
Recuperação de patulina em um nível de contaminação de 40 µg/kg em suco de maçã após a purificação com AFFINIMIP® Patulin utilizando o Sistema ASPEC® 271

Concentração de Patulina (ng/mL)	Recuperações (%)	(%) RSD
40 (n=2)	80	NA

REFERÊNCIAS

Marcas Registradas

Todos os nomes de produtos e empresas são marcas comerciais™ ou marcas registradas® de seus respectivos proprietários. O uso das marcas neste documento não implica qualquer afiliação com ou endosso pelos proprietários das marcas.

Aviso

Esta nota de aplicação foi produzida e editada utilizando informações disponíveis no momento da publicação. Esta nota de aplicação está sujeita a revisões sem aviso prévio.

INFORMAÇÕES PARA COTAÇÃO

Descrição	PN	Quantidade
GX-271, ASPEC, COM VERITY 4060 SINGLE	2614007	1
SERINGA, 10 mL	25025345	1
KIT DE CONEXÃO, GX241/GX271 ASPEC 10 mL	2644701	2
SONDA, NÃO-SP 221X1.5X1.1, BV TAPER	27067374	1
ESTAÇÃO DE ENXÁGUE, GX 175 mm	26034551	1
ESTAÇÃO DE ENXÁGUE, GX 175 mm FC	26034555	1
KIT DE MONTAGEM GDE, SONDA ASPEC 1.5MM GX-271	26046228	1
KIT DE CONEXÃO, GX241/GX271 ASPEC AR/ GÁS	2644703	1
REGULADOR DE PRESSÃO SPE ASSY 0-30 psi	25051376	1
MONTAGEM DE PROTEÇÃO, GX27X	2604706	1
LOCALIZADOR 5 20 SÉRIE, GX-271	26041033	1
SUPORTE, CÓDIGO 343 80 13x100 mm TUBOS	260440025	1
KIT DE ACESSÓRIOS DEC, 3 mL GX ASPEC	2604702	1
LICENÇA TRILUTION LH 4.0, VITALÍCIA	21063024	1
SOFTWARE GILSON, USB	21060005	1