



**PROCESAREA INOVATIVĂ, ECO-DURABILĂ ȘI AMBALAREA
PRODUSELOR DIN FRUCTE DE PĂDURE ECOLOGICE CU
VALOARE NUTRIȚIONALĂ ÎMBOGĂȚITĂ**



EcoBerries

RESPONSABIL PROIECT:

Prof.univ.dr. MONA ELENA POPA

CONTRACT NR. 1 / 2015

PROCESAREA INOVATIVĂ, ECO-DURABILĂ ȘI AMBALAREA PRODUSELOR DIN FRUCTE DE PĂDURE ECOLOGICE CU VALOARE NUTRIȚIONALĂ ÎMBOGĂȚITĂ (EcoBerries)

Contract ERA NET: 1/2015

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

Etapa 4. - Siguranța produselor pe bază de fructe de pădure ecologice

Activitatea IV.1 Determinarea de micotoxine în produsele uscate sau semiuscate realizate pe bază de fructe de pădure ecologice

Activitatea IV.2 Diseminare rezultate etapa IV

Data de finalizare a etapei: 15.03.2018

ACTIVITATEA 4.1 Prezentarea rezultatelor determinării de micotoxine în produsele uscate sau semiuscate pe baza de fructe de pădure ecologice

ANALIZA PATULINEI DIN PROBE LIOFILIZATE DE FRUCTE, PRIN METODA HPLC-DAD

Introducere

Micotoxinele sunt metaboliți ai fungilor, ce sunt capabili să aibă efecte toxice acute sau cronice (cancerigene, mutagene, teratogene) asupra animalelor sau oamenilor. Patulina este o micotoxina produsă de către mai multe specii de fungi, cum ar fi *Penicillium*, *Aspergillus* și *Byssoschlamys*, dar cea mai relevantă specie producătoare de Patulina este *Penicillium expansum*. Patulina a fost descoperită ca și contaminant în fructe și legume, dar principala sursă de producere a acestei micotoxine este reprezentată de merele mucegaite. Inițial s-a crezut că patulina are un efect terapeutic, din cauza proprietăților ei antimicrobiene, dar în anul 1960 aceasta a fost reclasificată ca fiind o micotoxina din cauza toxicității ei [1].

Investigațiile efectuate au arătat că patulina are efecte mutagene, neurotoxice, imunotoxice, genotoxice pe rozătoare și diferite efecte asupra tractului gastro-intestinal, cum ar fi distensia, ulcerul și sangerări [2]. Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului (IARC-Geneva, Elveția) a clasificat patulina în grupa a 3-a (Nu se clasifică în ceea ce privește carcinogenitatea sa la om) deși sunt câteva

studii care releva potentialul efect cancerigen al acesteia asupra omului [3]. Organizatia Alimentului si Agriculturii (FAO)/ JEFCA - din cadrul Organizatiei mondiale a sanatatii, Comitetul expertilor in aditivi alimentari din intreaga lume a propus ca doza maxima tolerabila (PMDTI) de patulina pentru consumul uman sa fie 0.4 µg/kg corp si zi, acest lucru fiind bazat pe mai multe teste si studii asupra toxicitatii si efectului carcinogenic al patulinei [4]. .

Patulin appears mainly in moldy fruits. Although the presence of mold does not necessarily imply the presence of patulin in fruit, it indicates the possibility. In some circumstances, the inside development of molds may be due to insects or other invasions of healthy tissues, leading to the appearance of patulin in fruit, which externally appears to be unaffected. However, patulin may occur in hit fruits after the storage under controlled atmosphere and exposure to the environmental conditions, with or without fruit pulp alteration. Washing fruit or removing of moldy tissue immediately before pressing will not remove patulin in the fruit, because it diffuses in the apparently healthy tissue [5].

Patulina se gaseste in general in fructele mucegaite. Deși prezența mucegaiului nu implică neapărat prezența patulinei în fructe, aceasta indică posibilitatea prezentei ei. În unele circumstanțe, dezvoltarea internă a mucegaiurilor poate fi cauzată de insecte sau traume asupra țesuturilor sănătoase, ceea ce poate duce la apariția patulinei în interiorul fructului, care, la suprafața pare sanatos. Cu toate acestea, patulina poate apărea la expunerea fructelor la mediul ambiental, după depozitarea lor în atmosfera modificată, cu sau fără afectarea pulpei fructei. Spălarea și curățarea partilor mucegaite ale fructelor înainte de stocare nu va îndepărta patulina din fruct, aceasta difuzând în țesutul aparent sanatos [5].

Conform IUPAC, patulina are formula chimică 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-unu fiind o lactona heterociclică nesaturată cu masa moleculară de 154 fiind stabilă în mediu acid dar instabilă în mediu alcalin. Patulina este incoloră, cu un punct de topire la 110 grade Celsius. Absorbanta maximă la UV este la 276 nm [6, 7]. Patulina este foarte solubilă în apă și în majoritatea solventilor organici. Aceasta este stabilă când este diluată în acizi și rezistentă la temperaturi de până la 125 grade Celsius, la valori ale pH-ului între 3.5 – 5.5 [8].

Materiale si metode

Probe

Au fost supuse analizei pentru determinarea patulinei 31 de probe din Italia și 2 probe din Suedia. Toate afinele proaspete din Italia au fost tăiate în două bucăți ca mai apoi să fie expuse la un tratament cu ultrasunete la 21 kHz pentru 30 de minute în trei medii diferite:

- ✓ SA – 61.5 % (w/w) sucroza
- ✓ STV – 30 % (w/w) sucroza cu 0.1 % glicozide de stevie
- ✓ T- 40 % trehaloza

După tratamentul cu ultrasunete deshidratarea osmotică a fost făcută la 72 ore la temperatura de 40°C în aceste soluții (e.g. CUT_30US-SA, CUT_30US-STV, CUT_30US-T). Ca probă de control, au fost folosite probe ce nu au fost tratate cu ultrasunete, ele fiind doar deshidratate osmotic în cele trei soluții (e.g. CUT-SA, CUT-STV, CUT-T). Aceste probe au fost depozitate la 10°C pentru 1,2,4 și 8 săptămâni (T₁, T₂, T₄ și T₈). Proba martor obținută imediat după tratamentul de deshidratare osmotică a fost notat cu T₀.

Metoda de determinare a Patulinei prin HPLC-DAD

Materiale si reactivi

Acid acetic glacial pentru HPLC, acetat de etil pentru HPLC și metanol pentru HPLC au fost achiziționate de la SIGMA-ALDRICH. Aceto-nitril Optigrade a fost achiziționat de la LGC Standards și apa ultrapura a fost obținută în laborator folosind un sistem de ultrapurificare a apei ELGA. Pentru curbele de calibrare a fost folosită patulina standard (5 mg, puritate = 99.5%) de la firma Sigma-Aldrich (St Louis, MO. USA).

Coloane C.U. Patulin MycoSep® 228 AflaPat (Romer Labs) au fost utilizate pentru purificarea extractului probei.

Pregătirea probelor

Probele luate în studiu au fost măcinate utilizând moara Retsch. Într-un flacon de centrifugă de 50 mL se cântăresc la balanta analitică cu o precizie de 0,0001 g, 0,5 probă și se adaugă 20 mL apă ultrapură. După, proba a fost vortexată (Vortex Heidolph) timp de 90 de minute, apoi centrifugată timp de 50 minute la 9000 rotații/minut la temperatura de 5°C. 4 mL din supernatant și 21 mL acetonitril se introduc într-un flacon brun și se vortexează timp de 15 minute, pentru extracția patulinei în acetonitril. Extractul probei a fost purificat utilizând o coloană C.U. Patulin MycoSep® 228 AflaPat. Extractul purificat al probei (4 mL) a fost evaporat aproape de sec, sub curent de azot, la temperatura de 40°C. Reziduul a fost dizolvat în 1 mL soluție acetonitril:apă (cu pH = 4) = 10:90 (v/v) și a fost supus analizei HPLC.

Condițiile de funcționare și parametrii metodei HPLC-DAD pentru determinarea patulinei

Un HPLC (*Surveyor Plus -Thermo Finnigan*) a fost folosit în analize (indepartarea gazelor în vid, pompa cuaternară, autosampler cu control al temperaturii PELTIER, coloana de comportament cu control al temperaturii PELTIER, Detector Array Diode, software ChromQuest 4.2 folosit la analiza datelor rezultate). Procesul de separare a compusilor a avut loc la 25 grade Celsius, pe coloana C18 (Hypersil GOLD 150 x 4 mm, 5 μm) împreună cu o coloană Hypersil Gold (10 x 4 mm, 5 μm). Compoziția fazei mobile a fost apă:acetonitril (95:15 v/v). Volumul injectat a fost de 25 μL, rata de curgere a fazei mobile fiind de 1.0 mL/minut iar lungimea de undă pentru detecție a fost de 276 nm. Identificarea vârfurilor s-a bazat pe timpul de retenție, informațiile spectrofotometrice și tehnica de lucru. Căntărirea picurilor s-a bazat pe utilizarea unor metode externe, folosind curbe de calibrare.

Rezultate și discuții

Curba de calibrare

Pentru curba de calibrare a fost folosită patulina standard în forma de cristale (5 mg). Proba standard a fost dizolvată în acetat de etil și pe urma soluția obținută a fost diluată în etanol. Concentrația Patulinei în soluție (10 μg/mL) a fost testată pe baza spectrului maxim de absorbantă cu valori între 250nm și 350 nm (figura 1). Calculul a fost făcut pe baza ecuației 1:

$$\rho_{pat} = A_{max} \times M \times 100 / \epsilon \times d \quad [1]$$

unde:

ρ_{pat} – concentrația soluției de patulina, exprimate în $\mu\text{g/mL}$

A_{max} – absorbția corespunzătoare a curbei de absorbție maximă (276 nm)

M – greutatea moleculară a patulinei ($M = 154.12 \text{ g/mol}$)

ϵ – coeficientul molar relativ de absorbție al patulinei în etanol (în acest caz $1460 \text{ m}^2/\text{mol}$, date prezentate în AOAC Official Methods, 1995, Natural Toxins, Patulin, 49.6.01. C(d))

δ – lungimea căii optice a cuvei de cuarț în cm

În acest caz, soluția a prezentat $A_{max} = 0.9479$ și concentrația soluției a fost $\rho_{pat} = 10.00 \mu\text{g/mL}$.

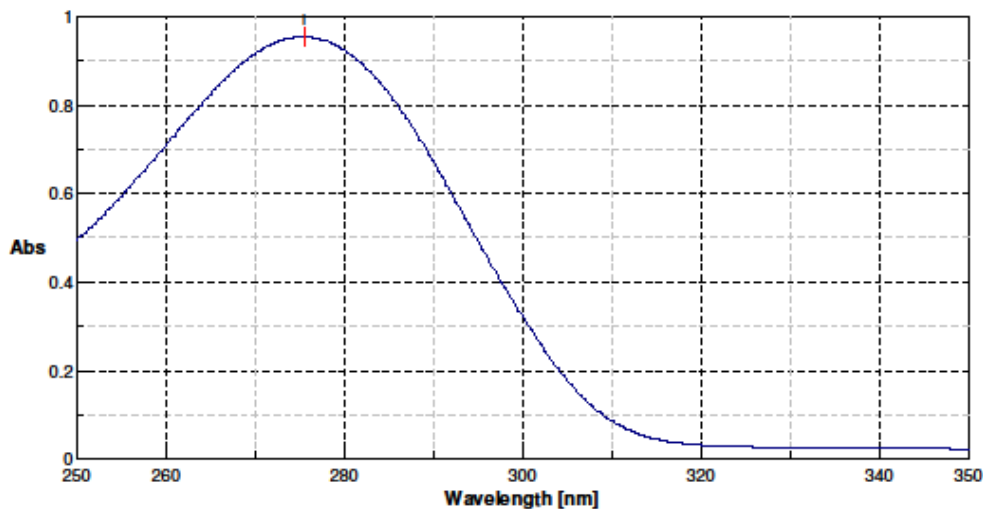


Figure 1. Spectrul soluției alcoolice de patulina

Pentru curba de calibrare s-au utilizat șapte niveluri standard de patulină (cu trei injecții repetate din fiecare nivel), cu intervalul de concentrație de $6,25 \mu\text{g} / \text{l}$ până la $400 \mu\text{g} / \text{l}$. Valori de regresie liniară obținute: ecuația de regresie liniară: $y = 696752x - 430.897$; coeficient de regresie

$R^2 = 0.999994$.

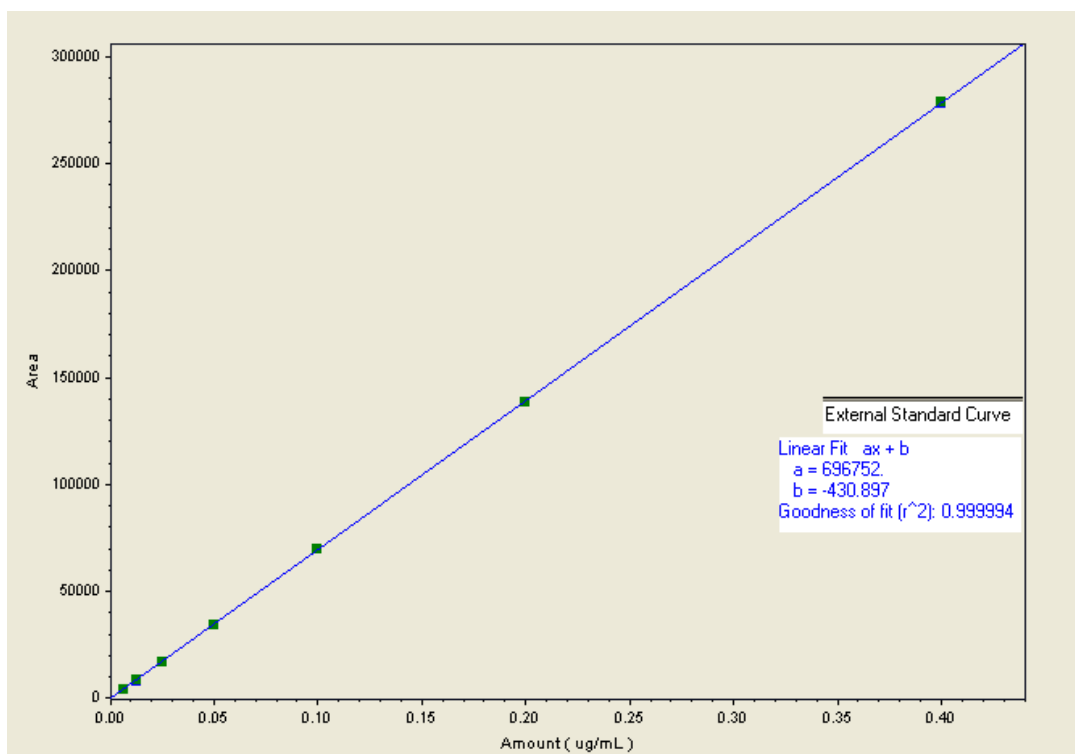


Figure 2. Curba de calibrare a Patulinei

Limita de detecție a metodei este de 3.49 $\mu\text{g/L}$, iar cea de cuantificare 11.64 $\mu\text{g/L}$.

Probele din Italia studiate (figurile 3 - 7) au fost supuse analizei pentru determinarea patulinei, conform metodei descrise. În figurile 8 și 9 sunt prezentate probele cu afine din Suedia. În figura 10 sunt prezentate aspecte din metoda de analiză, în cazul probelor T_0 (probe după vortexare timp de 90 min, respectiv după centrifugare la 5°C, timp de 50 min.; purificarea extractului probei utilizând coloane C.U. Patulin MycoSep® 228 AflaPat și evaporarea extractului purificat al probei sub azot la 40°C).

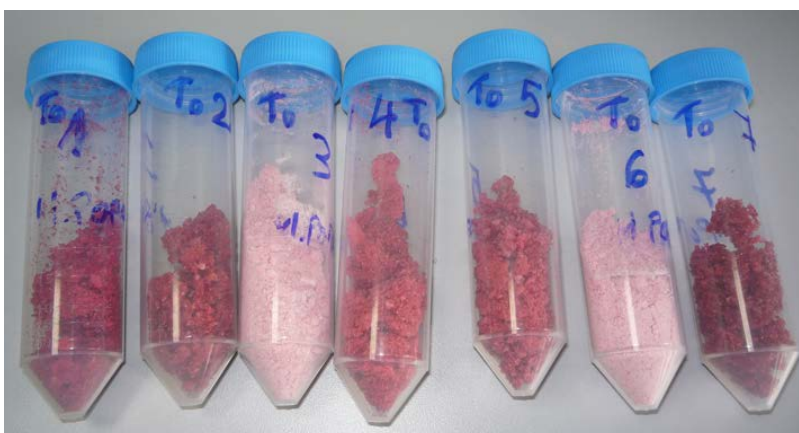


Figure 3. Probele T_0 după măcinare (1- Merisoare proaspete; 2 - T_0 Cut_SA; 3 - T_0 Cut_30_US_T; 4 - T_0 Cut_US_30_SA; 5 - T_0 Cut_US_30_STV; 6 - T_0 Cut_T; 7- T_0 Cut_STV)



Figure 4. Probele T₁ după măcinare (1 – T₁ Cut_SA; 2-T₁ Cut_US_T; 3-T₁ Cut_T; 4-T₁ Cut_US_STV; 5-T₁ Cut_STV; 6-T₁ Cut_US_SA)



Figure 5. Probele T₂ după măcinare (1 – T₂ Cut_SA; 2-T₂ Cut_T; 3-T₂ Cut_STV; 4-T₂ Cut_US_30_STV; 5-T₂ Cut_US_30_T; 6-T₂ Cut_US_30_SA)



Figure 6. Probele T₄ după măcinare (1 – T₄ Cut_STV; 2-T₄ Cut_SA; 3-T₄ Cut_T; 4-T₄ Cut_US_30_STV; 5-T₄ Cut_US_30_SA; 6-T₄ Cut_US_30_T)



Figure 7. Probele T₈ după măcinare (1 – T₈ Cut_T; 2-T₈ Cut_SA; 3-T₈ Cut_STV; 4-T₈ Cut_US_30_T; 5-T₈ Cut_US_30_SA; 6-T₈ Cut_US_30_STV)

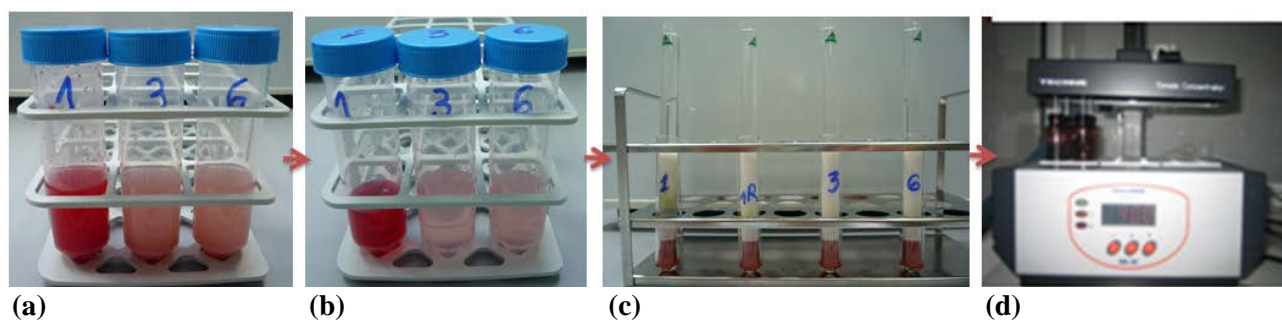


Figure 10. Aspecte din cadrul metodei de determinare a patulinei (Proba: 1- Merisoare proaspete; 2 - T₀ Cut_SA; 3 - T₀ Cut_30_US_T) (a) – probe după vortexare timp pde 90 min; (b) – probe după centrifugare la 5°C, timp de 60 min.; (c) – purificarea extractului probei utilizând coloane C.U. Patulin MycoSep® 228 AflaPat; (d) – evaporarea extractului probei sub azot la 40°C

Concluzii

În urma analizei prin cromatografie lichida de înaltă performanță (HPLC-DAD) a extractelor purificate și concentrate, ale probelor luate în studiu, **patulina nu a fost detectată.**