

ANÁLISIS DE TOXINA T2 EN CEREALES MEDIANTE INSERCIÓN DIRECTA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Ma. del Pilar Landa Nava¹, Luis Barbo Hernández Portilla¹, Cesar Mateo Flores Ortiz¹ y Martín David Manzanares Gómez². 2016. Los Avicultores y su Entorno 84, BM Editores.

1.-Laboratorio de Biogeoquímica, FES Iztacala, UNAM.

2.-División de Nutrición Animal, HELM de México, S.A.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Micotoxicosis](#)

RESUMEN

En el presente trabajo se implementó una técnica de cuantificación de toxina-T2 basada en la Inserción Directa al Espectrómetro de Masas. El método desarrollado se comparó en sus parámetros de calidad analítica de sensibilidad y recuperación con las técnicas de Cromatografía en Capa Delgada (CCD), Cromatografía de Gases acoplada a Masas (CG-EM) en sus diferentes modos de análisis de Barrido Completo y de Espectrometría de Masas/Masas (EM/EM). Para validar el método desarrollado se utilizaron muestras de referencia de sorgo contaminado con concentraciones conocidas de toxina- T2.

Para los análisis de EM/EM se evaluaron los fragmentos 185, 304 y 364 m/z, los cuales fueron confirmados mediante la inspección del patrón de fragmentación de la toxina-T2. De los fragmentos seleccionados el fragmento 364 m/z fue el que mostró la mayor sensibilidad por su especificidad e intensidad relativa. Los resultados obtenidos muestran que la técnica de Inserción Directa es la metodología con mayor sensibilidad, la cual es $45 \mu\text{g L}^{-1}$ y un tiempo de proceso de 65 min, en contraste, los ensayos con la técnica CG-EM mostraron un intervalo de sensibilidad de $50\text{-}200 \mu\text{g L}^{-1}$ y un tiempo de proceso aproximado de 2 horas 30 min en sus diferentes modos de análisis.

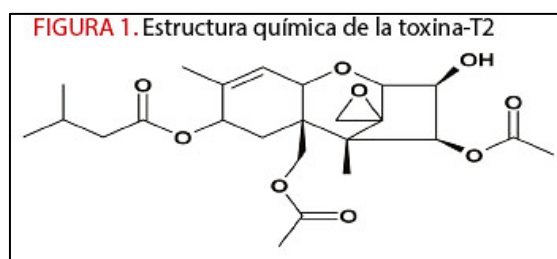
La técnica que presentó la sensibilidad más baja fue CCD con $900 \mu\text{g L}^{-1}$ y un tiempo de 155 min de proceso. Con base en los resultados obtenidos, se discute la utilidad de la técnica de Inserción Directa como una alternativa adecuada para la cuantificación de toxina-T2 en cereales.

PALABRAS CLAVE: Toxina-T2, *Fusarium sporotrichoides*, Micotoxinas, Espectrometría de Masas. Inserción directa.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por diferentes hongos, de los cuales, los pertenecientes al género *Fusarium*, representan una de las preocupaciones más importante en la producción pecuaria.

Entre los tricotricenos de mayor importancia se reconoce a la toxina-T2 (Figura 1), la cual pertenece al grupo de los terpenoides, está clasificada dentro del grupo A y se considera una micotoxina no macrocíclica, producida por especies de hongos como: *Fusarium tricinctum*, *F. nivale*, *F. pose*, *F. solani*, *Trichoderma lignorum*, *F. sporotrichoides*.



Una de las primeras técnicas usadas para la identificación de toxina-T2 fue la Cromatografía en Capa Delgada (Trenholm, 1983; Lin *et al*, 1998; Gore *et al*, 1984), ésta se usó para hacer sólo identificación cualitativa, ya que se requieren concentraciones elevadas para su detección y por tanto su utilidad es limitada. Por otro lado, la toxina-T2, no tiene cromóforos en su estructura, por lo que no se puede detectar fácilmente mediante espectrofotometría de Ultra Violeta- visible; en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR-UV) se presenta

este mismo problema (Langseth y Rundberget, 1998; Jiménez *et al.*, 2000, Jiménez *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Krska, 1998).

La técnica de CLAR-UV, se utiliza principalmente para el grupo B de los tricoticenos, los cuales presentan carbonilos conjugados que son visibles al UV y sólo se usa en el grupo A como la toxina-T2 cuando se tienen muestras con altas concentraciones. Este método se realiza en fase inversa donde la fase móvil es una mezcla de acetonitrilo:agua y se detectan las Toxinas del grupo A a una longitud de onda de 200 nm, donde se ha observado que la señal del solvente es muy intensa para eliminarse del fondo, por lo que no se alcanzan a definir los picos con claridad. Respecto a la Electroforesis Capilar de Zona, se tiene la desventaja del lavado constante de la columna capilar y esto hace que la técnica no sea reproducible, además de que el método de detección es también por UV-Visible, y por lo tanto presenta la misma limitación de detección por falta de cromóforo en la molécula (Langseth y Rundberget, 1998).

Por otro lado, se disponen de métodos inmunológicos como la técnica de ELISA para el análisis de toxina-T2 (Krska, 1998, RIDASCREEN®FAST T-2 Toxin, R-Boipharm GmbH, Darmstadt, Germany, 1998; Lin *et al.*, 1998), sin embargo, se presentan problemas relacionados con la técnica de extracción polar, en la cual, la toxina-T2 no es totalmente soluble, adicionalmente, todos los tricoticenos tienen una estructura química muy similar por lo que la unión con el anticuerpo no es específica y da como resultado reacciones cruzadas, esto descarta la técnica cuando se requiere detectar cantidades del orden de picogramos y cuando se tiene una muestra con varios tipos de micotoxinas, ya que se pueden producir falsos positivos.

Finalmente la Cromatografía de Gases se considera como una de las mejores opciones para el análisis y la cuantificación de las toxina-T2, este sistema se puede combinar con Detector de Ionización de Flama (Jiménez *et al.*, 2000; Schothorst y Jekel, 2001; Gore *et al.*, 1984), Detector de Captura de Electrones (Kotal *et al.*, 1999; Krska, 1998; Radová *et al.*, 1998; Rizzo *et al.*, 1986). Finalmente se encuentra la Detección por Espectrometría de Masas (Tanaka *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1998; Trenholm *et al.*, 1983; Mossoba *et al.*, 1996; Onji *et al.*, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Kotal *et al.*, 1999; Schollenberger *et al.*, 1998), el cual se ha reconocido como el más sensible y resolutivo en la identificación y cuantificación de toxina-T2. No obstante de las ventajas del análisis de toxina-T2 mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) hasta el momento no se han evaluado las ventajas de la inserción directa de la muestra al analizador de masas, lo cual se justifica por el elevado peso molecular de la toxina-T2 (466 g mol⁻¹), permitiendo obtener fragmentos moleculares específicos para su identificación y cuantificación diferencial cuando están presentes en una mezcla compleja, como lo es el extracto de cereales o alimentos balanceados.

Con base en lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo, se plantea una metodología para el análisis de muestras de sorgo basado en la Inserción Directa al Espectrómetro de Masas para la identificación y cuantificación de la toxina-T2; validando los resultados cuantitativos obtenidos con métodos analíticos de CCD, ELISA, CG-EM y muestras de referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de toxina-T2.

Para la obtención de toxina-T2 se sembró el hongo *Fusarium sporotrichoides* (Cepa con alta producción de toxina-T2 registro No. NRLL3299 ATTC) en 50 ml de medio de cultivo de Czapek peptona líquido en matraces erlenmeyer de 150 mL. Los cultivos se incubaron a 27-29°C durante 20 días (Jiménez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2000).

ANÁLISIS DE TOXINA-T2 POR CCD

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA. Se tomó una muestra de 250 g de sorgo y se homogenizó hasta malla 20.

En 5 g de la muestra obtenida, se adicionaron 25 mL de metanol y se agitaron durante 10 min a 150 rpm en el agitador orbital. El extracto obtenido se filtró con papel Whatman No. 1 y el filtrado se depositó en un matraz bola de 100 mL, el cual se evaporó a sequedad a presión reducida y se empleó acetona para el arrastre de la humedad. Finalmente, el residuo se resuspendió en 500 µL de metanol y fue utilizado para el análisis de toxina-T2 mediante Cromatografía en Capa Delgada (Langseth y Rundberget, 1998; Lin *et al.*, 1998).

CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA. Se dispensaron 5 µL del estándar de toxina-T2 1000 µg L⁻¹ en una placa de sílice gel de 3 x 6 cm. Posteriormente, en la misma placa, se colocaron 10 µL del extracto de la muestra obtenida según se describe arriba. La placa fue eluída empleando una mezcla de disolventes de benceno:acetona (3:2 v/v). Posteriormente, la placa fue revelada en de solución de p-anisaldehído, que contenía 0.25 g de p-anisaldehído disueltos en 100 mL de metanol:ácido acético:ácido sulfúrico (85:15:5 v/v) (Trenholm, 1983; Lin *et al.*, 1998; Gore *et al.*, 1984). La identificación de la toxina-T2 se llevó a cabo por comparación de los valores de R_f de las manchas de la muestra y el estándar auténtico SIGMA, posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de la toxina-T2 por comparación del estándar y muestras de sorgo mediante un transiluminador Alpha Innotech y un Software analizador de imágenes AlphaImager™ 2000 3.3.

ANÁLISIS DE TOXINA-T2 POR CG-EM

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA. La extracción de la toxina-T2 se realizó de acuerdo a técnicas previamente publicadas (Radová *et al*, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Schothorst y Jekel, 2001; Krska, 1998).

DERIVATIZACIÓN. La derivatización de la toxina-T2 se llevó a cabo de acuerdo a publicaciones previas empleando trimetilsililimidazol (Tanaka *et al*, 2000; Schollenberger *et al*, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Langseth y Clasen, 1992; Schothorst y Jekel, 2001; Kotal *et al*, 1999; Gore *et al*, 1984; Mossoba *et al*, 1996; Trenholm, 1983; Jiménez *et al*, 2000; Radová *et al*, 1998; Rizzo *et al*, 1986; Krska, 1998).

CROMATOGRAFÍA DE GASES. El equipo de CG empleado fue un sistema Finnigan Mat GCQ equipado con una columna capilar de 30 m de longitud x 0.32 mm de espesor y 0.25 mm de diámetro interno con fase estacionaria de dimetilpolisiloxano DB-1 (J. & W. Scientific).

ANÁLISIS DE TOXINA-T2 INSERCIÓN DIRECTA-EM

Se colocaron 2 μL de la muestra obtenida para el análisis de CG-EM en el filamento del inserto directo del Espectrómetro de Masas. La desorción térmica se llevó a cabo utilizando rampas de calentamiento de 0 a 1000 mA con velocidades de 2 a 50 mA seg^{-1} . Las condiciones del detector de masas fueron las siguientes: temperatura de la fuente de ionización a 180°C, Modo Barrido Completo y fragmentación secundaria de los iones m/z 185, 304 y 364, intervalo de 50-650 m/z, Polaridad positiva (Langseth y Rundberget, 1998; Tanaka *et al*, 2000; Schollenberger *et al*, 1998; Mossoba *et al*, 1996; Rizzo *et al*, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

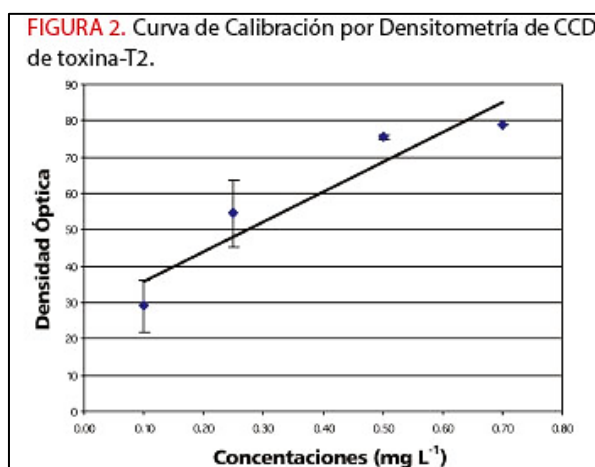
En el presente trabajo se evalúa la mejor metodología para el análisis de la toxina-T2. Los resultados que a continuación se describen, fueron ensayos con la toxina-T2 por diferentes técnicas de análisis. La descripción y discusión de estos resultados hacen énfasis en la comparación de las diferentes metodologías para definir la mejor técnica de identificación y cuantificación de la toxina-T2.

Obtención de la toxina-T2

Para la producción de toxina-T2 fue necesario activar la cepa de *Fusarium sporotrichoides* en medio sólido PDA durante 5 días, obteniendo un crecimiento considerable; el cual se observó como un cultivo blanco, esponjoso de aspecto algodonoso que produjo un pigmento rojo intenso después de dos semanas de incubación. El cultivo activado fue empleado para la producción de toxina-T2 en medio líquido CZAPEK y, a partir de este medio se extrajo la toxina-T2 después de un mes de incubación obteniéndose 91.3 mg de extracto crudo, el cual presentó apariencia de un sólido café claro de consistencia viscosa.

Cuantificación de toxina-T2 mediante CCD

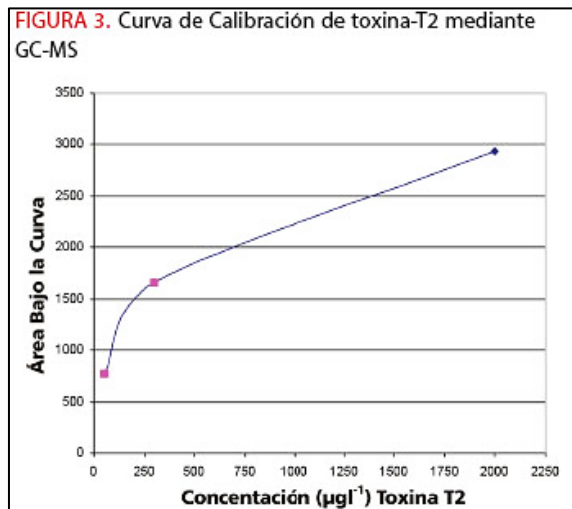
La curva de calibración de toxina-T2 mediante CCD se realizó en un intervalo de concentración de 0.1 a 0.7 mg mL^{-1} de estándar puro, las placas obtenidas fueron analizadas en el densitómetro "Alpha Innotech" y los datos correspondientes a la curva de calibración se pueden observar en la Figura 2, en la cual se observa que el método es lineal hasta niveles de 0.5 mg mL^{-1} ($R^2=0.91$) y se registra sensibilidad del método a 0.1 mg mL^{-1} .



No obstante de los resultados anteriores, al analizar muestras de referencia de sorgo contaminado a concentraciones de 0.44 y 0.99 mg mL^{-1} solamente se registró la presencia de la toxina en la de mayor concentración, lo cual indica que en extractos complejos como los obtenidos de granos la sensibilidad del método se reduce.

Cuantificación de toxina-T2 mediante CG-EM

Para la cuantificación de la toxina-T2 derivatizada mediante la técnica de CG-EM en modo de Barrido Completo, se realizó una curva de calibración con un estándar de concentración conocida de 50 a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En la Figura 3 se presenta la curva de calibración obtenida, donde se observa que la linealidad del método posiblemente se encuentra en el intervalo de 50 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ y la sensibilidad del método está alrededor de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

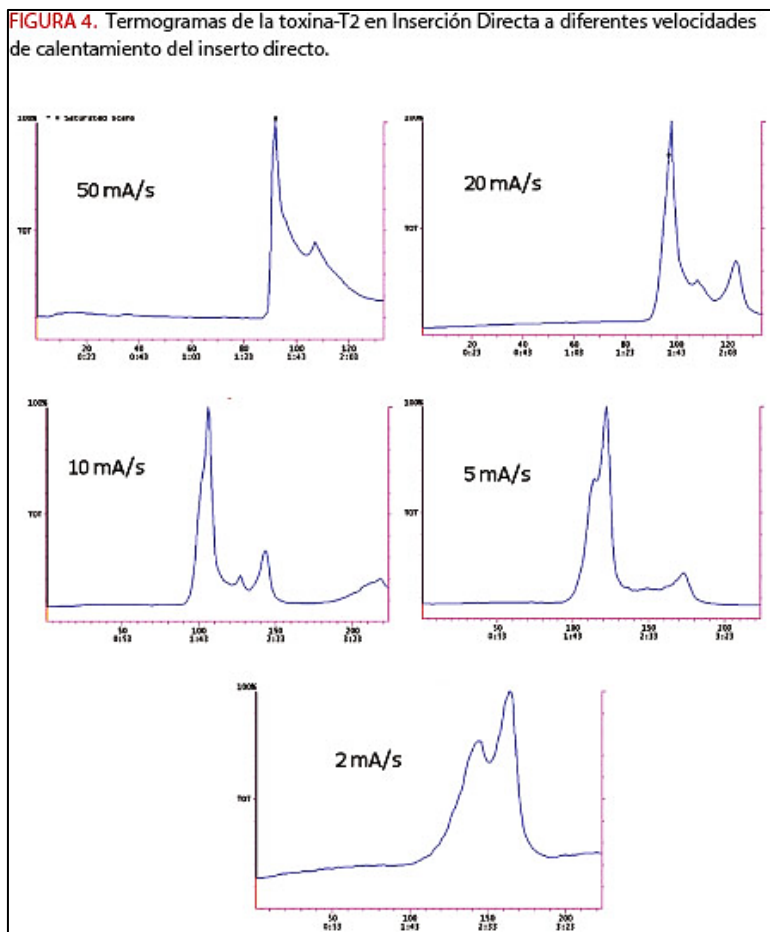


De las muestras reales de sorgo analizadas por esta metodología no se obtuvieron resultados, ya que no se registró la presencia de la toxina-T2 en los cromatogramas correspondientes. Probablemente esto se debió a la reacción de ineficiente derivatización, ya que al llevar a cabo este tipo de reacción en una mezcla heterogénea como es el extracto de granos de sorgo, es posible que reaccionen más componentes nucleofílicos consumiendo el derivatizador y generando gran variedad de compuestos que no permiten una adecuada separación en el cromatograma.

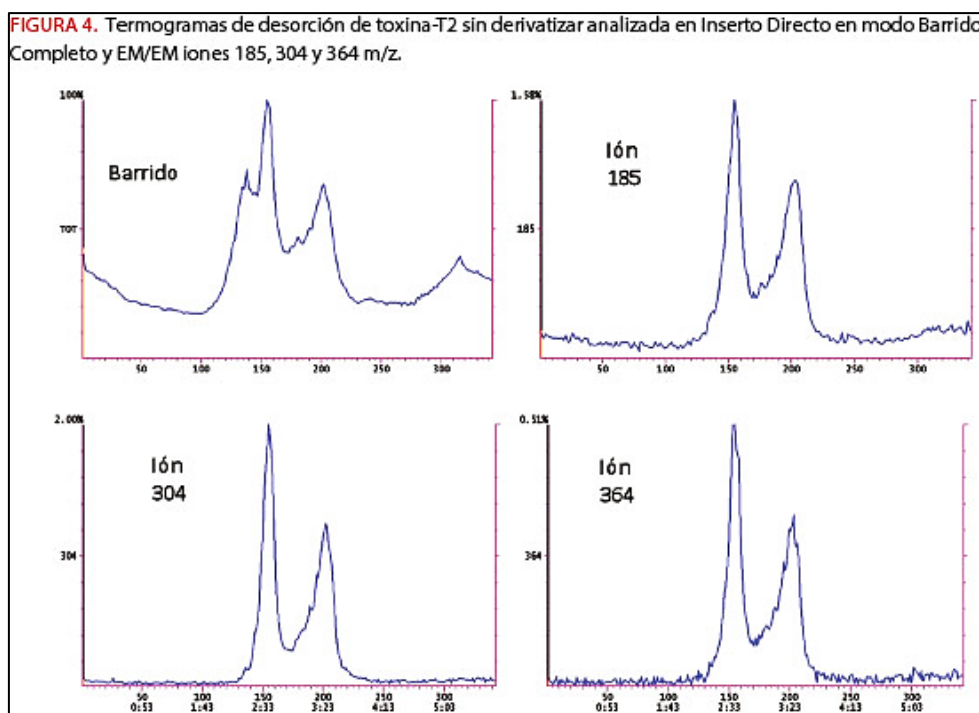
Cuantificación de la toxina-T2 sin derivatizar por Inserción Directa-EM.

Para el análisis de la toxina-T2 mediante inserción directa en Espectrómetro de Masas, inicialmente se determinó la rampa de temperatura óptima para la desorción de la muestra en la cámara de ionización. En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos con diferentes velocidades de calentamiento del filamento del inserto directo, las cuales se variaron en un intervalo de 2 a 50 mA seg^{-1} , se puede observar que la mezcla presente en la muestra analizada se resuelve en forma óptima con una velocidad de 5 mA seg^{-1} .

Una vez establecida la velocidad óptima para el análisis de toxina-T2 mediante el Inserto Directo del Espectrómetro de Masas, se procedió a la cuantificación de muestras de estándar de toxina-T2 y de muestras de sorgo de referencia conteniendo niveles de toxina en un rango de 18 a 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$, en los modos de Barrido Completo y EM/EM monitoreando la fragmentación de los iones 185, 304 y 364 m/z , los cuales fueron seleccionados por su especificidad en la toxina-T2 y por su abundancia relativa.



En la Figura 5 se presentan los termogramas obtenidos del análisis de muestras mediante la inserción directa, a partir de estos análisis se puede observar que los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y resolución, se obtienen a través de la fragmentación del ión 364, con el cual se registra la toxina-T2 hasta niveles de $45 \mu\text{g L}^{-1}$ y presenta una variación entre los valores esperados en las muestras de referencias y los valores experimentales de 13%. Cabe mencionar que estos parámetros analíticos son aceptables considerando que las muestras no fueron derivatizadas, ni fueron separadas en el Cromatógrafo de Gases.



CONCLUSIONES

En el presente estudio la técnica con la mayor sensibilidad fue la Inserción Directa en el espectro de masas con $45 \mu\text{g L}^{-1}$, en contraste, la técnica de CCD presenta un orden de magnitud mínimo encontrado de $900 \mu\text{g L}^{-1}$. Adicionalmente, de todas las técnicas evaluadas, la que requiere el menor tiempo de proceso es la técnica de Inserción Directa, ya que el procedimiento se completa en 65 min en tanto que la técnica de CCD requiere de 155 min. Una de las grandes desventajas de este método es su costosa implementación, ya que se requiere una configuración del equipo de análisis de masas que permita la inserción directa de las muestras a la cámara de ionización, así como los filamentos del inserto directo los cuales son frágiles y costosos.

[Volver a: Micotoxicosis](#)