



**UNIVERSIDAD DE ALMERIA**

**DEPARTAMENTO DE HIDROGEOLOGÍA Y QUÍMICA ANALÍTICA**

**MÁSTER UNIVERSITARIO OFICIAL EN RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y CONTAMINANTES.  
CONTROL ALIMENTARIO Y AMBIENTAL**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

***“DETERMINACIÓN DE GLICOALCALOIDES:  $\alpha$ -SOLANINA Y  $\alpha$ -CHACONINA EN PATATA  
MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA PRESIÓN ACOPLADA A  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO”***

**Autora**

Isabel María Martín Navarro.

**Tutores:**

Antonia Garrido Frenich

Roberto Romero González

**JULIO 2011**

El presente trabajo ha sido presentado por Isabel María Martín Navarro, correspondiente al Máster Universitario Oficial: Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental.

*Fdo. Isabel María Martín Navarro.*

Tutores:

*Fdo. Antonia Garrido Frenich*

*Fdo. Roberto Romero González*

**INDICE**

**I. PRESENTACIÓN** .....5

**II. MEMORIA CIENTIFICA** .....8

**1.- OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN**.....8

**2.- INTRODUCCIÓN** .....9

2.1. La patata: El impacto de la patata en la cultura. .... 11

2.2. Glicoalcaloides en patata: Estructura química y generalidades ..... 12

2.3. Efecto de los glicoalcaloides..... 15

2.4. Niveles tóxicos de glicoalcaloides ..... 15

**3. ANÁLISIS DE GLICOALCALOIDES** ..... 18

3.1. Extracción de los glicoalcaloides:  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina en patata. .... 18

3.2. Determinación de los glicoalcaloides:  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina..... 20

3.2.1. Cromatografía de líquidos ..... 21

3.2.2. Sistema de detección empleados para la determinación de glicoalcaloides. .... 21

**4. MATERIALES Y MÉTODOS** ..... 23

4.1. Reactivos..... 23

4.2. Materiales..... 23

4.3. Preparación de patrones ..... 23

4.4. Equipos ..... 24

4.5. Análisis por UHPLC/MS ..... 24

4.6. Procedimiento de extracción..... 25

4.7. Muestras ..... 25

**5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... 26

5.1. Caracterización espectrométrica ..... 26

5.2. Optimización de las condiciones cromatográficas ..... 30

5.2.1. Optimización de la columna cromatográfica ..... 30

5.2.2. Optimización de la composición de la fase móvil ..... 30

5.2.3. Preparación del disolvente de inyección..... 34

5.2.4. Optimización de la temperatura de la columna..... 35

5.2.5. Optimización del flujo de la fase móvil ..... 36

5.2.6. Optimización del dwell-time ..... 36

5.3. Optimización del método de extracción ..... 37

5.3.1. Adición de agua a la muestra antes del proceso de extracción ..... 37

5.3.2. Efecto de la etapa de limpieza .....	38
5.4. Validación del método analítico .....	39
5.4.1. Efecto matriz.....	39
5.4.2. Linealidad .....	39
5.4.3. Veracidad y precisión del método .....	40
5.4.4. Límite de detección y límite de cuantificación. ....	41
5.5. Aplicación del método al análisis de muestras reales.....	41
<b>6. CONCLUSIÓN Y TRABAJO DE FUTURO .....</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>46</b>

## **I. PRESENTACIÓN**

El Máster Universitario Oficial “*Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental*”, curso 2010-2011, consta de 60 créditos ECTS y se estructura en 5 módulos, siendo los tres primeros de contenido teórico, el cuarto de carácter práctico y el quinto corresponde a la elaboración, redacción y defensa del Trabajo Fin de Máster, con el que se opta al Título de Máster.

El contenido de los módulos se describe brevemente a continuación:

### **MÓDULO I – PLAGUICIDAS**

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos, cursada)
2. Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos, cursada)
3. Registro de plaguicidas (3 créditos, cursada)
4. Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos, cursada)

Con este módulo se ha adquirido una visión general sobre el conjunto de políticas, leyes, normas y decretos que se aplican al control de residuos de plaguicidas. Se han adquirido conocimientos sobre tipos, aplicaciones y formulaciones de liberación controlada de plaguicidas teniendo en cuenta su eficacia y su respeto por el medio ambiente. Por otra parte, se han adquirido conocimientos sobre los objetivos y procedimientos a seguir para el registro de plaguicidas, considerando el marco normativo y administrativo de España y Europa.

### **MÓDULO II – CONTAMINANTES**

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos, cursada)
2. Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos, cursada)
3. Contaminación y remediación de suelos (3 créditos, cursada)

En este módulo se han estudiado los sistemas de gestión de la calidad y seguridad alimentaria, así como el marco legislativo relacionado, haciendo hincapié en el fraude alimentario y sistemas de trazabilidad alimentaria. Además se han abordado aspectos de toxicología general,

alimentaria y ambiental. Se ha proporcionado una visión sobre los contaminantes que más inciden sobre el suelo y los diferentes métodos y técnicas para la prevención de la contaminación, así como para la remediación de suelos contaminados.

### **MÓDULO III – GESTIÓN DE LABORATORIOS**

Consta de las siguientes materias:

1. Muestreo. Preparación de muestras ( 3 créditos, cursada)
2. Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos, cursada)
3. Gestión de la calidad en laboratorios ( 3 créditos, cursada)

En este módulo se estudian los requisitos básicos del muestreo, cómo diseñar un plan de muestreo, estimación de la incertidumbre asociada a dicha etapa y la legislación relacionada. Además se han evaluado las distintas técnicas relacionadas con el tratamiento de muestra. Se han expuesto los tipos de tratamientos de datos analíticos y sus aplicaciones a situaciones reales, así como las normas de calidad y de acreditación, además de las buenas prácticas de laboratorio y auditorías, poniendo especial énfasis en la norma ISO 17025.

### **MÓDULO IV – EXPERIMENTACIÓN EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Espectrometría de masas (3 créditos, cursada)
2. Exposición a plaguicidas (3 créditos, cursada)
3. Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos, cursada)

En este módulo se han adquirido conocimientos sobre los fundamentos de la técnica de espectrometría de masas y los distintos tipos de fuentes de ionización, analizadores y modos de operación.

Se estudiaron las metodologías analíticas para la evaluación de riesgos de exposición humana a plaguicidas como consecuencia de su aplicación en cultivos intensivos.

La última asignatura ha sido de carácter experimental. Se estudian las técnicas cromatográficas de gases y de líquidos, así como el acoplamiento con fluorescencia y

espectrometría de masas, evaluando las ventajas que ofrece este modo de detección ante otros detectores convencionales.

### **MÓDULO V – TRABAJO FIN DE MÁSTER (15 CRÉDITOS)**

El trabajo Fin de Máster titulado: *“Determinación de glicoalcaloides:  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina mediante cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo”* se ha realizado en el Grupo de Investigación “Química Analítica de Contaminantes” perteneciente al Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería. Dicho trabajo se encuentra encuadrado dentro de la línea de investigación: Métodos analíticos para residuos y contaminantes orgánicos en muestras alimentarias, ambientales y biológicas mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas.

En el desarrollo de este trabajo de investigación se han adquirido habilidades y conocimientos para:

- Buscar información y legislación relacionada a la temática del trabajo científico desarrollado.
- Evaluar los distintos parámetros involucrados en la extracción de glicoalcaloides.
- Validar métodos de cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS).

Cabe mencionar finalmente que la realización de las asignaturas cursadas en el Máster, así como el desarrollo del Trabajo Fin Máster, me han permitido adquirir determinadas competencias, como, capacidad de planificación y organización basadas en criterios de calidad y eficacia, siendo éstas fundamentales tanto para la consolidación de la formación científica como para el desarrollo profesional.

## **II. MEMORIA CIENTÍFICA**

### **1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN DEL ESTUDIO**

Los glicoalcaloides son compuestos metabólicos secundarios que producen algunas plantas en respuesta a situaciones de estrés o defensa. Se pueden encontrar en patatas, tomates y berenjenas, originando un problema sanitario si la concentración ingerida supera unos valores concretos.

Su presencia se conoce desde 1918, cuando Harris y Cockburn informan sobre intoxicaciones y muertes de humanos causados por el consumo accidental de patata con altas concentraciones de estos compuestos<sup>1</sup>. A partir de entonces, se publican otros artículos donde se desarrollan estudios sobre la toxicidad en humanos y animales, relacionando su ingesta con casos de malformaciones en embriones de ratas y malformaciones a nivel esquelético [2].

El objetivo del presente estudio ha sido determinar tóxicos naturales, como glicoalcaloides,  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, en patata, utilizando cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuádruplo (UHPLC-MS/MS).

Para tal fin se ha procedido a:

- ✓ Desarrollar un método de extracción para la determinación simultánea de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina en patata
- ✓ Optimizar un método de UHPLC-MS/MS para la determinación de los glicoalcaloides objeto del estudio
- ✓ Validar el método desarrollado
- ✓ Aplicar el método al análisis de muestras reales

## 2. INTRODUCCIÓN

Millones de personas consumen diariamente patatas, siendo el consumo de este producto únicamente superado por el de trigo, maíz y arroz [3]. Sin embargo, la patata presenta una serie de tóxicos naturales, los glicoalcaloides, tales como la solanina y la chaconina, que le confiere cierto sabor amargo. De hecho, si la patata se hubiera introducido hoy en día como un nuevo alimento, sería necesario llevar a cabo una evaluación cuidadosa y un examen detallado de su seguridad para decidir su idoneidad para el consumo humano, dada la presencia de estos compuestos [4]. Sin embargo el efecto de los glicoalcaloides no se ha examinado rigurosamente como se habría hecho si hubieran sido aditivos sintéticos. Así, y aunque los niveles de glicoalcaloides en las variedades comerciales no presentan, en general, ningún riesgo, hay ciertos factores como bajas temperaturas, daños causados por las plagas, daños en el producto u otros tipos de estrés, que pueden dar lugar a unos niveles elevados y toxicológicamente inaceptables de este tipo de compuestos [5].

Actualmente, existe una extensa legislación sobre la seguridad alimentaria, haciendo que los productos que llegan a los consumidores sean inocuos para su salud y se puedan rastrear todos los pasos de dichos alimentos desde su producción hasta su consumo. “De la granja a la mesa” es el principio por el cual se rigen tantas normas en nuestro país como en el resto del mundo. Para llevarlo a cabo, la Comisión Europea plasmó sus prioridades estratégicas en el LIBRO BLANCO SOBRE SEGURIDAD ALIMENTARIA, en el que se plantea una política de seguridad alimentaria basada en un planteamiento global e integrado [6].

Los problemas de intoxicaciones asociadas a los alimentos son numerosos en el mundo, por lo que la experiencia ha demostrado que es necesario adoptar medidas encaminadas a garantizar que los alimentos que se comercialicen sean seguros y que existan sistemas para identificar y afrontar los problemas de seguridad alimentaria, a fin de asegurar el adecuado funcionamiento de los mercados y proteger la salud humana [7].

Además de controlar todos los procesos desde que se cultiva el producto primario hasta su comercialización, incluyendo su transformación, almacenamiento y transporte, es muy importante controlar las posibles sustancias que pueden ser factor de peligro en un alimento, entendiéndose como factor de peligro a todo agente biológico, químico o físico presente en un

alimento o en un pienso, o toda condición biológica, química o física de un alimento o un pienso que pueda causar un efecto perjudicial para la salud [7].

Por otro lado, existe un cambio en la sociedad que ha afectado totalmente al sistema de alimentación en los países desarrollados. Donde antes se consumían productos frescos con elaborados procesos de transformación por parte del ama de casa, ahora se consumen productos elaborados o cuasi-elaborados que hacen más cómodo y sobre todo rápido el proceso de cocinado [5].

De igual modo, las estructuras familiares españolas han cambiado, y con la incorporación de la mujer al trabajo se buscan productos alimenticios que sean de calidad, con valores nutricionales añadidos y sobre todo rápidos de elaborar. Actualmente, en España el consumo de patata fresca ha disminuido mientras que ha aumentado el consumo de patata con valor añadido, es decir, aquella lista y preparada para cocinar, ya sean fritas, cocidas o en tortilla de patatas ya elaborada [8].

En todas las noticias de prensa y demás medios de comunicación, se señala la contaminación que se puede producir en los alimentos como consecuencia de las prácticas realizadas sobre los mismos, como pueden ser, plaguicidas para proteger el cultivo o aditivos para conservar más tiempo o para mejorar alguna de sus propiedades. Pero, en pocas ocasiones, se señala el riesgo de consumir alimentos con sustancias tóxicas inherentes a él. Aunque los consumidores poseen mucha información acerca de la elaboración de los alimentos que compran, existe una gran desconfianza en ellos, comprobándose que existen tres grandes preocupaciones en los consumidores asociados a la producción alimentaria [9]:

- La importancia para la salud de las sustancias que se añaden intencionadamente a los alimentos y que pueden quedar en ellos como residuos.
- El peligro de las sustancias tóxicas presentes en alimentos por causas naturales (el que nos ocupa en esta línea de investigación).
- El efecto que los métodos de conservación pueden tener sobre el valor nutricional y salubridad de los alimentos.

Todos los alimentos pueden contener sustancias que pueden producir alguna enfermedad y su toxicidad solo va a depender de la dosis en la que se ingiera [10].

La toxicidad de los alimentos tiene su origen en fuentes físicas, microbiológicas y químicas. Dentro de las sustancias químicas que se pueden detectar en los alimentos y que pueden ser tóxicas o provocar una alteración en los mismos, se pueden diferenciar las siguientes [11]:

1. Tóxicos naturales
2. Contaminantes
3. Aditivos
4. Coadyuvantes tecnológicos

Así, estas sustancias pueden encontrarse en los alimentos debido a la propia constitución natural del alimento, debido a la contaminación ambiental, o bien son sustancias añadidas voluntariamente con alguna finalidad concreta.

### **2.1. La patata: El impacto de la patata en la cultura**

La patata (*Solanum tuberosum L.*) o “la papa” pertenece a la familia de las solanáceas. La parte comestible, el tubérculo, son tallos carnosos modificados que se originan en el extremo de los estolones y fue el primer cultivo de raíz que se convirtió en alimento básico de una civilización, los incas. Aunque éstos también producían maíz, algodón y lana de llama, y contaban con sofisticados sistemas de riego, elaboración de alimentos y tecnologías de almacenamiento, dependían de la capacidad de la patata para darse en todas las zonas cultivables de la dura región de los altiplanos andinos en América del Sur [12].

Esas características iban a cambiar la dieta alimentaria y la historia europea profundamente. Ya el escritor alemán Günter Grass, mencionaba que la patata, gracias a que puede cultivarse de forma rápida y barata, liberó a las masas del hambre, permitió que la clase obrera creciera más robusta y que más personas que trabajaban en las granjas pudieran incorporarse a las fábricas del siglo XIX. Las fábricas supusieron el desarrollo de una fuerte clase trabajadora que, a su juicio, democratizó Europa [13].

Actualmente la patata forma parte de la alimentación básica de todo el mundo [14], y es el cuarto producto de mayor producción, tras el arroz, el trigo y el maíz, con una producción anual de más de 300 millones de toneladas cultivadas en todo el mundo [15], siendo aparte de China (primer productor mundial) los países con climas algo más fríos como por ejemplo, Alemania, Rusia y Polonia los principales productores [9].

Así, la patata es uno de los pilares en nuestra alimentación actual debido a las propiedades nutritivas que forman parte de su composición, en especial los hidratos de carbono y el potasio. Actualmente, de la producción total de patata solo el 25% se destina a consumo humano, siendo el resto usado para la fabricación de piensos, espesantes y madera [16].

## 2.2. Los glicoalcaloides en patata: Estructura química y generalidades

Los glicoalcaloides pertenecen al grupo de los alcaloides (un grupo muy heterogéneo), los cuales son compuestos básicos nitrogenados (en su mayoría heterocíclicos) provenientes del reino vegetal, pero también podrían tener un origen animal (poco frecuente). Los alcaloides se clasifican según sus precursores moleculares, dentro de los cuales está el grupo terpenoide que contiene acónitos y los alcaloides esteroidales [12]. Dentro de este último grupo, se pueden distinguir cuatro grupos de origen vegetal: veratrum, **solanum**, alcaloides esteroidales de *Apocynaceae* y alcaloides *Buxus*, siendo el segundo grupo el que se desarrolla en las plantas de la familia de las solanáceas, teniendo su origen en precursores no nitrogenados [17].

Este tipo de alcaloides esteroidales se encuentran en las plantas en forma de glucósidos. Estos son ésteres que resultan de la unión entre el aglicón (porción no carbohidratada, que es un alcaloide esteroide) y una parte carbohidratada, mediante un enlace éster, y se pueden distinguir dos tipos de estructuras: espirosolanas (p.e. la tomatidina) y solanidinas (como la de los glicoalcaloides) [17].

De esta forma, los glicoalcaloides se encuentran no solo en las patatas sino en otros productos de la familia de las solanáceas como el tomate o la berenjena [17]. Son metabolitos secundarios que la propia planta produce en respuesta a situaciones de estrés, como puede ser la temperatura o ataque de insectos u hongos, actuando como un insecticida sobre ellos [18].

Los glicoalcaloides están compuestos de tres partes: una polar, que es la porción oligosacárida soluble en agua, integrada por un monosacárido de número y composición variable unido en el C.3, un esteroide lipofílico no polar y un heterociclo que contiene nitrógeno [19].

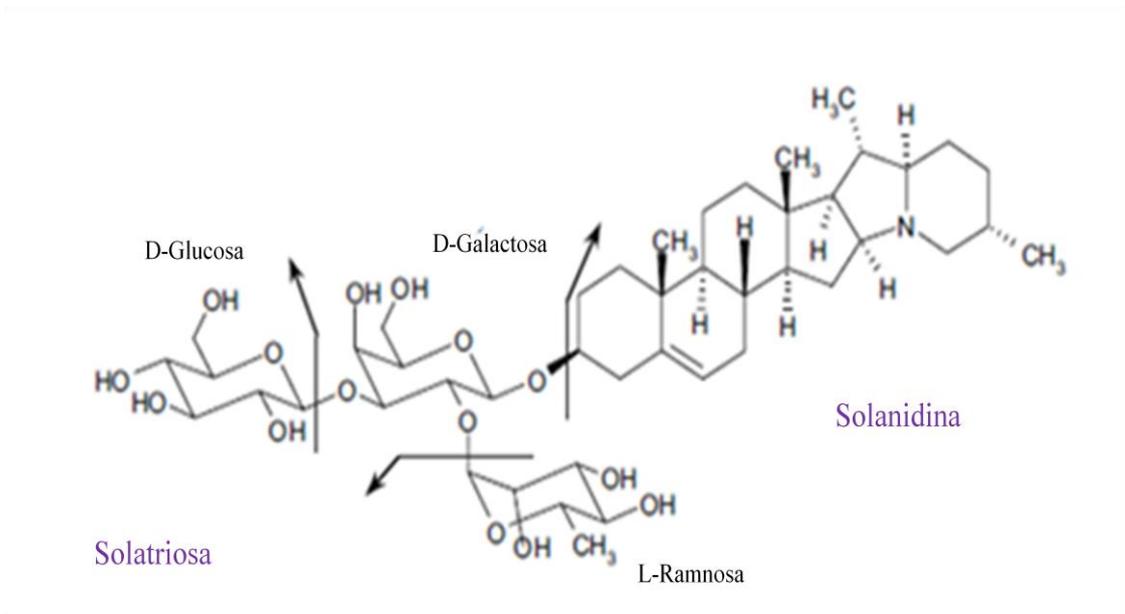
Son derivados de esteroides, biogénicamente muy relacionados a los triterpenoides tetracíclicos, del ciclopentanoperhidrofenantreno. Presentan un punto de fusión inferior a 200 °C y se encuentran frecuentemente como glucósidos del género *Solanum* [20].

Los glicoalcaloides que se pueden encontrar en la patata son la  $\alpha$ -solanina,  $\alpha$ -chaconina, mayoritariamente, y  $\beta$ -solanina,  $\beta$ -chaconina,  $\gamma$ -solanina,  $\gamma$ -chaconina,  $\alpha$ -solamargina y  $\beta$ -solamargina en menor proporción [17]. De todos ellos la  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina representan el 95% de glicoalcaloides totales en patata [21], por lo que son los que se van a determinar en este estudio.

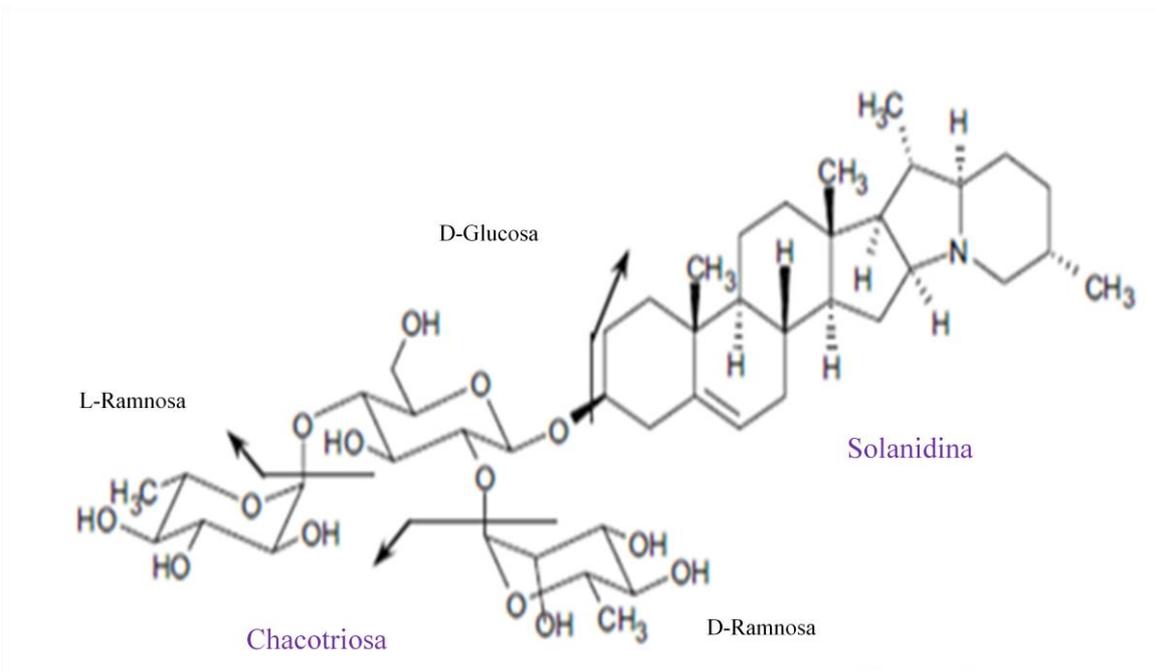
En relación a la formación de los glicoalcaloides, existen distintas teorías. Si se observa su estructura (Figura 1), ambos compuestos tienen una parte común, la solanidina. Existen diversas teorías que señalan que probablemente se diera de manera natural la síntesis en la planta de un glicoalcaloide, la solanina (como mecanismo de defensa de la planta) y con el paso del tiempo se formara la chaconina, siendo ésta biológicamente más potente que la solanina. Sin embargo otra posibilidad indica, que ambos glicoalcaloides se generan al mismo tiempo, para ejercer un efecto sinérgico en la planta [22].

Por lo tanto en la biosíntesis de los glicoalcaloides se sabe que [23]:

- a. Los alcaloides esteroidales ocurren en las plantas como glucósidos
- b. Los glicoalcaloides son sintetizados y degradados en la planta
- c. Su biosíntesis comienza durante la germinación y alcanza su máximo durante la floración
- d. La naturaleza y concentración de glicoalcaloides está determinada genéticamente
- e. La cantidad se puede ver influenciada por mecanismos de temperatura, estrés, etc.



**$\alpha$ - Solanina**  
Pm: 868.04 g/mol ( $C_{45}H_{73}NO_{15}$ )



**$\alpha$ - Chaconina**  
Pm: 852.07 g/mol( $C_{45}H_{73}NO_{14}$ )

**Figura 1. Estructura de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina.**

### 2.3.Efecto de los glicoalcaloides

Partiendo de la frase, “*la dosis hace al veneno*” [24], los efectos que producen estos compuestos estarán relacionados con la cantidad ingerida, siendo muy tóxicos para humanos y animales a altas concentraciones.

Los efectos que producen los glicoalcaloides son, por tanto, muy variados. Entre las principales alteraciones se pueden producir trastornos gastrointestinales a dosis media y si la dosis es elevada, pueden producir inhibición de la acetilcolinesterasa y efectos teratogénicos [25], desórdenes neurológicos, hemorragias en el tracto intestinal y en casos muy graves, edema cerebral y la muerte [26].

Sin embargo también se ha observado que los glicoalcaloides de especies de *Solanum* podrían ser útiles contra la infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y también contra las infecciones intestinales relacionadas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [27] pero son pocos los artículos que aborden este tema.

Además hay publicaciones donde se habla de los efectos curativos de la hierba mora debido a su principio activo, la solanina, atribuyendo a esta planta actividad analgésica [28] y sedante, si es aplicada por vía externa. Al parecer, estas acciones las ejercen sobre las placas motrices, narcotizando el bulbo, la médula y los cordones nerviosos, determinando parálisis en las extremidades de los nervios sensitivos y de los motores. Además se le atribuyen propiedades diaforéticas y purgantes (a bajas concentraciones). También se puede aplicar de forma externa como unguento para el tratamiento de heridas, herpes, artritis y contusiones [28]. Además hay estudios donde se relaciona el efecto positivo de la actividad de los glicoalcaloides sobre células cancerosas en ratas y sobre determinados tipos de herpes

### 2.4.Niveles tóxicos de los glicoalcaloides

No existe legislación del contenido de glicoalcaloides, pero si un gran número de publicaciones donde se realizan estudios de sus efectos, así como las dosis que producen intoxicaciones [29]. A nivel internacional, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS)

establecen en 1992 un valor de ingesta diaria aceptable de valores no tóxicos entre 2-10 mg de glicoalcaloides por 100 gramos de peso fresco de patata de consumo humano [30].

Los niveles de glicoalcaloides en patata van a depender de la forma de cultivo, variedad, almacenamiento y temperatura [31] además se pueden ver afectados por el tratamiento culinario al que sea sometido el producto [32]. De esta forma, los glicoalcaloides se pueden encontrar tanto en el tubérculo (en menor cantidad) como en las hojas (en mayor cantidad) y en la cáscara, estimándose un promedio de 300-600 mg/kg en la piel de la patata, de 2000-4000 mg/kg en brotes y de 3000-5000 mg/kg en las flores [33]. Sin embargo en las nuevas variedades comerciales se aconseja que los niveles de glicoalcaloides se encuentren por debajo de los 200 mg/kg para patata destinada al consumo humano [34].

Generalmente, es conveniente indicar que la cantidad en la que se van a encontrar en la patata es de 10-350 mg/kg. Siendo de 10-130 mg/kg valores normales, de 140-150 mg/kg, se detectan sabores amargos por los que nuestro organismo rechaza su ingesta y niveles superiores a 200 mg/kg se consideran peligrosos para el ser humano [30].

De forma general, en los documentos encontrados sobre la comercialización de la patata [35], se señalan las características de la calidad de la patata, pero no se indica nada en relación a los contenidos de glicoalcaloides, es decir, aunque pueden resultar tóxicos no están legislados.

Además, hay que tener en cuenta que la patata no se destina solo al consumo humano, sino que existen otros sectores que la utilizan para finalidades distintas. En estos casos, no bastará la simple inspección visual del consumidor para detectar posibles efectos negativos que pudieran incidir en la presencia de glicoalcaloides, sino que sería necesario la utilización de metodologías analíticas fiables para su determinación.

Actualmente no se recoge la importancia de realizar controles de calidad más estrictos a la patata, lo cual es un enorme error ya que como se indicaba anteriormente:

✓ La presencia de glicoalcaloides debido a situaciones de estrés en la planta. Cuando esto ocurre existen unas manifestaciones visibles en el producto que hace que sean descartadas para su consumo (piel verde, con heridas, presencia de deformidades...). Actualmente, el consumo de patata elaborada ha aumentado, no viendo el consumidor final la calidad de la

patata establecida para la elaboración de esos productos elaborados y en ocasiones los controles de calidad son insuficientes, ya que hay que recordar que este tipo de compuestos está siempre en la planta y las condiciones de almacenamiento o transporte pueden incidir en un aumento de los mismos.

✓ Cuando la patata presenta glicoalcaloides, en concentraciones comprendidas entre 140-150 mg/kg su sabor es amargo, por lo que no resulta atractivo para el consumidor y por lo tanto, es rechazada (toxicidad en 200 mg/kg). Sin embargo, existen patatas con sabor amargo, como la papa amarga, no consumida en Europa pero si en América del Sur, donde se realiza un pre-tratamiento antes de su consumo para eliminar el contenido de glicoalcaloides [36].

✓ Los procesos culinarios hacen que disminuya en gran cantidad. Así el hervido, asado, fritura, etc., transforman el compuesto, reduciendo su toxicidad [37]. Sin embargo conviene destacar que sólo cuando se fríen a 170 °C se asegura que se destruye una gran cantidad. En el hervido se disminuye su cantidad y su toxicidad, pero aún se pueden detectar a concentraciones considerables.

✓ Los glicoalcaloides se encuentran mayoritariamente en hojas y tallos siendo poco probable que aparezcan en el tubérculo, ya que el contenido de glicoalcaloides decrece a medida que nos adentramos en el mismo. Sin embargo, aunque su concentración sea menor, no implica su ausencia, por lo que representa un peligro y como tal, debería ser analizado para que su concentración no suponga un riesgo para la salud.

Para minimizar el riesgo de presencia de este tipo de compuestos, se encuentran mejoras genéticas para eliminar el contenido de glicoalcaloides en patata seleccionando genotipos con bajo contenido de glicoalcaloides. Además, los productores de alimentos están obligados por ley a asegurar la inocuidad y la calidad de sus productos, sin considerar cual es el origen o la identidad de los ingredientes [38]. Sin embargo, resulta curioso que como cita Alexander Bonilla, (1/12/2003, Asuntos agrícolas), *“¿Hay controles sobre los niveles de glicoalcaloides en las papas que compramos en las ferias del agricultor o supermercados? No lo sabemos”*

Por esta razón, es importante disponer de metodologías analíticas que permitan determinar de una manera rápida y fiable este tipo de compuestos en patata.

### 3. ANÁLISIS DE GLICOALCALOIDES

En general el análisis de glicoalcaloides comprende los siguientes pasos:

- ✓ Extracción de glicoalcaloides
- ✓ Limpieza y/o preconcentración del extracto
- ✓ Determinación analítica

La mayoría de los trabajos revisados determinan la presencia de los glicoalcaloides mayoritarios,  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina en patata, aunque en algunos, además, se evalúan la presencia de glicoalcaloides minoritarios como la solasodina y solanidina [39].

#### 3.1. Extracción de glicoalcaloides

La finalidad del proceso de extracción es separar y/o preconcentrar los analitos de la matriz. La extracción selectiva de analitos se basa en sus diferentes características y propiedades químicas y físicas, como: peso molecular, carga, solubilidad, polaridad y volatilidad.

Mayoritariamente, los métodos de extracción de glicoalcaloides en patata se basan en poner en contacto una determinada cantidad de muestra con una disolución extractante. En algunas ocasiones, se realiza un pre-tratamiento o pre-acondicionamiento de la muestra, como adicionar algún sustancia que evite la oxidación de los azúcares, como puede ser la adición de bisulfito sódico (0.5g/100g de muestra) [40] o utilizar nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a -20 °C hasta su análisis [21].

Una vez las muestras han sido homogenizadas, se realizaría la etapa de la extracción. En bibliografía se recogen una gran variedad de disoluciones extractantes, tales como una disolución formada por una mezcla de agua: acetonitrilo: hidrógeno sulfito de sodio (100:5:0.5 v/v/m) [40]. Sin embargo, otros procedimientos de extracción emplean como agente extractante 20 mL de ácido acético (1%): metanol (70:30, v/v) [41]. Además, hay artículos donde se realizan comparativas entre tres métodos de extracción: Soxhlet, ultrasonidos y extracción con líquidos presurizados, utilizando previamente una solución de extracción formada por: cloroformo, hexano, acetato de etilo y metanol. Los compuestos a detectar son la solasonina,  $\beta$ -2 solamargina y solamargina [42], obteniéndose los mejores resultados cuando se empleaba la extracción con líquidos presurizados.

Con los procedimientos indicados previamente, se consiguen unos resultados de extracción adecuados de los glicoalcaloides para que puedan ser posteriormente detectados y cuantificados, pero todos ellos requieren grandes volúmenes de agente extractante, lo que produce un encarecimiento de los análisis, además de incrementar el tiempo de análisis, lo hacen también los costes para el laboratorio, lo que ha llevado a que en los últimos años se desarrollen algunos procedimientos de extracción genéricos, que agilicen esta etapa [43], basadas en una simple extracción con disolvente orgánico como metanol, acetona o acetonitrilo y posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Dentro de este tipo de aproximaciones, destaca la técnica QuEChERS. Sus siglas Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro procedentes del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, señalan las principales características de dicha técnica, permitiendo agilizar de manera fácil y económica el proceso de extracción. QuEChERS es un método oficial para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales [44]. Además ha sido ampliamente utilizado para la extracción de otro tipo de compuestos en diversas matrices, como plaguicidas en manzanas [45], pimientos y otras hortalizas [46] así como la presencia de antibióticos o potenciadores de crecimiento en alimentación animal [47], entre otros, aunque aún no ha sido evaluado para la extracción de glicoalcaloides en patata.

El procedimiento consiste en la extracción de una pequeña cantidad de muestra representativa y homogénea mediante agitación, con la misma cantidad de acetonitrilo acidificado con ácido acético. Una ventaja de la extracción con acetonitrilo es que éste se separa más fácilmente del agua con la adición de una mezcla de sales apropiadas (sulfato de magnesio anhidro y cloruro sódico anhidro) que proporcionan una adecuada separación de fases sin necesidad de diluir el extracto con disolventes no polares que pueden ser tóxicos [48].

Después de la centrifugación, que proporciona una buena separación física de las fases, una alícuota de la fase orgánica se somete a un proceso de purificación empleando la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Así se añade una pequeña cantidad de sorbente, generalmente de PSA (amina primaria y secundaria) al extracto que se agita y se centrifuga. El sobrenadante se puede analizar directamente o se puede concentrar para reconstituirlo en un disolvente adecuado para su análisis.

Aunque es un método de extracción muy simple, cubre un amplio abanico de sustancias activas de diferentes características fisicoquímicas, incluyendo plaguicidas polares y apolares [49]. La técnica ofrece una alta recuperación, es reproducible y más económica que muchos métodos típicos de preparación de muestras.

### 3.2. Determinación de glicoalcaloides

Para la determinación de glicoalcaloides se pueden utilizar una gran variedad de métodos, como los gravimétricos [50], en los que se realiza una extracción con ácido acético diluido y posterior precipitación con amoníaco para su posterior determinación por pesada, o colorimétricos [51], en los que se lleva a cabo una evaluación de las coloraciones que dan los glicoalcaloides con diferentes reactivos, como el de Marqués, formado por ácido sulfúrico y formaldehído.

Entre la bibliografía consultada, además se recogen métodos basados en bioensayos in vivo realizados en ratas y en conejos, donde se estudia el efecto de los glicoalcaloides sobre la acción de la acetilcolinesterasa y los efectos teratogénicos [29].

Sin embargo en los últimos años se han desarrollado otros métodos analíticos, como el método de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [52], que se ha mejorado mediante el desarrollo de ensayos de análisis por electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (inmuno-CE-LIF), demostrando que pueden ser una alternativa a los métodos tradicionales ELISA [53]. Con la finalidad de buscar una metodología que reduzca los costes se han realizado además otras investigaciones, como el análisis de glicoalcaloides en patata usando biosensores enzimáticos basados en iones sensibles a transistores de efecto de campo (pH- ISFETs) [54].

Por otro lado, las metodologías basadas en cromatografía de gases (GC) no son muy utilizadas, debido a la baja volatilidad de los compuestos (glicoalcaloides), por lo que hay que realizar una etapa de derivatización previa [55]. Sin embargo, la cromatografía de líquidos (LC) ha sido ampliamente utilizada en estos últimos años, ya que por las características de las moléculas como la baja volatilidad, resulta idónea para la cuantificación de este tipo de compuestos [56].

### 3.2.1. Cromatografía de líquidos

LC es una técnica que se emplea para el análisis de compuestos polares que no son fácilmente vaporizables, o que son lábiles térmicamente [57] y que por lo tanto no pueden analizarse directamente por GC. La preparación de derivados térmicamente estables para el análisis por GC supone un incremento en el tiempo de análisis y puede originar pérdidas de los compuestos objeto de estudio, por lo que LC es una alternativa para este tipo de compuestos.

Tradicionalmente, el análisis de estos compuestos se ha realizado mediante LC, aunque en los últimos años se ha desarrollado la cromatografía de líquidos de ultra eficacia (UHPLC) [58] que permita trabajar con fases estacionarias que poseen tamaños de partícula inferiores a 3  $\mu\text{m}$ . Esta reducción del tamaño de partícula, disminuye significativamente la anchura de pico, lo que posibilita la mejora en la eficacia del proceso cromatográfico, ya que permite trabajar a altos flujos de fase móvil sin pérdida de la calidad en la separación cromatográfica, con la consiguiente reducción del tiempo de análisis [59].

En LC, normalmente se emplea la modalidad de fase reserva, siendo las fases estacionarias más empleadas la  $\text{C}_{18}$  [42] usándose la  $\text{C}_8$  [60] en menor medida. En relación a la fase móvil empleada, hay una mayor variedad pudiendo emplearse fases móviles formadas por una disolución acuosa de ácido fórmico, 0.5 % (v/v), acetonitrilo, 2-propanol, ácido fórmico (94.5:5:0.5,v/v/v) [42], tetrahidrofurano/agua/acetonitrilo (50:30:20, v/v/v) [54], o una disolución acuosa de acetato de amonio 3 mM y acetonitrilo [61]. Esta falta de unificación en la elección de la fase móvil, se puede deber a los distintos detectores que se emplean para cada una de los artículos encontrados.

### 3.2.2. Sistema de detección empleados para la determinación de glicoalcaloides

Actualmente MS es una de las técnicas más usadas para la determinación de glicoalcaloides en patata [62], empleando de manera general el modo de electronebulización (ESI) en modo positivo [63], aunque también se pueden encontrar otros sistemas de detección clásicos como UV-visible, trabajando a longitudes de onda comprendidas entre 202-214 nm [57], o detección por fluorescencia [64] (longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión 520 nm). En relación a MS, aunque el analizador más empleado ha sido el triple cuadrupolo [58] se han usado también analizadores de alta resolución como el tiempo de vuelo (TOF) [60].

De forma general se puede indicar que MS ha tenido un gran avance y se está imponiendo en los laboratorios analíticos de investigación o de diagnóstico. Ello se debe fundamentalmente a la combinación de técnicas analíticas de separación, como los métodos cromatográficos o la electroforesis, con MS en sus diferentes modalidades. Las cualidades de esta técnica son: alta especificidad analítica, amplio intervalo de aplicabilidad (moléculas de bajo y alto peso molecular) posibilidad de obtener información cualitativa y cuantitativa en una única prueba así como su flexibilidad, que permite diseñar procedimientos analíticos en relativamente poco tiempo.

Así, una vez separadas las sustancias en el cromatógrafo, es necesario ionizar las moléculas y obtener iones en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización y actualmente existen diferentes técnicas que permiten llevar a cabo dicha ionización [65].

Para el acoplamiento con LC, la ionización a presión atmosférica (API) ha tenido un gran éxito ya sea mediante la modalidad de ESI o la denominada ionización química a presión atmosférica (APCI) [66], siendo las más empleadas en la mayoría de los equipos. Cuando se emplea ESI, la muestra disuelta en un disolvente adecuado pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial. Se produce una fina niebla de gotas de elevada carga y la evaporación del solvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa. Como se ha indicado previamente, la determinación de glicoalcaloides se lleva a cabo normalmente en ESI en modo positivo, debido a la estructura relativamente polar de parte de las moléculas evaluadas (Figura 1).

En este sentido cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) cumple los requisitos establecidos por la Decisión de la Comisión 2002/657/EC [67] en la que se indica que *"los métodos basados exclusivamente en el análisis cromatográfico sin el uso de la espectrometría de masas para la detección no son adecuados para ser utilizados como métodos de confirmación"*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Reactivos**

Los patrones de  $\alpha$ -solanina ( $\geq 98\%$ ) y  $\alpha$ -chaconina ( $> 98\%$ ) fueron suministrados por Extrasynthese (Lyon Nord, Francia). El acetonitrilo y el metanol (grado HPLC) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El sulfato de magnesio anhidro, el acetato sódico anhidro, el ácido acético (pureza  $> 97\%$ ) y el ácido fórmico (pureza  $>98\%$ ) se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España). El ácido ascórbico utilizado para evitar la oxidación de la patata durante el análisis es de Fluka (Steinheim, Alemania). El agua ultrapura fue obtenida de un sistema de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **4.2. Materiales**

Se usaron filtros de  $0.20\ \mu\text{m}$  de Nylon de VWR (Barcelona, España) y  $0.45\ \mu\text{m}$  GVHP de Millipore (Irlanda) para el filtrado de los extractos de las muestras y fases móviles respectivamente. Los cartuchos Sep-Pack SPE ( $\text{C}_{18}$  de 6 cc y 200 mg) adquiridos de Waters (Milford, MA, USA) se emplearon para limpiar las muestras. Se emplearon además balanzas analíticas, AB204-S y PB602S, para la pesada de patrones y muestra, una batidora/trituradora Cutter SK-3 suministrada por Sanmic (Azkotia, España) para el procesado de las muestras y un baño de ultrasonidos de JP Selecta (Barcelona, España).

### **4.3. Preparación de patrones**

Se preparó una disolución primaria (disolución madre) de cada glicoalcaloide, de concentraciones 156 y 116 mg/L de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina respectivamente, en metanol (grado HPLC). Las disoluciones fueron almacenadas en frascos topacio para evitar posible degradación solar y almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$ . Posteriormente, a partir de éstas se preparó una disolución intermedia de 5 mg/L en metanol, la cual también fue almacenada junto con las anteriores.

#### 4.4. Equipos

Para realizar el análisis cromatográfico se empleó un sistema ACQUITY UPLC™ (Waters, Milford, MA, EE.UU.), utilizando una columna KINETEX C<sub>18</sub> (50 x 2.10 mm, 2.6  $\mu$ m) suministrada por Phenomenex (Torrance, EE.UU.). La detección de los compuestos se realizó empleando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, Acquity TQD (Waters, Manchester, Reino Unido). Se utilizó una fuente ESI en modo positivo. La adquisición de datos se realizó mediante el software MassLynx 4.0 en conjunto con el software QuanLynx (Waters).

#### 4.5. Análisis por UHPLC-MS/MS

El análisis cromatográfico de los glicoalcaloides,  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, se realizó empleando una fase móvil formada por una disolución de metanol: agua (95:5 v/v), a la que se adicionaba ácido fórmico (0.01 % v/v) y 20 mM de formiato amónico (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido fórmico (0.1 % v/v) y 20 mM de formiato amónico (eluyente B), usando el gradiente empleado en la Tabla 1.

**Tabla 1. Gradiente empleado para el análisis de los glicoalcaloides.**

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% (A)	% (B)
0.0	0.25	10	90
1.0	0.25	10	90
2.5	0.25	50	50
3.0	0.25	100	0
4.0	0.25	10	90
5.0	0.25	10	90

Los glicoalcaloides fueron detectados mediante ESI en modo positivo, utilizando los siguientes parámetros: 3.0 kV de voltaje de capilar, 3 V de voltaje del extractor, 120 °C como temperatura de la fuente, 350 °C como temperatura de desolvatación, 50 L/h de flujo del gas de

cono y 600 L/h de flujo del gas de desolvatación (ambos gases fueron nitrógeno). Como gas de colisión se empleó argón, usado a una presión de  $4 \times 10^{-3}$  mbar en la celda de colisión.

#### **4.6. Procedimiento de extracción**

Los glicoalcaloides fueron extraídos mediante el empleo de un procedimiento basado en la metodología QuEChERS, describiéndose a continuación: pesar 5 g de muestra previamente homogeneizada y adicionar 5 mL de agua. A continuación, añadir 10 mL de acetonitrilo, conteniendo 1% de ácido acético (v/v). Agitar de manera manual la mezcla durante 1 min. A continuación adicionar, 4 g de sulfato de magnesio anhidro y 1 g de acetato de sodio, agitando manualmente durante 1 min. Seguidamente centrifugar durante 5 min a 5000 rpm. Pasar el sobrenadante por un cartucho C<sub>18</sub> Sep-Pack, como etapa de limpieza. Finalmente tomar 10  $\mu$ L del eluato y completar con fase móvil hasta 1 mL, previo a la inyección cromatográfica de 5  $\mu$ L.

#### **4.7. Muestras.**

Se analizaron 10 muestras de patatas adquiridas en distintos supermercados de la provincia de Almería, y fueron analizadas aplicando el procedimiento previamente descrito.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterización espectrométrica

Para determinar cuáles son las mejores condiciones para realizar la caracterización espectrométrica de los compuestos, se preparó una disolución de 20 mg/L de cada uno de los sustancias objeto de estudio, utilizando las disoluciones madre de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina en metanol/agua. Además, se les adiciona ácido fórmico, (20 $\mu$ L), el cual ayuda a la ionización de los compuestos en ESI en modo positivo. Para la caracterización espectrométrica, se realiza la modificación tanto del voltaje de cono para seleccionar las mejores condiciones para el ion precursor, y la energía de colisión para seleccionar los iones producto, mostrándose en las Figuras 2-5 los espectros obtenidos durante el proceso de optimización, y en la Tabla 2 los iones y condiciones seleccionadas para cada uno de los compuestos estudiados.

Así, en un primer estudio realizado se llevó a cabo un barrido completo de los iones precursores modificando el voltaje de cono, seleccionando para la  $\alpha$ -solanina el ion  $m/z$  868.6 y para la  $\alpha$ -chaconina el ion  $m/z$  852.7. A continuación se realizó la elección de los iones producto, de donde se obtuvieron las tres transiciones más intensas para el compuesto  $\alpha$ -solanina, siendo la de mayor intensidad, la utilizada para la cuantificación del compuesto, que para este caso fue el ion  $m/z$  98.3 y el ion  $m/z$  398.5 con la segunda transición más intensa el utilizado para la confirmación del mismo. Mientras que para la  $\alpha$ -chaconina, se obtuvieron cuatro iones producto, siendo el de mayor intensidad (utilizado para la cuantificación) el ion  $m/z$  398.4 y el segundo de mayor intensidad y por tanto el utilizado para la confirmación el ión  $m/z$  706.6

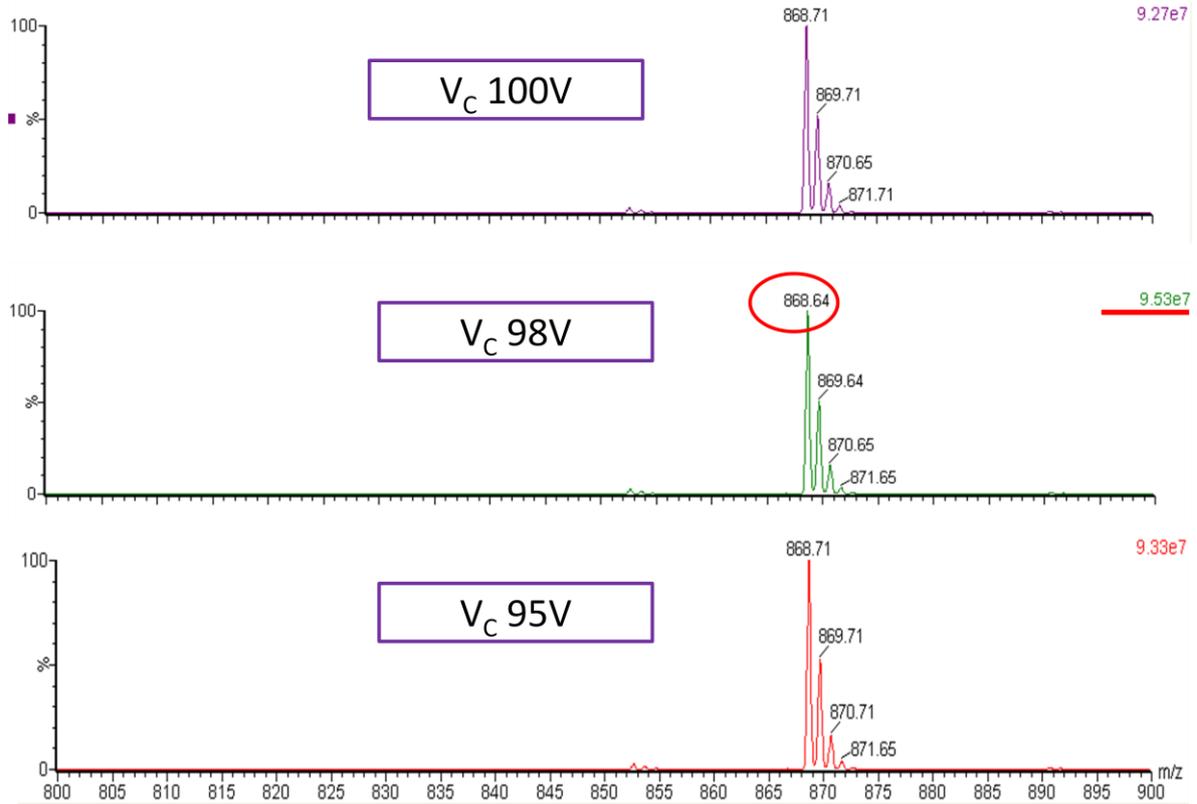


Figura 2. Espectros MS obtenidos a distintos voltajes de cono para la  $\alpha$ -solanina.

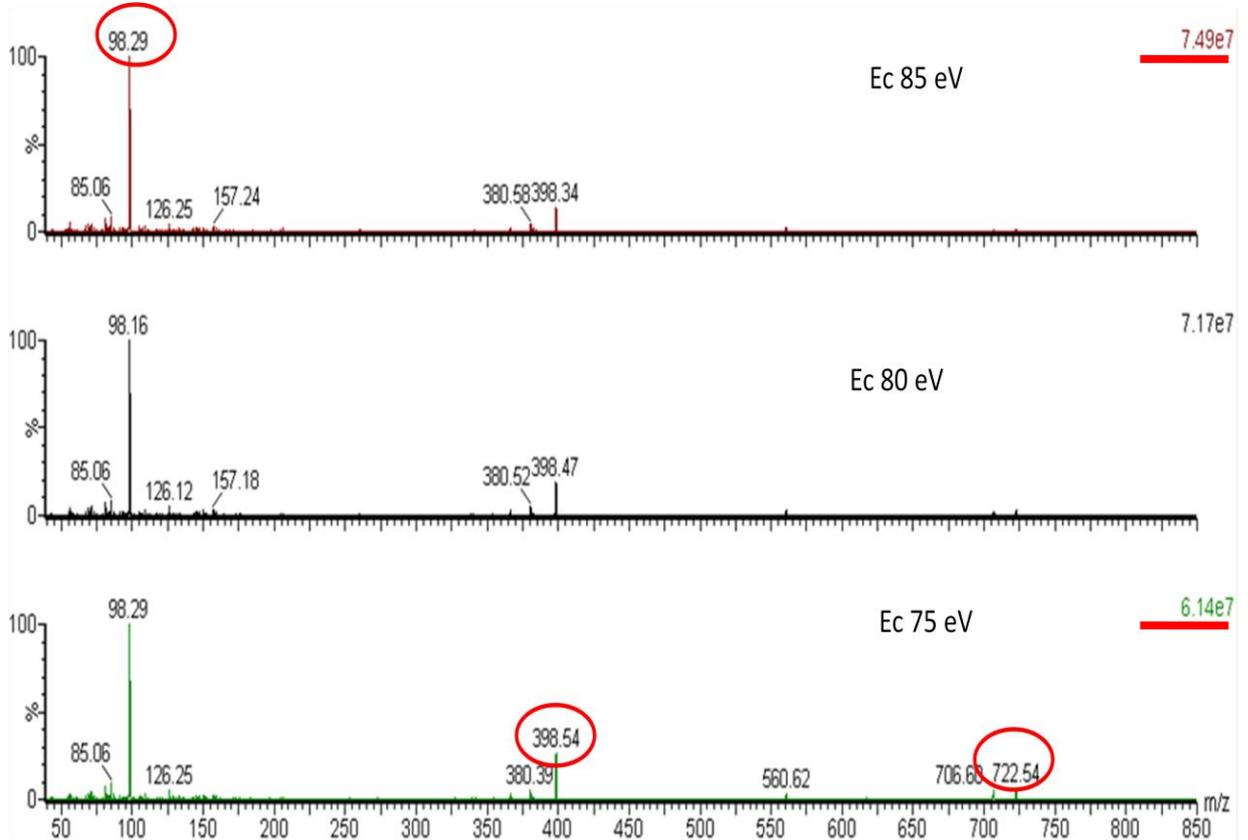


Figura 3. Espectros MS/MS a distintas energías de colisión para la  $\alpha$ -solanina.

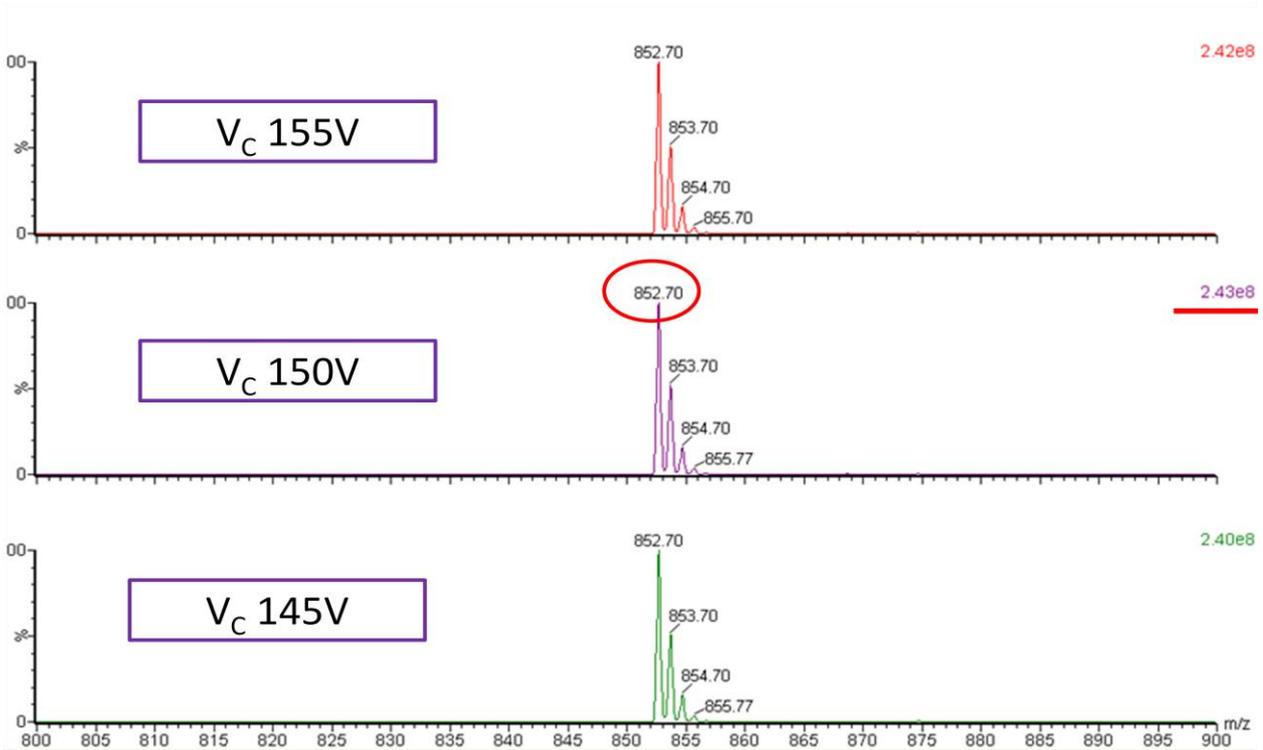


Figura 4. Espectros MS obtenidos a distintos voltajes de cono para la  $\alpha$ -chaconina.

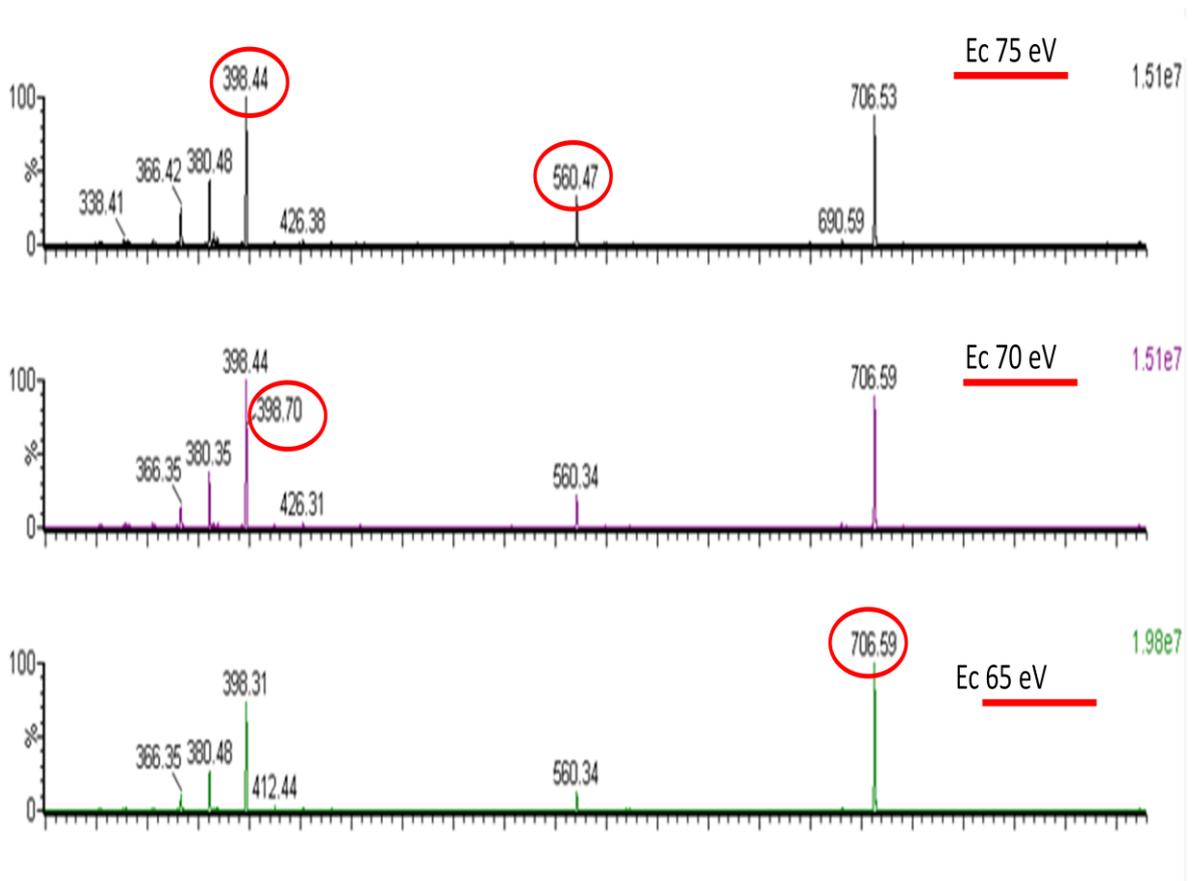


Figura 5. Espectro MS/MS a distintas energías de colisión para la  $\alpha$ -chaconina

**Tabla 2. Condiciones MS/MS de los glicoalcaloides objeto de estudio.**

Compuesto	Ion precursor ( <i>m/z</i> )	Voltaje de cono (V)	Ion producto ( <i>m/z</i> )	Energía de colisión (eV)
<b><math>\alpha</math>-Solanina</b>	868.6	98	722.5	75
			398.5	75
			126.2	75
<b><math>\alpha</math>- Chaconina</b>	852.7	150	706.6	65
			560.5	75
			398.4	75
			380.5	70

## 5.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

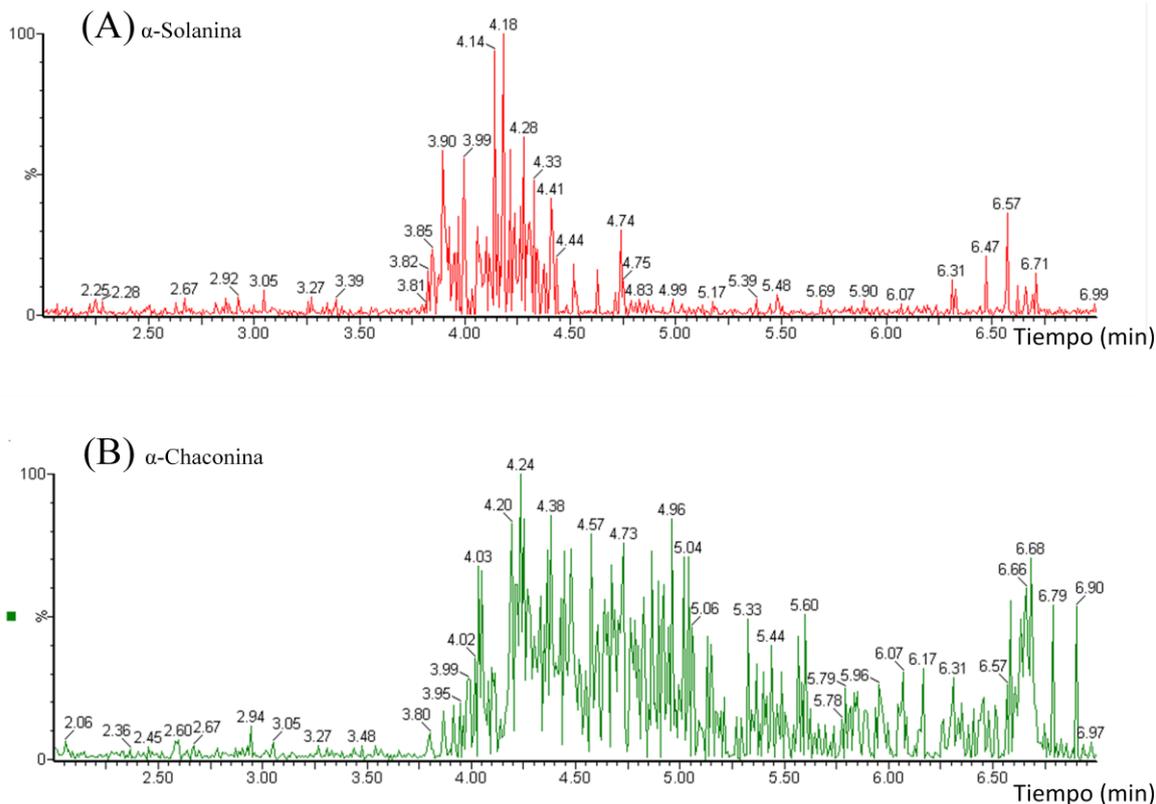
Una vez caracterizados los compuestos objeto de análisis y fijados los parámetros para trabajar en MS, el paso siguiente fue optimizar las condiciones cromatográficas. Para ello, se realizaron estudios para elegir la fase móvil adecuada, flujo y temperatura de la columna así como la preparación de los viales.

### 5.2.1. Optimización de la columna cromatográfica

En primer lugar se llevó a cabo un estudio del tipo de columna cromatográfica que presentaba mejores características y resultados para llevar a cabo la determinación de los glicoalcaloides. Las columnas evaluadas fueron: Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 x 2.1 mm) con 1.7  $\mu$ m de tamaño de y Kinetex C18 (50x10mm, 2.6  $\mu$ m). Se concluyó que los resultados de sensibilidad eran mejores con la segunda columna que con la primera y por lo tanto se eligió ésta para realizar las posteriores experiencias. Además, el tamaño de partícula era superior, por lo que las presiones de trabajo eran inferiores, aunque no se observaba una pérdida significativa en la eficacia del proceso cromatográfico.

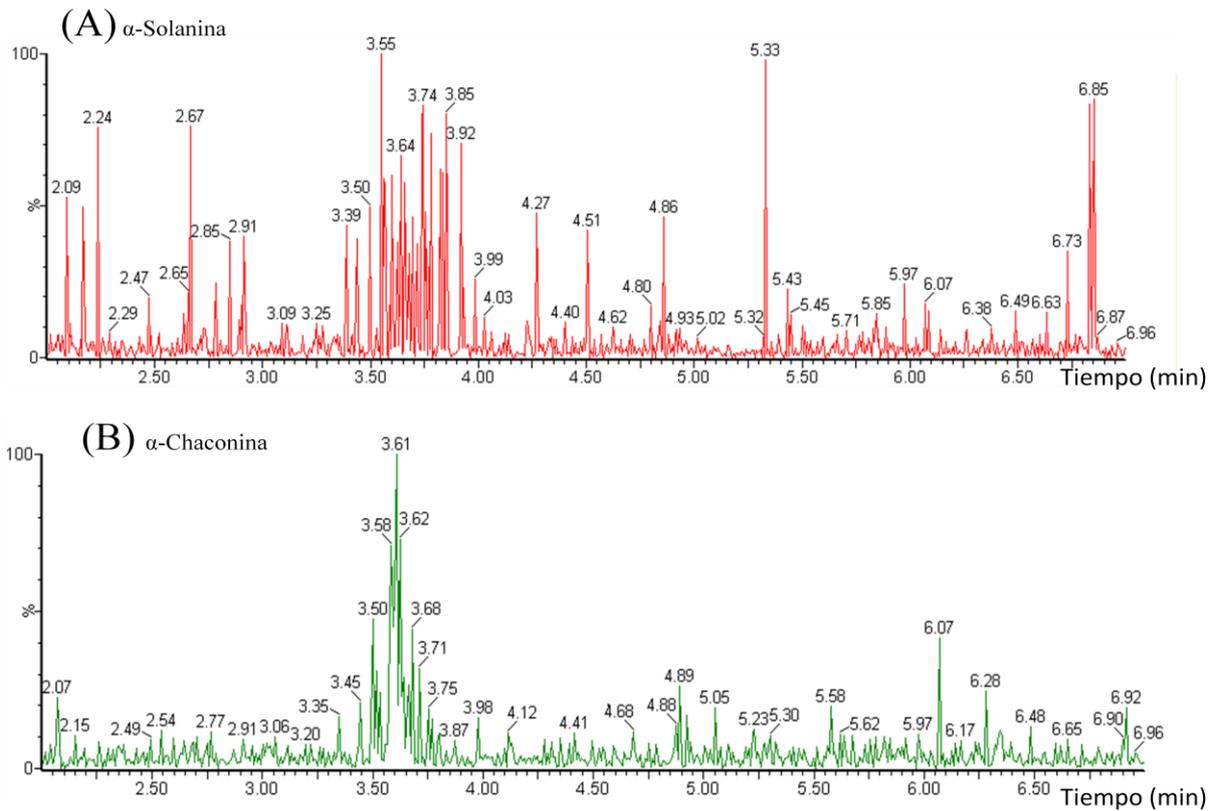
### 5.2.2. Optimización de la composición de la fase móvil

A continuación se optimizó la composición de la fase móvil. Durante todo el procedimiento de optimización se inyectó 1mg/L de los glicoalcaloides objeto de estudio. Para ello, primero se realizaron pruebas con las fases móviles encontradas en la bibliografía existente. En la mayoría de ellas se empleaba acetonitrilo como disolvente orgánico, siendo diferente la fase acuosa empleada. Así se puede utilizar una fase acuosa formada por 0.5% de ácido fórmico en agua (eluyente A) y acetonitrilo: 2 propanol: ácido fórmico (94.5:5:0.5, v/v/v) (eluyente B) [42], o bien, una fase móvil formada por 95% de agua, 5% acetonitrilo, 3mM de acetato amónico, como eluyente A y 5% agua, 95% acetonitrilo, 3mM acetato amónico para el eluyente B, [61]. Se decidió probar ésta última, sustituyendo el acetato amónico por formiato amónico y cuyos resultados se muestran en la Figura 6, donde se puede observar que las señales cromatográficas obtenidas para los compuestos eran poco sensibles.

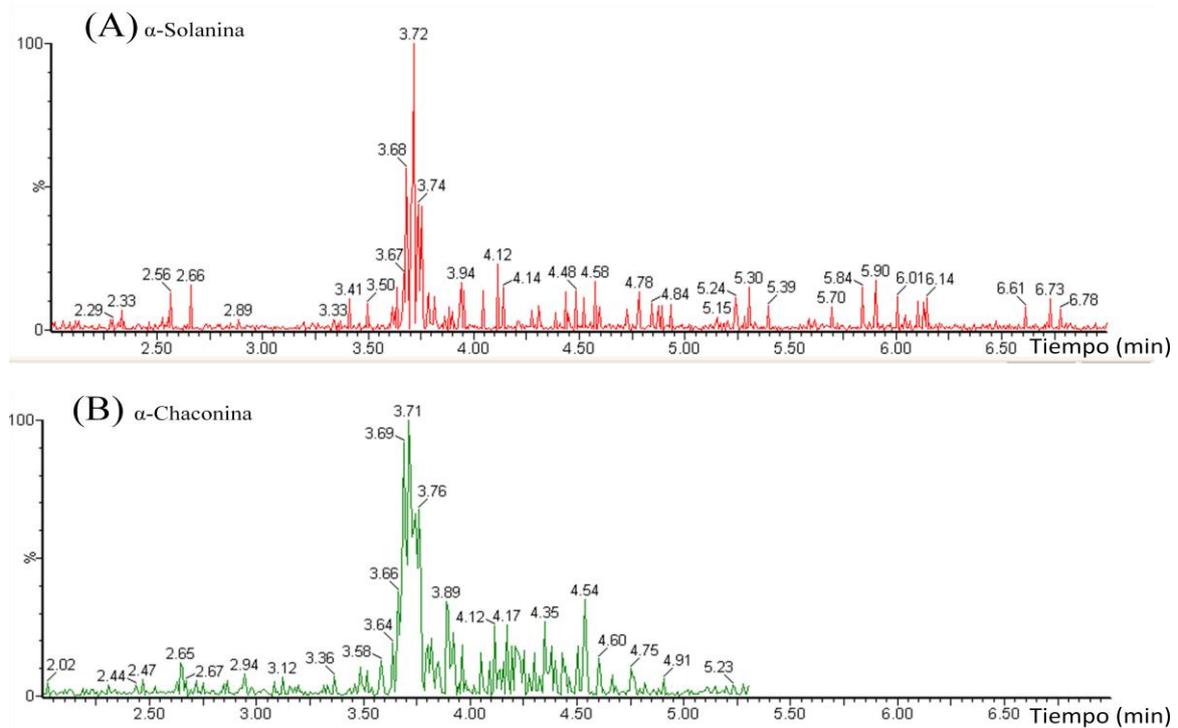


**Figura 6. Cromatogramas de iones totales (TICs) obtenidos al utilizar una fase móvil formada por eluyente A: 95% acetonitrilo-5% agua-3 mM y eluyente B: 95% agua, 5% acetonitrilo, 3 mM de formiato amónico.**

A raíz de estos resultados se probó otro tipo de fase móvil, compuesta por una mezcla de acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido fórmico (0.01 % v/v), obteniendo los resultados mostrados en la Figura 7. Como se puede observar, no se obtuvieron señales adecuadas para la determinación de los compuestos, por lo que se decidió incrementar la cantidad de ácido fórmico adicionada al agua (0.1 %). Sin embargo, este incrementó tampoco mejoró la señal relativa a los glicoalcaloides, por lo que se decidió sustituir el ácido fórmico por formiato amónico. Para ello se utilizó como fase acuosa una disolución de formiato amónico 5 mM, mejorando los resultados en relación a la utilización de ácido fórmico, por lo que se decidió incrementar la concentración de formiato amónico (20 mM), obteniendo los resultados mostrados en la Figura 8, observándose una mejora en la respuesta obtenida para ambos compuestos.

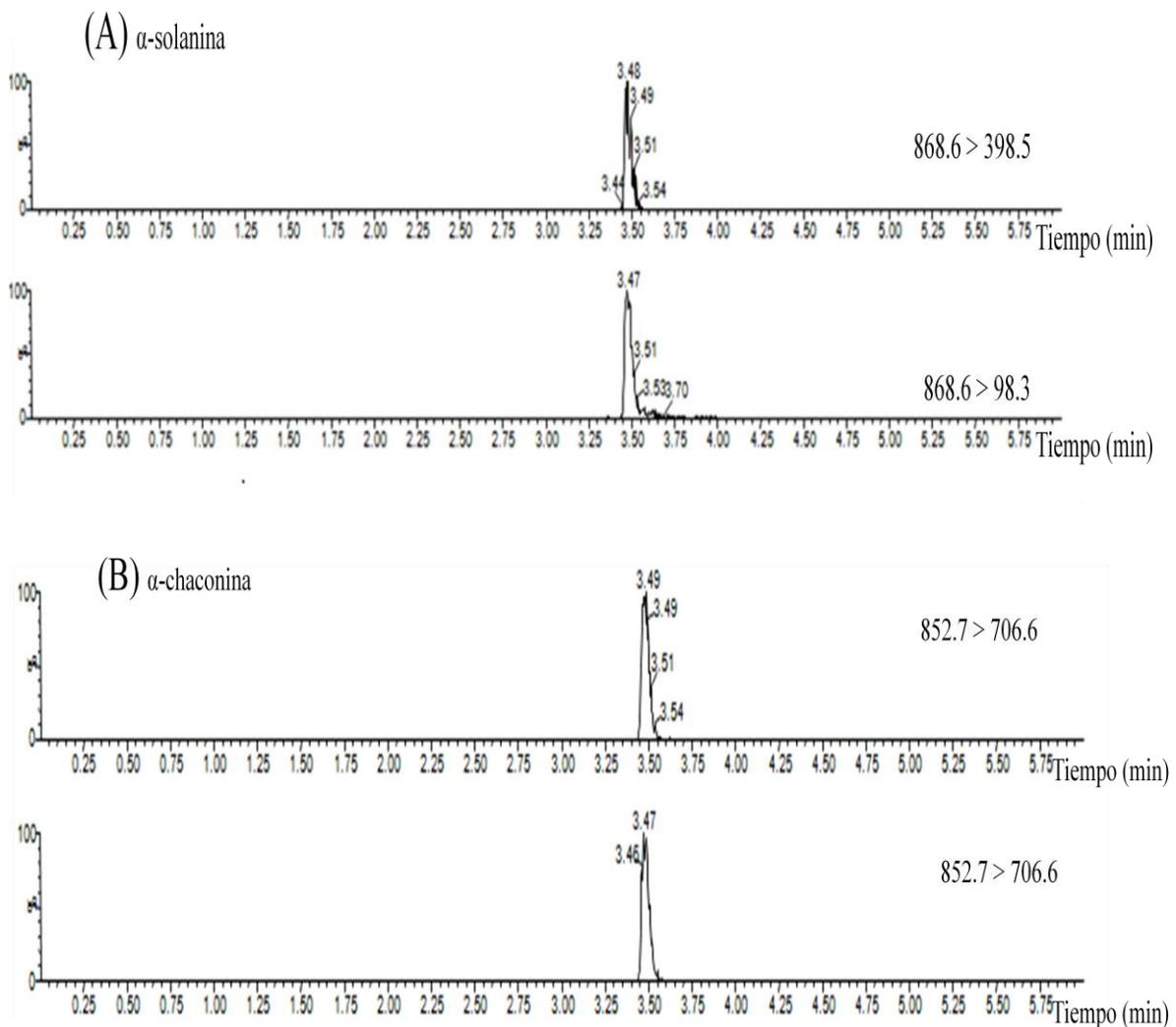


**Figura 7. TICs obtenidos empleando como fase móvil acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido fórmico (0.01% v/v)**



**Figura 8. TICs obtenidos empleando como fase móvil acetonitrilo y una disolución acuosa de formiato amónico 20 mM**

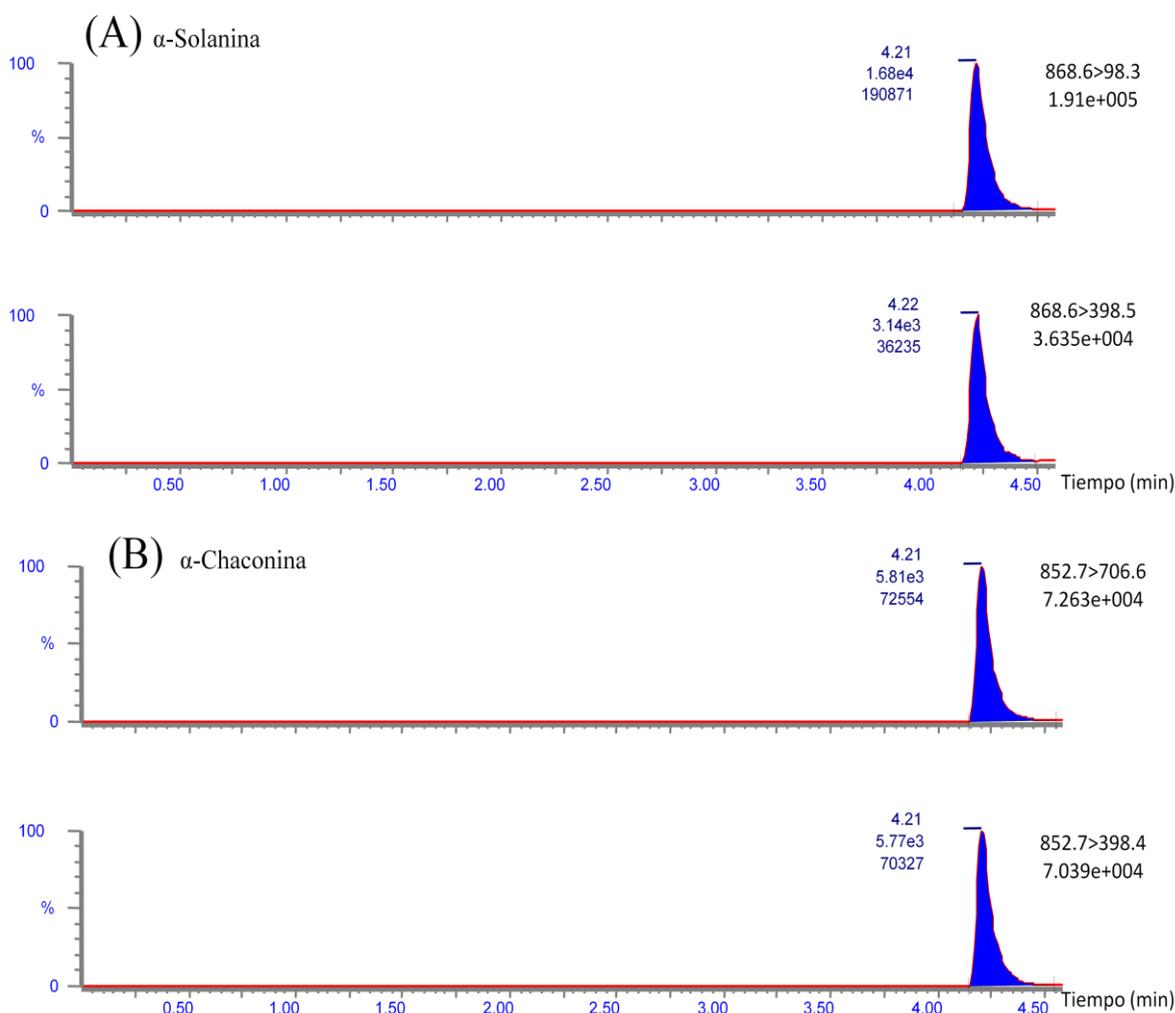
Tras no obtener resultados adecuados y basándonos en la bibliografía consultada en la que también se proponía el empleo de metanol como disolvente orgánico en la fase móvil [68], el siguiente paso fue sustituir el acetonitrilo por el metanol además de utilizar formiato amónico 1mM y de ácido fórmico (0.01 %, v/v) como sugerían otros artículos donde se realizaba un estudio de extracción simultanea de determinación de pesticidas, micotoxinas y toxinas en plantas así como drogas veterinarias en matrices alimentarias [43], obteniendo los finalmente los cromatogramas que se indican en la Figura 9.



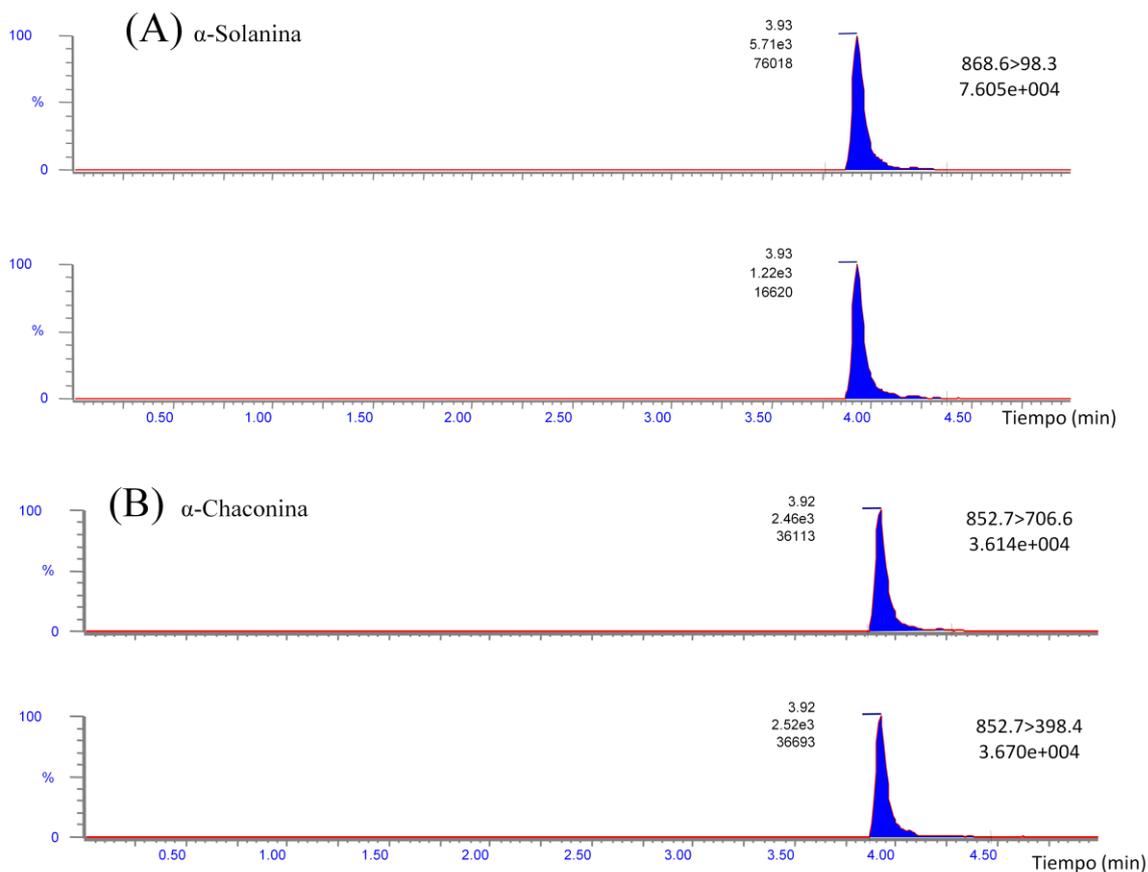
**Figura 9. Cromatogramas obtenidos para (A)  $\alpha$ -solanina y (B)  $\alpha$ -chaconina utilizando la siguiente fase móvil: Eluyente A: Disolución acuosa de ácido fórmico (0.01%) y formiato amónico 1mM y eluyente B: Metanol: agua (95:5, v/v) contenido 0.01% ácido fórmico y 1mM formiato amónico.**

5.2.3. Optimización del disolvente de inyección.

A continuación, se evaluó el mejor procedimiento para la preparación de los viales, previa a la inyección cromatográfica. Para ello se prepararon dos viales de concentración 100  $\mu\text{g/L}$  en una mezcla de fase móvil (1:1) y en metanol, obteniendo los resultados mostrados en las Figuras 10 y 11. Al estudiar los tiempos de retención para cada compuesto, intensidad de la señal y forma de pico, se puede observar que para ambos compuestos se obtenía mejor sensibilidad cuando el vial era preparado en fase móvil, por lo que para posteriores experiencias, las muestras para su inyección se prepararon en la correspondiente mezcla de fase móvil.



**Figura 10. Cromatogramas obtenidos para una disolución de glicoalcaloides (100  $\mu\text{g/L}$ ) preparada en fase móvil, (A)  $\alpha$ -solanina y (B)  $\alpha$ -chaconina.**



**Figura 11. Cromatograma obtenido para una disolución de glicoalcaloides (100  $\mu\text{g/L}$ ) preparada en metanol, (A)  $\alpha$ -Solanina y (B)  $\alpha$ -Chaconina.**

#### 5.2.4. Optimización de la temperatura de la columna

Seguidamente se realizó la optimización de la temperatura de la columna, modificándola entre 25 y 35  $^{\circ}\text{C}$ , mostrando los resultados obtenidos en la Tabla 3. Se puede observar que la mayor intensidad para cada uno de los analitos de estudio se obtuvo a una temperatura igual a 30  $^{\circ}\text{C}$ , seleccionando dicha temperatura para posteriores experiencias.

**Tabla 3. Influencia de la temperatura de la columna en la intensidad de los glicoalcaloides.**

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Intensidad solanina	Intensidad chaconina
35 $^{\circ}\text{C}$	$1.51 \times 10^5$	$5.04 \times 10^4$
30 $^{\circ}\text{C}$	$1.90 \times 10^5$	$7.26 \times 10^4$
25 $^{\circ}\text{C}$	$1.11 \times 10^5$	$4.71 \times 10^4$

### 5.2.5. Optimización del flujo de la fase móvil

A continuación se procedió a la optimización del flujo cromatográfico, de modo que se pudiese conocer en qué medida afecta este parámetro a la forma de los picos cromatográficos, evaluando el flujo de fase móvil entre 0.20 y 0.45 mL/min.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4, en la que se puede observar que el flujo que proporciona una mejor respuesta analítica es el de 0.25 mL/min, seleccionándolo para posteriores experiencias. Además se puede indicar, que cuando se emplea dicho flujo se obtiene una correcta elución de los compuestos, permitiendo un tiempo de análisis inferior a 5 minutos, y un consumo reducido de disolvente.

**Tabla 4. Influencia del flujo de fase móvil en la intensidad de los glicoalcaloides.**

FLUJO (mL/min)	INTENSIDAD TRANSICIÓN			
	SOLANINA	Tiempo (min)	CHACONINA	Tiempo(min)
0.45	$1.19 \times 10^5$	3.88	$5.01 \times 10^4$	3.87
0.40	$1.76 \times 10^5$	3.93	$5.01 \times 10^4$	3.92
0.35	$1.16 \times 10^5$	3.98	$4.40 \times 10^4$	3.98
0.30	$1.79 \times 10^5$	4.08	$7.08 \times 10^4$	4.07
0.25	$1.91 \times 10^5$	4.21	$7.26 \times 10^4$	4.21
0.20	$1.78 \times 10^5$	4.48	$5.70 \times 10^4$	4.47

### 5.2.6. Optimización del dwell-time

El *dwell time* óptimo para cada glicoalcaloide fue estudiado ya que es un parámetro importante y necesario de optimizar, porque representa el tiempo que el analizador va a estar adquiriendo un determinado ion, lo que influye en la sensibilidad y depende del número de iones que el equipo monitorice de manera simultánea.

La influencia del *dwell-time* en la señal de pico de cada compuesto, fue evaluada entre 0.005 s y 0.100 s, mostrándose que un valor de 0.05 s proporcionaba una buena sensibilidad y forma de pico para los compuestos objeto de estudio.

### 5.3. Optimización del método de extracción

Optimizado ya el proceso de separación cromatográfica se procedió al estudio del proceso de extracción. Para ello se aplicó un método A (inicial) desarrollando el método QuEChERS para lo cual, se utilizan muestras de patata (10 g) de la variedad monalisa, calibre 50/80 mm. Después de homogenizar la muestra, se adiciona ácido ascórbico (0.5g/100g patata) para evitar la oxidación de los compuestos presentes en la patata y posterior adición de 10 mL de acetonitrilo acidificado al 1 % con ácido acético y 4 g de sulfato de magnesio y 1 g de acetato sódico anhidro, a continuación se agitó manualmente y después se centrifugó la mezcla para su separación. Para realizar este procedimiento de extracción se realizaban tres réplicas (fortificadas a 10 mg/L) y un blanco. Las recuperaciones encontradas con este método de extracción (A) eran superiores al 120%, probablemente debido a la coextracción de otras sustancias en la muestra, por lo que se realizaron modificaciones al método A, para mejorar dichos valores de recuperación.

Las modificaciones realizadas al método A, fueron las siguientes:

#### 5.3.1. Adición de agua a la muestra antes del proceso de extracción.

El método QuEChERS fue desarrollado para la extracción de compuestos con alto contenido en agua. A pesar de que la patata tiene un porcentaje en agua elevado (60% aproximadamente) se adicionó un volumen de agua a la muestra previo al proceso de extracción. Para este paso se tomaron 5 g de patata y 5 mL de agua en un tubo de polipropileno, realizando el procedimiento descrito anteriormente, fortificando la muestra de patata a 10 mg/L (3 réplicas). Los resultados obtenidos al adicionar agua permiten obtener recuperaciones inferiores al 100%, como pueden observarse en la Tabla 5.

**Tabla 5. Recuperaciones obtenidas tras la adición de agua durante el proceso de extracción.**

COMPUESTO	Recuperación (%)	DER <sup>a</sup>
$\alpha$ -Solanina	57.0	22.6
$\alpha$ -Chaconina	63.1	30.4

<sup>a</sup> Desviación estándar relativa (n=3)

### 5.3.2. Efecto de la etapa de limpieza.

Las recuperaciones obtenidas al añadir la etapa de adición de agua al procedimiento inicial, eran inferiores al 70 %. No obstante, se decidió incluir una etapa de limpieza para eliminar distintos componentes coextraídos con los glicoalcaloides.

La etapa de limpieza estaba basada en la extracción en fase sólida (SPE) y consistía en emplear cartuchos C<sub>18</sub> Sepk-pack a través de los cuales se les hacía pasar el sobrenadante obtenido tras la etapa de centrifugación.

En primer lugar se realizaron dos pruebas donde se realizaron tres réplicas fortificadas a 5 mg/L y un blanco. Una de ellas se realizó con 10 g de patata y la otra se realizó con 5 g de patata y 5 mL de agua. Se compararon ambas metodologías para comprobar si aún desarrollando la etapa de limpieza los resultados seguían siendo mejores para la prueba en la que se adicionaba agua que en la que no se realizaba esta adición. Tras realizar los cálculos se comprobó que las recuperaciones para el ensayo realizado con los 10 g de patata sin adición de agua eran inferiores al 30% (datos no mostrados), mientras que para el desarrollado con 5 g de patata y 5mL de agua, las recuperaciones tras realizar la etapa de limpieza estaban comprendidas entre 70 y 120 %

El siguiente paso fue realizar un ensayo más, donde se realizaron 5 réplicas fortificadas a 10 mg/L y un blanco, donde se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Efecto de la etapa de limpieza en las recuperaciones para ambos compuestos.**

COMPUESTO	Recuperación (%)	DER <sup>a</sup>
$\alpha$ -Solanina	74.5	16
$\alpha$ -Chaconina	96.0	21

<sup>a</sup> Desviación estándar relativa (n=5)

## 5.4. Validación del método analítico

Para estudiar la viabilidad de la metodología propuesta, se realizó la validación del método en muestras de patata, estimando los siguientes parámetros de validación: efecto matriz, linealidad, veracidad y precisión, límite de detección y de cuantificación.

### 5.4.1. Efecto matriz

Cuando se emplea ESI como técnica de ionización, uno de los principales problemas es la disminución o aumento de la señal debido a otros componentes presentes en la matriz (efecto matriz). Para evaluar este efecto matriz, se realizó un calibrado en disolvente (fase móvil) y otro en matriz, a distintas concentraciones (5 a 250  $\mu\text{g/L}$ ).

Las pendientes obtenidas en cada una de las curvas fueron comparadas y con ellas se calculó el efecto matriz (Tabla 7), entendido como el cociente entre ambas pendientes, asumiendo que hay un efecto matriz significativo si dicha relación es superior a 1.2 o inferior a 0.8, mientras que dicho efecto matriz sería poco significativo si está comprendido en ese intervalo.

**Tabla 7. Evaluación del efecto matriz.**

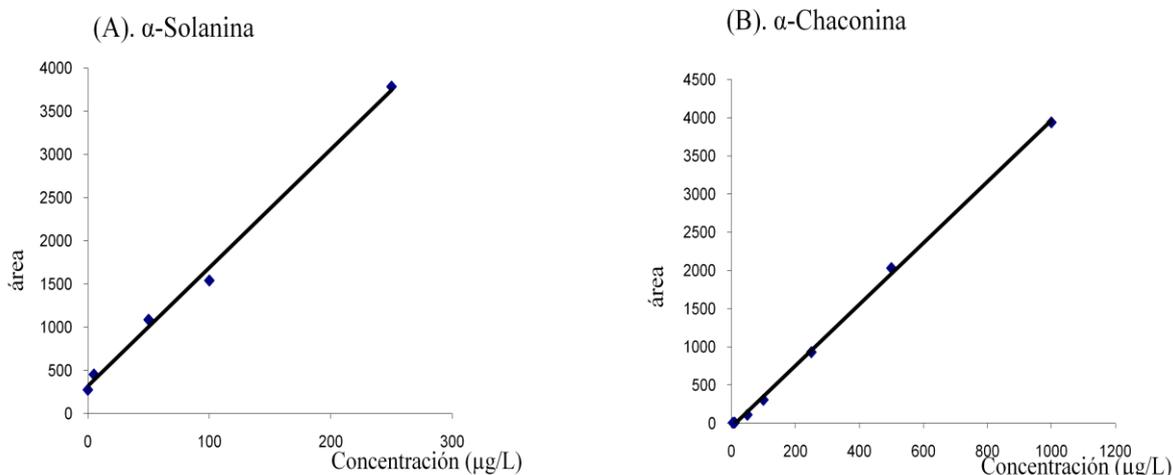
Compuesto	b disolvente	b matriz	b matriz/ b disolvente
$\alpha$ -Solanina	19.08	17.36	0.90
$\alpha$ -Chaconina	12.85	12.35	0.96

Al evaluar la relación de pendientes, se puede ver, que no existe efecto matriz, ya que para los valores obtenidos son de 0.90 y 0.96 para la  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina respectivamente. Por lo tanto para realizar el estudio de validación sería suficiente realizar un estudio de la curva de calibrado en disolvente. Una causa para explicar este bajo efecto matriz se puede deber a la dilución realizada al extracto antes de inyectar la muestra en el sistema cromatográfico.

### 5.4.2. Linealidad

La linealidad del método fue determinada en un rango de concentraciones comprendido entre 5 y 1000  $\mu\text{g/L}$ , evaluando distintas concentraciones (5, 50, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/L}$ ),

mostrando en la Figura 12 los resultados obtenidos, en la que se utiliza como señal analítica el área de pico. Los coeficientes de determinación fueron superiores a 0.99 tanto para el compuesto  $\alpha$ -solanina como para el compuesto  $\alpha$ -chaconina.



**Figura 12. Rectas de regresión obtenidas para los glicoalcaloides.**

#### 5.4.3. Veracidad y precisión del método

Para evaluar la recuperación de los dos compuestos,  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, se tomaron diferentes alícuotas de patata y se fortificaron con las soluciones madre a una concentración de 10 mg/L y 5 mg/L y se procedió a su extracción (S1). Para cada uno de los niveles se realizaron 5 replicas fortificadas y un blanco (S0), que se tuvo en cuenta para estimar los valores de recuperación a cada uno de los niveles, mostrando los resultados obtenidos en la Tabla 8. Se puede observar que para los dos niveles de concentración evaluados, se obtienen porcentajes de recuperación aceptables.

Para evaluar la precisión del método se realizó una experiencia de repetibilidad (precisión intradía) a 5 mg/kg y 10 mg/kg, mostrando los resultados mostrados en la Tabla 8 tras realizar 5 muestras fortificadas a ambos niveles el mismo día. De manera general se observó que los valores de la desviación estándar relativa (DER) eran inferiores al 22% para ambos compuestos a los dos niveles de concentración evaluados.

De igual manera a 10 mg/kg se evaluó la precisión inter-día, realizando repeticiones del ensayo durante 5 días consecutivos obteniendo DERs del 21 % y 23 % para la  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina respectivamente.

Tabla 8. Valores de recuperación para los dos niveles de fortificación.

Compuesto/Recuperación	5mg/kg	10mg/kg
$\alpha$ - Solanina	73.2 (16) <sup>a</sup>	72.1 (19) <sup>a</sup>
$\alpha$ - Chaconina	80.9 (19) <sup>a</sup>	82.5 (21) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Desviación estándar relativa (DER) entre paréntesis (n =5).

#### 5.4.4. Límite de detección y cuantificación

El estudio de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) se realizó mediante la preparación de disoluciones a concentraciones de 1, 5, 10, 50 y 200  $\mu$ g/kg, e inyectando en el sistema cromatográfico. Los límites se determinaron como la menor concentración de analito para la cual la relación señal-ruido (S/N) era de 3 para el LD y 10 para el LQ. Los resultados obtenidos fueron para el LD de 200  $\mu$ g/kg, y para el LQ de 1 mg/kg, por lo que el método propuesto permite la determinación de ambos compuestos por debajo de los valores considerados como tóxicos en patata.

### 5.5. Aplicación del método al análisis de muestras reales

La metodología analítica validada fue aplicada para la determinación de glicoalcaloides  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, en muestras de patata.

Para realizar la determinación en muestras reales se analizaron 10 muestras de patata. Con la finalidad de asegurar la calidad de los resultados obtenidos, al aplicar el método al análisis de muestras reales se estableció un control de calidad interno, que consistía en los siguientes controles:

- Análisis de una muestra fortificada antes y después de la extracción, así como de la misma sin fortificar para evaluar la eficacia del proceso de extracción, que debería estar comprendida 70-120%.

-Curva de calibrado para evaluar la sensibilidad y linealidad en el rango de trabajo.

Tras realizar las etapas que se han desarrollado anteriormente, etapa de extracción, mediante la técnica QuEChERS y detección mediante el empleo de la técnica UHPLC-MS/MS, aplicadas a muestras reales de patata, los valores obtenidos de cada uno de los compuesto a determinar en patata:  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, se encuentran recogidos en la Tabla 9.

**Tabla 9. Valores de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina en muestras reales de patata.**

Concentración mg/kg			
Muestra	Solanina	Chaconina	TOTAL
M1	52.0	45.8	95.8
M2	8.9	10.8	19.7
M3	5.0	8.8	13.9
M4	8.0	8.0	16.0
M5	4.0	6.7	10.8
M6	10.4	25.1	35.6
M7	4.3	14.2	18.6
M8	7.2	15.0	22.2
M9	8.9	18.8	27.8
M10	11.5	15.2	26.8

En primer lugar indicar que en ninguno de los casos analizados, el valor de glicoalcaloides,  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina estaban en niveles superiores a los recomendados de 200 mg/kg.

Al realizar el ensayo en muestras reales, primero se realizó un estudio visual de las características de cada una de las patatas a analizar. Pese a que en toda la documentación recogida para la elaboración de este trabajo se establece una clara relación entre color de la piel del tubérculo y presencia de glicoalcaloides, en algunos trabajos se demostraba que en algunas variedades no influye la coloración con el contenido de éstos [12], siendo por lo tanto este estudio visual no definitivo para la estimación de los niveles de glicoalcaloides.

En todas las muestras existía una gran homogeneidad, de forma alargada-redondeada, sin presencia de ojos y una coloración de distintos marrones. Sin embargo había dos muestras que

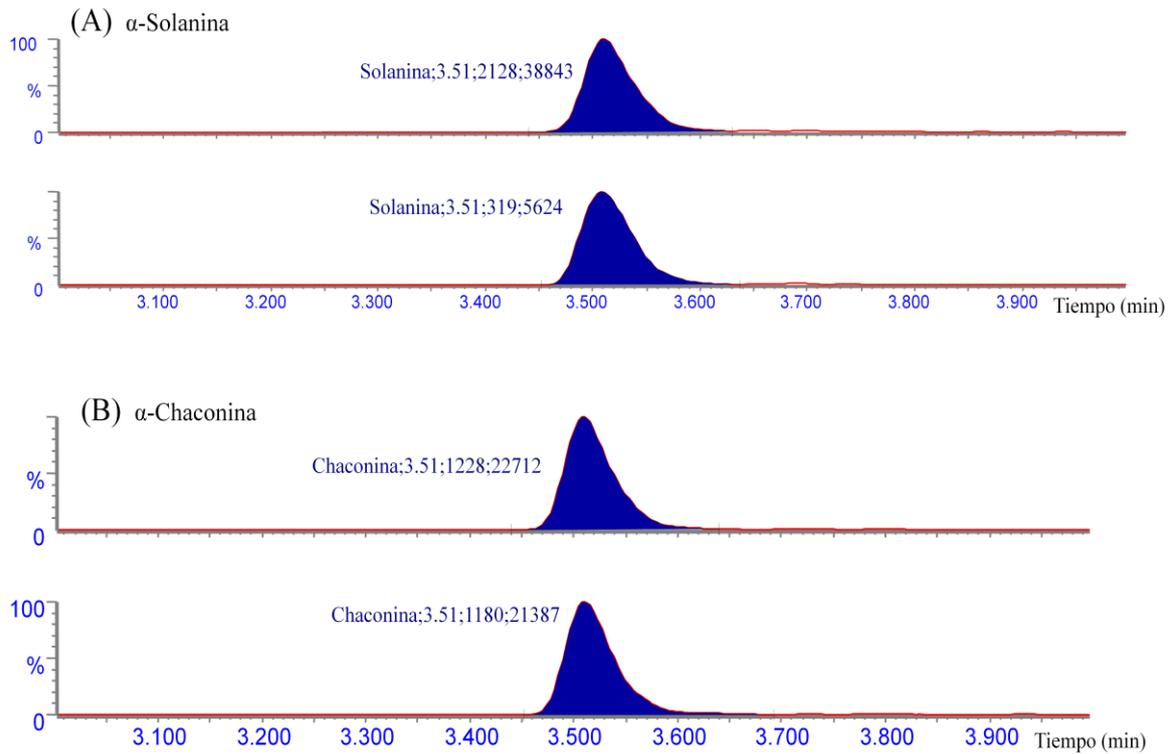
no encajaban en la descripción anterior. Una se trataba de la muestra M1 y la otra se correspondía con la muestra M9. En el caso de la muestra M1, se trataba de una patata vieja, arrugada y con presencia de algunos “ojos o yemas” y su coloración era de tonos marrones. En el caso de la patata M9, existían evidencias visuales de la presencia de glicoalcaloides, como era la coloración del tubérculo, de color verdosa y poca intensidad en el color marrón y presencia de pocas yemas.

Las muestras M1 y M9 eran los que presentaban un mayor contenido en glicoalcaloides  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, sobre todo en la muestra M1. En el caso de la muestra M9, la presencia de la coloración verdosa puede justificar el elevado contenido en  $\alpha$ -chaconina.

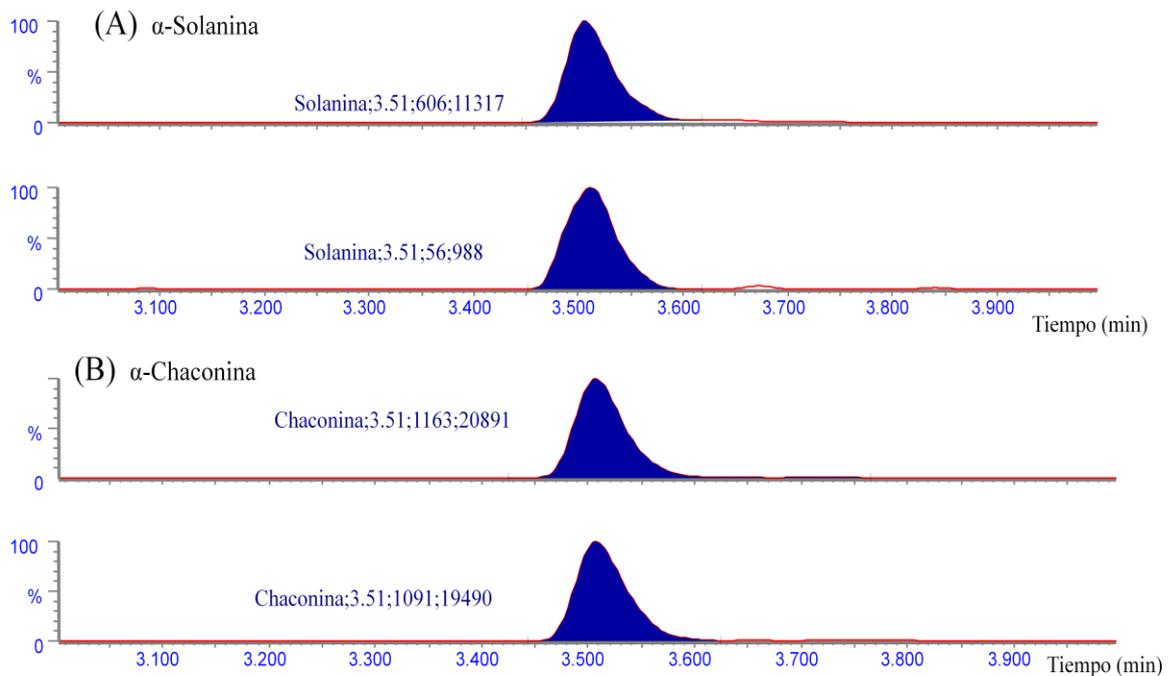
Sorprendentes fueron los resultados obtenidos para la muestra M6 y M10, debido a que visualmente, nada hacía evidenciar que tuvieran un contenido en glicoalcaloides superiores a las demás, sin embargo, el examen visual resultó erróneo. Por lo tanto, sería interesante profundizar en esta línea, afín de comprobar si existe realmente relación entre la coloración de la piel y el contenido de glicoalcaloides, así como la influencia en las condiciones de almacenamiento.

La media de las otras muestras se encuentra en valores inferiores a 30 mg/kg, mientras que para la muestra M1 y M6 se encuentra valores superiores a dicho límite.

Finalmente, en las Figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas obtenidos para la muestra M1 y para la muestra M7



**Figura 13. Cromatograma obtenido para la muestra M1, que contenía 52.0 mg/kg de (A)  $\alpha$ -solanina y 45.8 mg/kg de (B)  $\alpha$ -chaconina**



**Figura 14. Cromatograma obtenido para la muestra M7, que contenía 4.3 mg/kg de (A)  $\alpha$ -solanina y 14.2 mg/kg de (B)  $\alpha$ -chaconina.**

## 6. CONCLUSION Y TRABAJO DE FUTURO

Las principales conclusiones del presente estudio son:

- Se ha desarrollado un método sencillo, sensible y rápido para la determinación de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina en patata. La metodología utilizada, extracción QuEChERS y el uso de UHPLC-MS/MS, reduce costes y tiempo de análisis.
  
- El método desarrollado ha sido validado en términos de linealidad, veracidad, precisión y límites inferiores. Las recuperaciones estaban comprendidas entre 70 y 120 %, con valores de DERs inferiores al 25 %. Los límites de cuantificación obtenidos (1 mg/kg) permiten la cuantificación de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina a concentraciones inferiores a las consideradas como tóxicas.
  
- El método propuesto es capaz de extraer más de 10 muestras en una hora y los extractos se pueden analizar en una hora, por lo que se podría aplicar en análisis de rutina.

En relación a las propuestas de futuro sería necesario analizar estos compuestos, tanto en producto fresco para consumo directo por el consumidor, como para aquellos alimentos preparados o alimentación animal, que permitan asegurar la inocuidad para el consumidor final de todos aquellos productos que contengan patata en su composición.

Además, también serían convenientes incluir en el método otros glicoalcaloides, que aunque sean minoritarios, como  $\beta$ -solanina,  $\beta$ -chaconina,  $\gamma$ -solanina,  $\gamma$ -chaconina solasonina,  $\alpha$ -solamargina y  $\beta$ -solamargina, pueden también influir en la calidad del producto.

## 7. REFERENCIAS

- [1] N.C. Nevin, J.D. Merrett. Potato avoidance during pregnancy in women with previous infant with either anencephaly and/or spina bifida. *British Journal of Preventive and Social Medicine*, 29 (1975) 111-115
- [2] P. Slanina. Solanine (Glycoalkaloids) in potatoes Toxicological evolution. *Food Chemical Toxicology*, 28 (1990) 759-761
- [3] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (datos del año 2005 publicados en el año de la patata 2008, [www.fao.org](http://www.fao.org) (visita Abril. 2011)
- [4] C. Robinson. ILSI- Europe (2000). Alimentos y tecnología de modificación genética. Salud y seguridad en el consumidor. ([www.argenbio.org](http://www.argenbio.org)) (última visita Mayo. 201)
- [5] G. Llácer, M. J. Díez, J. M. Carrillo, M. L. Badenes. Mejora genética de la calidad en plantas. Sociedad Española de ciencias hortícolas. Sociedad española de genética. Universidad politécnica de Valencia (2006)
- [6] AESAN. Agencia española de Seguridad Alimentaria y nutrición. ([www.aesan.mspsi.es](http://www.aesan.mspsi.es)) (última visita 17.06.2011)
- [7] Reglamento (CE) No 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de las comunidades europeas L31 (2002)1-24
- [8] Agricultura y Alimentación. Estudio sobre la comercialización agroalimentaria en el sector cooperativo español. Ministerio de Medio Ambiente. CAPITULO II Caracterización del mercado y de la comercialización de la patata en las cooperativas agrarias (2004) [www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo/comercialización-y-distribucion\\_alimentaria/PATATA\\_tcm7-7901.pdf](http://www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo/comercialización-y-distribucion_alimentaria/PATATA_tcm7-7901.pdf)
- [9] T. Rivas y C. Picot. Congreso la seguridad alimentaria y los consumidores. (2000) Conclusiones [www.ceaccu.org](http://www.ceaccu.org) (última visita Abril. 2011)
- [10] Organización Mundial de la Salud. Serie de informes técnicos. N° 184 Conferencia técnica Europea sobre infecciones e intoxicaciones alimentarias.(Ginebra, 16-21 de febrero de 1959).[www.fao.org](http://www.fao.org) (última visita Mayo. 2011)
- [11] M<sup>a</sup> T. León Espinosa de los Monteros, M<sup>a</sup> D. Castillo Sánchez, F. Cobo Martínez, M. León Espinosa de los Monteros. Educación sanitaria en nutrición y alimentación. 2<sup>a</sup> Edición (2002) Editorial, Formación Alcalá.

- [12] W. Rolando. Proyecto previo a la obtención del título de ingeniero agroindustrial. Escuela politécnica Nacional de Quito. Facultad de ingeniería química. Evaluación del contenido de glicoalcaloides en el pelado, cocción y fritura de variedades de papa nativa. (2011)
- [13] Organización Mundial de la Agricultura y la Alimentación. (FAO) Agricultura y diálogo de culturas, nuestro patrimonio común.(2005) [www.fao.org](http://www.fao.org) (última visita Mayo 2011)
- [14] M. De Andrade. Que antecedente familiar Terrible. *Arquivos Brasileiros de Endocrinología y Metabolismo* 48 (2004) 572-574
- [15] FAO, (NeBambi Lutaladio). Dia mundial de la alimentación (2005) La patata, alimento de futuro. [www.alimentacion-sana.org](http://www.alimentacion-sana.org) (última visita Mayo 2011)
- [16] La papa un tesoro enterrado. Utilización y usos de la papa. Año internacional de la papa 2008 [www.potato2008.org](http://www.potato2008.org) (última visita Abril.2011)
- [17] M. Friedman. Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2008) 8655-8681
- [18] K. E Hellenäs, C. Branzell, H. Johnsson, P. Slanina. High levels of glycoalkaloids in the established Swedish potato variety Magnum Bonum. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 68 (1995) 249-255.
- [19] M. Lachman, J.K. Hamouz, M. Orsák, V. Pivec. Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition. *Rostlinna Vyroba*, 47 (2001) 181-191
- [20] O. Lock de Ugaz. Investigación fitoquímica de métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Primera edición, 1988
- [21] P. Knuthsen, U. Jensen, B. Schmidt, I. K. Larsen. Glycoalkaloids in potatoes: Content of glycoalkaloids in potatoes for consumption. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (2009) 577-581
- [22] M. Friedman, G. McDonald, W.F. Haddon. Kinetics of acid catalyzed hydrolysis of carbohydrate groups of potato glycoalkaloids  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (1993) 1397-1406
- [23] M. Friedman, G. M. McDonald, Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Critical Reviews in Plant Science*, 16 (1997) 55-132
- [24] N. Trautmann. La dosis hace al veneno, ¿cierto o no? Artículo original de actionbioscience. [www.actionbioscience.org](http://www.actionbioscience.org) (última visita Mayo. 2011)
- [25] J. T. Blankemeyer, B. K. Stringer, J. R. Rayburn, J. A Bantle, M. Friedman. Effect of potato glycoalkaloids,  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine, on membrane potential of frog embryos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (1992) 2022-2025

- [26] S. G. Willmott. An investigation of solanine poisoning. *Analyst*, 58 (1933) 431-438
- [27] J. Araujo Díaz, R. Salas Asencios. Actividad antimicrobiana de plantas. *Revista científica del Sur*, 6 (2008) 6-18
- [28] M<sup>a</sup> C. Martínez Lombardo, A. Cano Ortiz. Plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén. Departamento Biología Animal, Vegetal y Ecología. Área de Botánica. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Boletín. Instituto de Estudios Giennenses Julio-Diciembre, 200 (2009) –125-163
- [29] B. C. Patil, R. P. Sharma, D. K. Salunkle, K. Salunkle. Evaluation of solanine toxicity. Interdepartmental Program in Toxicology. *Food and cosmetic toxicology*, 10 (1971) 395-398
- [30] A. Bonilla, Toxinas en las papas 1/12/2003 Asuntos agrícola. [www.alexanderbonilla.com](http://www.alexanderbonilla.com) (última visita Marzo. 2011)
- [31] R. M. D. Machado, M. C. F. Toledo, L. C. García. Effect of light and temperature on the formation of glycoalkaloids in potato tubers. *Food Control*, 18 (2007) 503-508
- [32] J. R. Bushway, R. Ponnampalam.  $\alpha$ - Chaconine and  $\alpha$ - Solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29 (1981) 814-817.
- [33] S. J. Jadhav, R. P. Sharma, D. K. Salunkle. Naturally occurring toxic alkaloids in foods. *Critical Reviews in Toxicology*, 9 (1981) 21-101.
- [34] FAO/WHO, (1999) Summary of evaluations performed by the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) ILSI Press. [www.fao.org](http://www.fao.org) (última visita Abril 2011)
- [35] RD 31/2009 de 16 de Enero, por el que se aprueba la norma de calidad comercial para las patatas de consumo en el mercado nacional y se modifica el anexo I del Real Decreto 2192/1984, de 28 de noviembre, por el que se aprueba el Reglamento de aplicación de las normas de calidad para las frutas y hortalizas frescas comercializadas en el mercado interior. BOE 21 (2009) 8175-8182
- [36] C. Arbizu, M. Tapia. Centro internacional de la papa, Lima. Perú. Origen de las papas amargas. Cultivos andinos. [www.fao.org](http://www.fao.org) (última visita Abril. 2011)
- [37] ALIMENTOS ECOLOGICOS .(2008) [www.marm.es](http://www.marm.es) (última visita Mayo.2011)
- [38] The Word of Food Science ([www.worldoffoodscience.org](http://www.worldoffoodscience.org)) (última visita Mayo 2011)
- [39] R.C. Eanes, N. Tek. Solid-phase microextraccio (SPME) followed by on-fiber derivatization of solasodine and solanidine aglycones of steroidal glycyalkaloides. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31 (2008) 1132-1146.

- [40] P. Abreu, A. Relva, S. Mattew, Z. Gomes, Z. Morais. High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potatoes from conventional, integrated, and organic crop systems. *Food control*, 18 (2007) 40-44
- [41] M. Distl, M. Sibum, M. Wink. Combination of On-Line Solid-Phase Extraction with LC-MS for the determination of potentially hazardous glycoalkaloids in potato products. *Potato Research*, 52 (2009) 39-56
- [42] A.T. Paul, S. Vir, K. K. Bhutani. Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum* and effect of different extraction methods on their content. *Journal of Chromatography A*, 1208 (2008) 141-146
- [43] H. G. J. Mol, P. Plaza Bolaños, P. Zomer, T. C. De Rijk, A. A. M. Stolker, P. P. J. Mulder. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 9450-9459.
- [44] EN 15662 Version 2007-10-24, Foods of Plant Origin-Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE (Quechers-method)
- [45] J. Y. Park, J. H. Choi, A. M. Abd El-Aty, B. M. Kim, J. H. Oh, J. A. Do, K. S. Kwon, Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method. *Food Chemistry*, 128 (2011) 241-253.
- [46] J. Fenik, M. Tankiewicz, M. Biziuk. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 814-826.
- [47] K. Xia, J. Atkins, C. Foster, K. Armbrust. Analysis of cyromazine in poultry feed using the QuEChERS method coupled with LC-MS/MS. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58 (2010) 5945-5949.
- [48] K. Mastovska, S. J. Lehotay. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 259 (2004) 259-272
- [49] M. Gamón Vila, Programa de vigilancia español de residuos de plaguicidas en vegetales. Diseño, metodologías analíticas y resultados, I Congreso Nacional de Laboratorios Agroalimentarios. Lugo, (2004).
- [50] S. L. Love, T. P. Baker, A. Thompson-Johns, B. K. Werner. Induced mutations for reduced tuber glycoalkaloids content in potatoes. *Plant Breeding* 115 (1996) 119-122.

- [51] S. J. Jadhav, S. E. Lutz, G. Mazza, D.K. Salunkhe. Potato Glycoalkaloid. *Chemical, Analytical, and Biochemical Perspectives*. ACS Symposium, 662 (1997) 94-114.
- [52] M. Friedman, F. Bautista, L. H. Stanker, K. A. Larkin. Analysis of Potato Glycoalkaloids by a New ELISA Kit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46 (1998) 5097-5102.
- [53] R. Driedger, J. Raynald J. LeBlanc, Eileen L. LeBlanc, P Sporns. A capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for analysis of potato glycoalkaloids based on a solution-phase immunoassay. *Journal of Agriculture and Food Chemical*, 48 (2000) 4079-4082.
- [54] P. A. Soldatkin. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs. *Talanta*, 66 (2005) 28-33.
- [55] A. Sanabria Galindo, P. Heredia, M. A. Velázquez, J. Moreno. Glicoalcaloides como criterio de selección en clones de papa colombiana. *Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas* N° 19 (1991).
- [56] R. J. Bushway, E. S. Barden, A. W. Bushway, A. A. Bushway. High-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography*, 178 (1979), 533-541.
- [57] M. Dömötöröva, E. Matisová. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis *Journal Chromatography A*, 1207 (2008) 1-16
- [58] R.S. Sheridan, J.L. Kemnah. Glycoalkaloid content in pet food by UPLC-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 48 (2010) 790-794
- [59] R. Li, L. Dong, J. Huang. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma. *Analytical Chemical ActA*, 546 (2005) 167-173
- [60] R. J. Houben, K. Brunt. Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 661(1994) 169-174.
- [61] P. H. Jensen, R. K. Juhler, N. J. Nielsen, T. H. Hansen, B. W. Strobel, O.S. Jacobsen, J. Nielsen, H. C. B. Hansen. Potato glycoalkaloids in soil-optimising liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, 1182 (2008) 65-71
- [62] F. Ieri, M. Innocenti, L. Andrenelli, V. Vecchio, N. Mulinacci. Rapid HPLC/DAD/MS method to determine phenolics acids, glycoalkaloids and anthocyanins in pigmented potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and correlations with variety and geographical origin. *Food Chemistry*, 125 (2011) 750-759

- [63] R. Shakya, D.A. Navarre. Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 5253-5260
- [64] B. Simonovska, I. Vovk. High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography A*, 903 (2000) 219-225
- [65] E. Hoffman, V. Stroobant. *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 2<sup>a</sup> ed. Paris, *Jonh Wiley & Sons LTD*, (1999)
- [66] O. Núñez, E. Moyano, M. T. Galcerán. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends Analytical Chemistry*, 24 (2005) 683-703
- [67] Directiva 2002/657/CE de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se modifica la Directiva 96/23/CE relativa al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 221 (2002) 8-36
- [68] J Mader, R. Harshadrai, W.K. Lothar. Composition of Phenolic compounds and glycoalkaloids solanine and chaconine during commercial potato processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57 (2009) 6292–6297