

PID 9055

Ocurrencia de alternariol y alternariol monometil éter en jugos de manzana de consumo masivo en la Provincia de Entre Rios, Argentina

Broggi, Leticia E.; Reinoso, Cora M.**; Resnik, Silvia L***; Martínez, Fernanda*; Drunday, Vanesa*****

AUTORES: * Facultad de Bromatología, UNER, ** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA;*** Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires; **** Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz

CONTACTO: leticiabroggi2003@yahoo.com.ar

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar el índice de contaminación de toxinas de *Alternaria*, alternariol y alternariol monometil éter en jugos de manzana consumidos en la Provincia de Entre Ríos, Argentina, como así también desarrollar una metodología analítica para la detección y cuantificación de estas toxinas. Se analizaron 37 muestras jugos de manzana, adquiridas en supermercados, almacenes y kioscos de la ciudad de Gualeguaychú, Entre Ríos.

La cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y una columna Thermo BDS Hypersyl. La recuperación para ambas toxinas fue del 89%, los límites de detección fueron 0,62 ng/ml para alternariol y 1,98 ng/ml para monometil éter y los límites de cuantificación fueron 1,0 ng/ml y 3,4 ng/ml respectivamente.

No se detectó contaminación por estas toxinas en los jugos analizados. Las metodologías desarrolladas resultaron sensibles y rápidas para cuantificar dichas toxinas en jugos de manzana.

Palabras clave: Jugo de manzana, alternariol, alternariol monometil éter, micotoxinas

Occurrence of Alternariol and Alternariol monomethyl ether in apple juices of massive consumption sold in Entre Rios, Argentina

Abstract

The aim of this study was to evaluate the occurrence of the *Alternaria* metabolites, alternariol and alternariol methyl ether consumed in Entre Rios, Argentina, as well as to developed an analytical methodology to detect and quantify these toxins. Thirty seven samples were purchased in supermarkets and grocery stores of Gualeguaychu city, Entre Rios. The quantification of the toxins were carried out by high performance liquid chromatography with photodiode array detector and a Thermo BDS Hypersyl column. Mean recoveries were 89% for both toxins and limit of detection were 0,62 ng /ml and 1,98 ng /ml for AOH and AME respectively meanwhile quantification limits were 1 ng/ml for alternariol and 3.4 ng/ml for alternariol monomethyl ether. No contamination of these *Alternaria* toxins were detected in the analyzed juices. The developed methodologies were sensitive and fast to quantify these toxins in apples juices.

Keywords: apple juice; alternariol; alternariol monomethyl ether; mycotoxin

I. Introducción

Argentina se encuentra entre los ocho principales países productores de manzanas (1). La producción argentina de manzanas es de 1,3 millones de toneladas, cultivada en una superficie total de 71.000 ha. La región productora de este cultivo, se localiza principalmente en el Alto Valle del Río Negro, donde se produce el 70% de la manzana del país (Neuquén y Río Negro suman el 80% de la superficie implantada) y en la provincia de Mendoza, Valle del Uco, el resto. Más de la mitad de esta producción se destina a la industria, debido al gran volumen de fruta que no cumple con las crecientes exigencias de calidad del mercado Internacional y local. El 80% de lo industrializado tiene como destino la molienda para jugo concentrado (2).

Los hongos del género *Alternaria* son comúnmente parásitos de plantas y de materiales orgánicos y existen especies cosmopolitas que se distribuyen en numerosos cultivos (3; 4; 5). Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales o granos almacenados causando considerables pérdidas debido a que intervienen en la descomposición y además pueden producir distintas toxinas.

Muchas especies de *Alternaria* producen metabolitos tóxicos. Las micotoxinas más frecuentes detectadas naturalmente son alternariol (AOH) y alternariol monometileter (AME) que pueden suponer un riesgo para la salud de los consumidores (6).

En Argentina se han realizado estudios sobre la micoflora contaminante de cereales, oleaginosas y otros productos, demostrándose la alta prevalencia de *A. alternata* en estos sustratos (3; 7; 8).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el índice de contaminación de toxinas de *Alternaria*, alternariol y alternariol monometil éter en jugos de manzana consumidos en la Provincia de Entre Ríos, Argentina, como así también desarrollar una metodología analítica para la detección y cuantificación de estas toxinas.

II. Material y métodos

II.1. Materiales y reactivos

Las toxinas, AOH y AME fueron adquiridas a Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), las soluciones estándares se prepararon en forma separada en metanol para obtener soluciones stock de 500 µg/ml. Todos los reactivos utilizados tenían calidad HPLC. Se utilizó metanol Tedia (Fairfield, OH, USA), ácido fosfórico (J.T. Baler, Mallinckodt, Xalastoc, Mexico) .

El agua empleada fue purificada por el sistema NANO pure Diamond (Barnstead International, US). Todas las soluciones fueron filtradas a través de membranas de 0,45 µm para remover impurezas.

II.2 Muestras

Se analizaron 37 muestras de jugo de manzana listo para consumir y jugo concentrado, todos ellos de producción nacional. Estos fueron adquiridos en supermercados, almacenes y kioscos de la ciudad de Gualaguaychú. Se eligieron muestras de distintas partidas y origen, principalmente los que estaban envasados en forma tetra pack y también se adquirieron algunas muestras contenidas en envases de polietilentereftalato (PET). En todos los casos, en cada establecimiento, se compró un solo envase de cada producto ya que el número de bebidas de la misma marca no superaba las 10 unidades (**Tabla 1**).

TABLA 1. Muestras jugos de manzana producidos en Argentina y comercializados en la provincia de Entre Ríos.

Muestra	Origen	n	Concentrados
BC La Campagnola	Córdoba	2	
Baggio Light	Mendoza	3	
Baggio Pronto	Mendoza	3	
Baggio Pronto	Entre Ríos	5	
Baggio	Entre Ríos	1	
Reddy	San Luis	3	
Cepita	Buenos Aires	5	
Super Juvín	Entre Ríos	1	*
Juvín	Entre Ríos	3	*
Miju	Entre Ríos	3	*
Yahoo	Córdoba	4	
Villa del Sur Levite	Buenos Aires	1	
La Campagnola	Córdoba	1	
Mocoreta	Entre Ríos	1	*
Frutafiel	Entre Ríos	1	*
Total		37	

II.3 Preparación de las muestras y condiciones cromatográficas

Los análisis se realizaron por triplicado. Los jugos fueron previamente filtrados. Se tomaron 5 ml de cada jugo, se pesaron en tubos y se protegieron de la luz con papel aluminio, se concentraron con corriente de nitrógeno previa adición de 1 ml de metanol hasta obtener aproximadamente 2 g de jugo y se transvasaron a viales para cromatografía.

La determinación de AOH y AME se realizó en un cromatógrafo Waters. Este cromatógrafo consta de dos módulos, un módulo de separación Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA), con termostato para muestras y columna, cinco carruseles para muestras, bomba cuaternaria e inyector automático, y un módulo Waters 2998 espectrofotómetro UV/Visible con arreglo de diodos con 512 fotodiodos. La columna utilizada fue Thermo BDS Hypersyl C18, 5 μ , 50 mm x 4.6 mm (Thermo Electrón Corporation, UK, 28105-254630, SN 0374779Q) con guarda columna BDS Hypersyl C18, 5 μ 10x 4 mm (Termo Scientific, UK). La longitud utilizada fue 256 nm, la temperatura de la columna 40° C y la temperatura de la muestra 10° C. El volumen de inyección fue 50 μ l. La fase móvil fue metanol y ácido fosfórico 1% (65:35). Se utilizó un gradiente de flujo de t=0 a t=15 min 0.7 ml/min, desde t= 15.1 a t=18 min 1 ml/min, y desde t= 19 a t=20 el flujo fue 0.7 ml/min .

III. Resultados y Discusión

Se inyectó una mezcla de estándares de AOH y AME en la columna con un rango de concentraciones de 0,08 a 10 μ g/g y 0,04 a 5 μ g/g respectivamente y se obtuvo una respuesta lineal. Se utilizaron curvas de calibración para la cuantificación de las toxinas con un R² de 0,9992 para AOH y 0,9995 para AME. Para confirmar la presencia de AOH y AME en las muestras se compararon con los espectros UV de

cada pico con el espectro de referencia obtenido por inyección de los respectivos estándares. Las recuperaciones se evaluaron por triplicado, tomando una muestra homogénea idéntica y agregándole distintas concentraciones de los estándares. El porcentaje de recuperación y los niveles de spikeado se muestran en la **Tabla 2**. Los valores promedio de recuperación fueron 89,5% para AOH y 89% para AME. Estos porcentajes de recuperación resultaron para AOH superiores a los informados por Delgado y col. (1996) en jugos de manzana utilizando extracción en fase sólida y HPLC (9) y a los obtenidos en un trabajo posterior por Delgado y Gómez-Cordovés (1998) en jugos concentrados (10), mientras que para AME los porcentajes fueron levemente inferiores.

TABLA 2. Recuperaciones promedio y coeficiente de variación (CV%) de AOH y AME.

Muestras	Nivel de AOH agregado (µg/ml)	Recuperación promedio (%)	CV (%)
	200	89,5	15,8
Jugos de manzana	Nivel de AME agregado (µg/ml)	Recuperación promedio (%)	CV (%)
	100	89	7,8

Los límites de detección fueron: 0,62 ng /ml y 1,98 ng /ml para AOH y AME respectivamente y los límites de cuantificación fueron 1 ng/ml para AOH y 3,4 ng/ml para AME (**Tabla 3**). Los límites de detección reportados por Delgado y col. (1996) (9) y los obtenidos por Delgado y Gómez-Cordovés (1998) (10) en iguales matrices resultaron mayores para AOH pero inferiores para AME. Sin embargo Lau y col. (2003) utilizaron para la detección y cuantificación de estas toxinas la cromatografía líquida de alta resolución acoplada con detección de masa (LC-MS) para analizar las muestras (11). Los valores de LOD determinados fueron menores para las mencionadas toxinas. Sus resultados muestran 11 muestras contaminadas con AOH y una con AME (18).

TABLA 3. Límites de detección y Cuantificación de AOH y AME

Muestra	LOD AOH (ng/ml)	LOQ AOH (ng/ml)	LOD AME (ng/ml)	LOQ AME (ng/ml)
Jugos	0,62	1,04	1,98	3,39

Como se puede observar en la **Tabla 4**, no se detectaron estas toxinas dentro de los límites de cuantificación de cada una de ellas. Esto difiere de los trabajos presentados por Delgado y Gómez-Cordovés (1998) en jugos concentrados quienes detectaron 16 muestras contaminadas sobre 32, teniendo en cuenta además que, las metodologías que utilizaron presentaron similares LOD a los hallados en este trabajo (10); mientras que Lau y col. (2003) reportaron 11/11 positivos con detección LC-MS con niveles de LOD más bajos (11).

Cabe señalar que, este tipo de estudios, junto a la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que se apliquen desde el cultivo de las manzanas u otras frutas, hasta la elaboración de los jugos, sumado a la ejecución de sistemas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) durante todo el proceso, permiten obtener un producto final de buena calidad, que contribuye a posicionar al productor y a nuestro país, en un mercado interno y exportador cada vez más exigente.

TABLA 4. Ocurrencia de AOH y AME en jugos de manzana producidos en Argentina y comercializados en la Provincia de Entre Ríos

Jugo	Concentrados	Origen	AOH (µg/ml)	AME (µg/ml)
BC La Campagnola		Córdoba	ND	ND
Baggio Light		Mendoza	ND	ND
Baggio Pronto		Mendoza	ND	ND
Reddy		San Luis	ND	ND
Cepita		Buenos Aires	ND	ND
Reddy		San Luis	ND	ND
Baggio		Entre Ríos	ND	ND
Super Juvin	*	Entre Ríos	ND	ND
Juvin		Entre Ríos	ND	ND
Miju	*	Entre Ríos	ND	ND
Yahoo		Córdoba	ND	ND
Cepita		Buenos Aires	ND	ND
BC La Campagnola		Córdoba	ND	ND
Baggio Light		Mendoza	ND	ND
Cepita		Buenos Aires	ND	ND
Baggio Pronto		Mendoza	ND	ND
Villa del Sur Levite		Buenos Aires	ND	ND
Miju	*	Entre Ríos	ND	ND
Baggio Pronto		Mendoza	ND	ND
Baggio Light		Mendoza	ND	ND
Cepita		Buenos Aires	ND	ND
Baggio Pronto		Entre Ríos	ND	ND
Baggio Pronto		Entre Ríos	ND	ND
Mijú	*	Entre Ríos	ND	ND
Yahoo		Córdoba	ND	ND
Baggio Pronto		Entre Ríos	ND	ND
La Campagnola		Córdoba	ND	ND
Reddy		San Luis	ND	ND
Reddy		San Luis	ND	ND
Cepita		Buenos Aires	ND	ND
Juvin	*	Entre Ríos	ND	ND
Mocoreta	*	Entre Ríos	ND	ND
Yahoo		Córdoba	ND	ND
Juvin	*	Entre Ríos	ND	ND
Frutafiel	*	Entre Ríos	ND	ND
Yahoo		Córdoba	ND	ND
Baggio Pronto		Entre Ríos	ND	ND
Baggio Pronto		Entre Ríos	ND	ND

A partir de este trabajo, queda la inquietud de continuar con esta línea de investigación, ya que ahora se cuenta con una metodología en el país adecuada, rápida y sensible para realizar controles periódicos en la línea de producción de industrias elaboradoras de distintas bebidas, como también poder desarrollar una técnica que permita aislar y detectar la posible presencia de TA en estos jugos u otras bebidas. De esta forma se podrá hacer extensivo este tipo de estudio a matrices sólidas (cereales y sus subproductos).

IV. Conclusiones

Del trabajo desarrollado se pueden señalar las siguientes conclusiones:

- Se logró adaptar una metodología de tratamiento de muestra y condiciones cromatográficas para determinar AOH y AME en jugos.
- Las metodologías desarrolladas resultaron sensibles y rápidas para detectar estas toxinas en sustratos líquidos.
- Se obtuvieron los primeros resultados sobre la ocurrencia de estas toxinas (AOH y AME) en jugos de manzana consumidos en nuestro país.
- En las muestras analizadas no se detectaron estas toxinas dentro de los LOD y LOQ, situación diferente a los datos documentados en la bibliografía. Si bien para poder comparar los resultados con los informados por otros autores se deberían obtener valores menores para los citados límites
- Estos primeros resultados son auspiciosos pues indicarían que todo el proceso, desde el cultivo y la selección de la fruta hasta la elaboración de los jugos, contribuyen favorablemente en la calidad del producto obtenido.
- Es importante continuar con estos estudios en otras matrices alimenticias como tomates y subproductos, zanahorias, cereales y los productos obtenidos de las moliendas. Estos estudios se pueden realizar en granos cosechados en Entre Ríos donde, en estudios anteriores, se detectó una alta prevalencia de la especie fúngica *A. alternata*.

V. Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento de la Universidad Nacional de Entre Ríos (PID 9055).

VI. Bibliografía

- (1) USDA, (2011). World apple production, including top-producing countries, en: **Economic Research Service**. United Department of Agriculture. Consulta Enero 2011. <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1825..>
- (2) Bruzone A.; Jugo concentrado de manzana. Análisis de Cadena Alimentaria Dirección Nacional de Alimentos - **Dirección de Industria Alimentaria. Sector Frutas**. Consulta Enero2011 www.alimentosargentinos.gov.ar/.../jugo_manzana.htm
- (3) Patriarca, A., Azcarate, M. P., Terminiello, L., Fernández Pinto, V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat, en: **International Journal of Food Microbiology** 119, 219–222.
- (4) Broggi L- E. y Moltó G. A. (2001). Fungi associated with rice at Entre Ríos province, Argentina. Toxicogenic capacity of *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale* isolates en: **Mycotoxin Research**, 17 (2): 96-107.
- (5) Fernández Pinto, V. (2008). Detection and determination of *Alternaria* mycotoxins in fruits and vegetables, en: **“Mycotoxins in Fruits and Vegetables** Elsevier Academic Press, San Diego, California. Capítulo 13, pp. 271-278.
- (6) Scott P. M. (2001). Analysis of Agricultural Commodities and Foods for *Alternaria* Mycotoxins, en : **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, 84 (6): 1809-1817. ISSN 1060-3271
- (7) Broggi L. E., González H. H. L., Resnik S. L. y Pacin A. (2007) *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina, en: **Revista Iberoamericana de Micología**; 24: 47-51.
- (8) Sacchi C., González H.H.L., Broggi L.E., Pacin A., Resnik S.L., Cano G. t Taglieri D. (2009) Fungal contamination and mycotoxin natural occurrence in oats for race horses feeding in Argentina, en: **Animal Feed Science and Technology** , 152: 330–335
- (9) Delgado T., Gómez-Cordovés C. and Scott P. M. (1996). Determination of alternariol and alternariol methyl ether in apple juice using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, en : **Journal of Chromatography A**, 731: 109-114

- (10) Delgado T. y Gómez-Cordovés C. (1998) Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates, en: **Journal of Chromatography A**,; 815: 93-97.
- (11) Lau B. P.-Y., Scott P. M.; Lewis D. A.; Kanhere S. R. M.; Cléroux C. y Roscoe V. A.(2003). Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages, en: **Journal of Chromatography A**, 998: 119-131.