

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ÉNFASIS EN INOCUIDAD
ALIMENTARIA

**Evaluación de los niveles de ácido tenuazónico, alternariol y
alternariol monometil éter en muestras de tomate y pastas de
tomate por LC-MS/MS**

POR:

JOYCE KATHERINE LEZCANO DEL CID

**Trabajo de graduación
para optar por el grado
de Máster en Ciencias
Químicas con Énfasis en
Inocuidad Alimentaria.**

David- Chiriquí, República de Panamá

2019

A mi madre

Y a todos aquellos que desde las Ciencias

buscan construir un mundo mejor

Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), a través del Programa “Generación de Capacidades Científicas y Tecnológicas” Proyecto: “*Capacitación en un método LC-MS/MS para la determinación de micotoxinas de Alternaria en tomates y pastas de tomate producidos en Panamá*” APY-GC-2017-022; a la Vicerrectoría de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Chiriquí a través del “Programa de Subsidio a las Actividades de Investigación 2017” Proyecto: “*Evaluación de los niveles de ácido tenuazónico en muestras de tomates y productos derivados por el método de HPLC*” y desarrollada en el Laboratorio de Química Analítica de Alimentos de la Technische Universität München (Universidad Técnica de Múnich).

Agradecimientos

A Dios por darme la fortaleza y brindarme la sabiduría para poder alcanzar esta meta. Por abrir puertas para que fuesen posibles tantas oportunidades académicas, que me permiten hoy lograr este sueño.

Deseo expresar también agradecimiento a mis asesores, al Dr. Pedro González Beermann por el tiempo, la disposición y la dedicación brindada a la revisión técnica de este trabajo, gracias por sus valiosas sugerencias. A la Dra. Ariadna Batista no sólo por la revisión de este trabajo, sino también por crear los espacios académicos necesarios en nuestra Institución para el fortalecimiento de la investigación. Al Dr. Michael Rychlik por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de este trabajo, por su apoyo incondicional al compartir sus conocimientos. Al Dr. Heriberto Franco por su colaboración y aportes para el mejoramiento de este trabajo.

Al Laboratorio de Química Analítica de Alimentos de la Universidad Técnica de Múnich, por brindar el espacio y las condiciones técnicas necesarias para la realización de la parte experimental de esta tesis. A la Dra. Marina Gothard, quien fue responsable de brindar la capacitación en las técnicas de análisis aplicadas en este trabajo, gracias por los conocimientos impartidos, por la paciencia y dedicación brindada durante mi estancia en el laboratorio. Al igual que a los estudiantes del Doctorado en Química de Alimentos de la

Universidad Técnica de Múnich, quienes me orientaron sobre el trabajo en el laboratorio y me brindaron su hospitalidad durante mi estancia en Alemania.

Al Ing. José Lezcano del IDIAP, por su orientación en el diseño experimental de la investigación. A mis compañeros de Maestría, por su amistad y colaboración durante los años de estudio.

A mi familia por su amor y apoyo incondicional.

Índice general

Portada.....	i
Dedicatoria.....	iii
Reconocimiento.....	iv
Agradecimiento.....	v
Índice General.....	vii
Índice de Cuadros.....	x
Índice de Figuras.....	xi
Resumen.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	5
1.3. Justificación de la investigación.....	6
1.4. Objetivos.....	8
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Micotoxinas de <i>Alternaria</i>	10
2.2. Clasificación y estructura química de las micotoxinas de <i>Alternaria</i>	14
2.3. Toxicología.....	16
2.4. Cultivo del Tomate.....	19
2.5. Estudios previos sobre micotoxinas de <i>Alternaria spp.</i>	21
2.6. Métodos analíticos para el análisis de micotoxinas de <i>Alternaria</i>	26
2.6.1. Técnicas Cromatográficas.....	28

2.6.1.1.	Cromatografía en Capa Fina TLC.....	28
2.6.1.2.	Cromatografía de Gases GC	29
2.6.1.3.	LC acoplada a detectores UV/DAD/FLD	30
2.6.1.4.	LC-MS.....	32
2.6.2.	Ensayo de Dilución de Isotopos Estables SIDA	34
2.6.3.	Ensayos de Inmunofluorescencia.....	36
2.6.3.1.	ELISA	37
2.7.	Regulaciones y normativas.....	37
3.	METODOLOGÍA	39
3.1.	Descripción y diseño de la investigación.....	40
3.2.	Diseño de muestreo	40
3.3.	VARIABLES	41
3.4.	Planificación de la investigación	42
3.4.1.	Fase pre-analítica.....	42
3.4.2.	Fase Analítica.....	43
3.4.2.1.	Preparación de la muestra.....	43
3.4.2.2.	Cuantificación de micotoxinas de <i>Alternaria</i>	45
3.5.	Hipótesis	48
3.6.	Tratamiento estadístico de los datos	49
3.7.	Actividades.....	50
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1.	Preparación de muestra	53
4.2.	Extracción y purificación	54

4.3.	Calibración y cuantificación mediante el Ensayo de Dilución de Isótopos Estables (SIDA)	57
4.4.	Gradiente de separación de AOH, AME, ATX-I-II, TEN, ALTP y TeA	63
4.5.	Cuantificación de la micotoxinas por LC-MS/MS	64
4.6.	Calibración y Validación del método	68
4.7.	Incidencia natural de micotoxinas de <i>Alternaria</i> en tomates y pastas de tomate en Panamá	70
	CONCLUSIONES	84
	RECOMENDACIONES	87
	BIBLIOGRAFÍA	89
	ANEXOS	100

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Lista de toxinas de <i>Alternaria</i> y especies de <i>Alternaria</i> que las producen	12
Cuadro 2. Registro cronológico del descubrimiento de las micotoxinas de <i>Alternaria</i> más importantes	16
Cuadro 3. Preparación de estándares internos para SIDA.....	45
Cuadro 4. Programa de elución del HPLC para AOH, AME, TEN, ATX-II y TeA.....	46
Cuadro 5. Gradiente de elución de fase móvil para AOH, AME, ATX I, ATX II, TEN y ALTP	47
Cuadro 6. Gradiente de elución de fase móvil para TeA	47
Cuadro 7. Funciones de respuesta para cada micotoxina analizada	60
Cuadro 8. Tiempos de retención para cada micotoxina de <i>Alternaria</i>	64
Cuadro 9. Transiciones iónicas MS/MS -Parámetros espectrales fijados para el análisis de ATs en el espectrometro de masa	67
Cuadro 10. Valores de LOD, LOQ y porcentajes de recuperación del método LC-MS/MS para AOH, AME y TeA.....	68
Cuadro 11. Presencia micotoxinas de <i>Alternaria</i> en muestras de tomate	70
Cuadro 12. Presencia de micotoxinas de <i>Alternaria</i> en muestras de pasta de tomate	71
Cuadro 13. Niveles en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de micotoxinas de <i>Alternaria</i> en muestras de tomate	72
Cuadro 14. Niveles en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de micotoxinas de <i>Alternaria</i> en muestras de pasta de tomate.....	73
Cuadro 15. Prueba Tukey para comparación de múltiples medias para AOH en muestras de tomate	77
Cuadro 16. Prueba de Tukey para comparación de múltiples medias para AME en muestras de tomate	78

Índice de Figuras

Fig. 1. Estructura química del AOH, AME, ALT, TeA, ATX-I, ATX-II, ATX-III y STTX-III	15
Fig. 2. Cromatograma de muestra de pasta de tomate naturalmente contaminada con AOH y AME vs calibración con estándar interno AOH y AME	61
Fig. 3. Cromatograma de muestra de pasta de tomate naturalmente contaminada	62
Fig. 4. Programa de gradiente de separación para AOH, AME, ATX I, ATX II, TEN, ALTP	63
Fig. 5. Programa de gradiente de separación para TeA.....	63
Fig. 6. Comparación de los niveles en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AOH y AME en fincas de tomate.....	75
Fig. 7. Prueba de Normalidad para AOH en tomates	75
Fig. 8. Prueba de Normalidad para AME en tomates	76
Fig. 9. Prueba de Normalidad para AOH en pastas de tomate	79
Fig. 10. Prueba de Normalidad para AME en pastas de tomate	79
Fig. 11. Prueba de Normalidad para TeA en pastas de tomate	80
Fig. 12. Comparación de los niveles de AOH, AME y TeA entre dos marcas de pasta de tomate...81	
Fig. 13. Prueba de correlación entre las micotoxinas AOH y AME en tomates	82
Fig. 14. Prueba de correlación entre las micotoxinas AOH y AME en pastas de tomate	82

Resumen

Las micotoxinas *Alternarias* son un conjunto de micotoxinas producidas por los hongos *Alternaria spp.*, que se encuentran dentro de las denominadas “micotoxinas emergentes”. Debido a su alta incidencia en los productos alimenticios y su potencial tóxico, estas micotoxinas suponen nuevos desafíos de métodos analíticos para su detección. Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar la incidencia natural y los niveles de las micotoxinas de *Alternaria spp.* en tomates y pastas de tomate producidos en Panamá, mediante un método analítico eficaz. Para ello se analizaron 10 muestras de tomate procedentes de tres fincas productoras del distrito de Tierras Altas de Chiriquí, Panamá y 10 muestras de pastas de tomate de dos marcas comerciales producidas con tomates panameños. Se aplicó un Ensayo de Dilución de Isótopos Estables (SIDA) y la técnica de LC-MS/MS. Los valores de límites de detección para este estudio fueron de 0.07, 0.02 y 0.45 µg/kg para AOH, AME y TeA y los límites de cuantificación de 0.20, 0.06 y 1.4 µg/kg para AOH, AME y TeA, respectivamente. Se encontró que todas las muestras de tomate y pastas de tomate contenían niveles detectables de AOH y AME. Los tomates contenían niveles de AOH en un rango de 0.58-5.33 µg/Kg y de AME de 0.29-3.96 µg/Kg; mientras que las pastas de tomates contenían niveles de 1.77- 8.12 µg/Kg de AOH, 0.74-7.03 µg/Kg de AME y 29.19-37.99 µg/Kg de TeA. Se encontró además una alta correlación entre las micotoxinas AOH y AME ($r=0.95$, $P<0.01$) tanto en las muestras de tomate como en pastas de tomate. Los resultados obtenidos indican que los niveles de las micotoxinas encontrados son bajos; sin embargo sugieren que la contaminación por *Alternaria* en tomates y pastas de tomates, es latente por lo que se requieren más estudios y monitoreos para lograr un mayor control, vigilancia y prevención del consumo de alimentos contaminados con micotoxinas para asegurar una mayor inocuidad alimentaria.

Palabras Claves: micotoxinas, *Alternaria spp.*, LC-MS/MS, inocuidad alimentaria, tomates.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La *Alternaria spp.*, es un género fúngico muy común, incluye especies patógenas ampliamente distribuidas en el suelo y la materia orgánica en descomposición. Se encuentran con frecuencia en semillas, plantas, productos agrícolas y el aire (Benavidez Rozo, Patriarca, Cabrera, & Fernández Pinto, 2014). Pueden invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección y es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce deterioro en los cultivos durante su almacenamiento.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, producidos por hongos filamentosos. Desde que las primeras micotoxinas, las aflatoxinas fueron descubiertas en 1960, cuando causaron la muerte de 100,000 pavos, muchas nuevas micotoxinas han sido identificadas en los últimos 50 años (Brzonkalik, Herrling, Sylatk & Neumann, 2011).

Actualmente, se conocen más de 120 metabolitos secundarios del género *Alternaria*; una cuarta parte de ellos se designan como micotoxinas (Barkai-Golan, 2008; Brzonkalik et al., 2011). Las cinco toxinas más importantes de *Alternaria* que pueden encontrarse como contaminantes naturales en los productos alimenticios son los derivados de benzopireno: alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), el ácido tetrámico ácido tenuazónico (TeA) y las altertoxinas (ATX-I, ATX-II, ATX-III).

La *Alternaria spp.* es un problema importante en los tomates, ya que es uno de sus contaminantes más frecuentes. Particularmente durante la época de maduración de los frutos, causando la podredumbre negra (Terminiello & Fernández Pinto, 2005). Es frecuente además, aislar toxinas de *Alternaria* a partir de productos procesados tales como salsas y pastas de tomate, ketchup, tomates desecados, jugos y conservas; como consecuencia de la utilización de materias primas con contaminación fúngicas; ya que aunque se eliminen las zonas visiblemente alteradas, las toxinas de *Alternaria spp.*, se pueden transferir a los tejidos circundantes (Pavón Moreno, et al., 2012).

De acuerdo con Ostry (2008): *“la detección y cuantificación de micotoxinas de Alternaria en alimentos se realiza principalmente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección ultravioleta, fluorescencia o espectrometría de masa, pero también se han descrito otros métodos como cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC), cromatografía en fase gaseosa (GC) y detección electroquímica”*.

En estudios llevados a cabo por Siegel, Merkel, Koch & Nehls (2010), se determinó ácido tenuázonico en cerveza por LC-MS/MS después de derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Asam, Lichtenegger, Muzik, Liu, Frank, Hofmann & Rychlik (2013) sintetizaron y caracterizaron análogos de ácido tenuázonico derivados de otros aminoácidos [derivado de valina (Valta), leucina (Leuta), alanina (alata) y fenilalanina (Pheta)] por espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear ^1H (RMN).

Para lo cual desarrollaron dos métodos analíticos, uno con derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y otro sin derivatización, se utilizó además el ensayo de dilución de isótopos estables (SIDA). Rasmussen, Storm, Rasmussen, Smedsgaard, & Nielsen (2010), emplearon un método conocido como QuEChERS para la extracción de muestra, simultáneamente a la LC-MS/MS para determinar las micotoxinas AOH, AME, TeA y otros metabolitos secundarios de hongos en el ensilaje de maíz.

Las micotoxinas de *Alternaria* se encuentran dentro de las denominadas “micotoxinas emergentes”; debido a su alta incidencia en los productos alimenticios y su potencial tóxico, la aparición de estas micotoxinas supone nuevos desafíos, tales como el desarrollo de métodos químicos analíticos para su detección.

Actualmente no hay un límite legal o de guía para micotoxinas de *Alternaria* por parte de las autoridades reguladoras a nivel internacional; sin embargo los datos actuales en otros países indican una exposición frecuente y prolongada de estas micotoxinas en la dieta humana (Pavón Moreno, González Alonso, Martín de Santos, & García Lacarra, 2012). Por lo tanto, es necesaria más información sobre la existencia y caracterización de estas micotoxinas en alimentos y sus riesgos, para dar lugar a la consideración de la necesidad de regulaciones.

1.2. Planteamiento del problema

La contaminación por *Alternaria spp.* y la existencia de micotoxinas reduce tanto la cantidad como la calidad de los alimentos, deteriorando los nutrientes del tomate (Meena, Zehra, Dubey, Aamir, Gupta & Upadhyay, 2016). Constituye además un factor de riesgo para la salud del consumidor debido a las propiedades de las micotoxinas para inducir efectos graves de toxicidad aún en dosis bajas. Estas toxinas de *Alternaria spp.*, han demostrado poseer capacidad genotóxica, mutagénica, carcinogénica y citotóxica (Man, Liang, Li & Pan, 2016).

La contaminación de los alimentos con este hongo se produce de manera natural y su concentración puede aumentar como resultado de las condiciones ambientales o de operaciones inadecuadas de recolección, almacenamiento y elaboración de los productos alimentarios. Por ello, es necesario disponer de programas de control que eviten la contaminación con mohos toxigénicos; pero adicionalmente se requiere contar con laboratorios y programas de control de calidad en Panamá, que garanticen la inocuidad de los alimentos.

Para llevar a cabo la aplicación efectiva de estos controles, es necesario disponer de técnicas de análisis químico, para la detección y cuantificación de estas micotoxinas. Sin embargo, la evaluación de riesgos relacionados con la inocuidad de los alimentos en Panamá es incipiente y se encuentra obstaculizada por la falta de datos cuantitativos, y al desconocimiento de la contribución que hace cada alimento a la exposición dietética de

estas toxinas, debido a la falta de métodos y mecanismos para la obtención de esta información científica.

Por lo antes expuesto, este trabajo se planteó entre otras preguntas: ¿cuáles micotoxinas de *Alternaria* se encuentran presentes en estas muestras y en qué niveles?

Hasta el momento, no se conoce de otros estudios que se hayan llevado a cabo en Panamá y que demuestren la presencia de micotoxinas de *Alternaria spp.* o contaminación por éstas en tomate y productos procesados a partir de éstos. Por tal razón este proyecto busca proporcionar datos científicos que permitan conocer la existencia o no de contaminación por estas micotoxinas en productos de consumo habitual del público panameño como son los tomates y pastas de tomate de producción nacional.

1.3. Justificación de la investigación

La economía mundial y la globalización de los mercados facilitan el comercio internacional de los productos agrícolas. Ésto obliga a nuestro país a establecer normas de control fitosanitarias que regulen la calidad de los productos alimentarios y así proteger a la población y la actividad agrícola.

En Panamá se producen y consumen gran cantidad de frutas y vegetales que requieren ser sometidos a controles de calidad que garanticen la inocuidad de los mismos. Sin embargo,

en un gran número de casos; estos rubros no cuentan con programas de monitoreo y control. Es necesario disponer de técnicas analíticas eficaces para la detección de micotoxinas tanto en materias primas como en alimentos elaborados, que pueden introducir estas toxinas en la dieta humana. Esto permitiría adoptar las medidas necesarias para apartar de la cadena alimentaria los productos que puedan suponer un riesgo para la salud del consumidor.

El seguimiento del control y evaluación de los alimentos usando métodos analíticos servirá no sólo para lograr un mayor control de la presencia de esta toxina en los productos alimenticios, sino que a su vez contribuirá al desarrollo de los productores de la región, incrementando la calidad de sus productos y haciéndolos más competitivos en el mercado nacional e internacional.

Se espera que esta investigación se convierta en una primera aproximación sobre los niveles de estas micotoxinas en el país, que la capacidad técnica desarrollada contribuya al fortalecimiento de las habilidades y competencias para el análisis de estas micotoxinas en alimentos en Panamá y que los resultados obtenidos contribuyan al desarrollo de estrategias para reducir el riesgo de estos contaminantes.

1.4. Objetivos

Objetivo General

- Determinar los niveles de las micotoxinas producidos por cepas del hongo *Alternaria spp.*, en muestras de tomates y pastas de tomates de producción nacional.

Objetivos Específicos

- Identificar la presencia de ácido tenuazónico, alternariol, alternariol monometil éter, tentoxina y altertoxinas en muestras de tomates y pastas de tomates de producción nacional.
- Cuantificar los niveles de ácido tenuazónico, alternariol y alternariol monometil éter por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem LC-MS/MS.
- Determinar la correlación en la co-producción de las micotoxinas ácido tenuazónico, alternariol y alternariol monometil éter en muestras de tomate y pastas de tomates de producción nacional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Micotoxinas de *Alternaria*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular ($PM < 700$ kDa), producido por hongos filamentosos (Pavón Moreno, et al., 2012). El término micotoxina se deriva de las palabras griegas 'Mnchs' (mykes-fungus) y 'soxikon' (toxicum-poison) (Sharma, Pillai, Gautam & Hajare, 2014). Aunque actualmente se conocen más de 300 micotoxinas, la atención de los científicos se centra principalmente en aquellas que han demostrado ser cancerígenos y/o tóxicos

Las micotoxinas son potentes toxinas que tienen un amplio rango de acción en animales y humanos, poseen efectos cito-, nefro- y neurotóxico, carcinogénico, mutagénico, inmunosupresor, estrogénicos, entre otros (Krska, Schubert-Ullrich, Molinelli, Sulyok, MacDonald & Crews, 2008). Cuando se ingieren, las micotoxinas pueden causar una *micotoxicosis* que puede resultar en un episodio de enfermedad aguda o crónica. Las condiciones crónicas tienen un impacto mucho mayor, numéricamente, en la salud humana en general (Milićević, Škrinjar & Baltić, 2010).

Las micotoxinas pueden contaminar los alimentos o las materias primas utilizadas para su elaboración. Para que se produzcan las micotoxinas, además de la presencia de la especie productora, influyen las condiciones ambientales y la composición del sustrato (Brzonkalik et al., 2011, p.1773). El crecimiento de hongos no necesariamente se asocia con la formación de micotoxinas y debido a la estabilidad de las micotoxinas, éstas pueden estar presentes en los alimentos cuando los hongos ya no están presentes. Además,

un hongo puede producir diferentes micotoxinas y una micotoxina pueden ser producidas por diferentes hongos (Fernández-Cruz, Mansilla & Tadeo, 2010, p.113).

Debido a su contenido de nutrientes, los alimentos para la nutrición humana son medios de cultivo ideales para parásitos como hongos. En particular, los alimentos con alto contenido de humedad, como las frutas, son propensos a la invasión por hongos (Rychlik, 2012).

De las cientos de micotoxinas conocidas hasta la fecha, sólo un número muy limitado está sujeto a reglamentaciones legales y monitoreo regular. Con respecto a la alimentación, las aflatoxinas (AF), fumonisinas (FB), el deoxinivalenol (DON), la zearalenona (ZEN) y la ocratoxina A (OTA) son analizadas con mayor frecuencia (Streit, Schwab, Sulyok, Naehrer, Krska & Schatzmayr, 2013). Sin embargo en los últimos años han tomado relevancia las denominadas micotoxinas "nuevas" o "emergentes" (es decir, micotoxinas que no han recibido tanta atención científica como AF, FB, DON, ZEN y OTA) (Streit et al., 2013), dentro de las que se encuentran las micotoxinas de *Alternaria* (ATs).

La *Alternaria spp.* es un hongo de campo común responsable de una variedad de enfermedades en las plantas, incluida la mancha marrón del tabaco, el tizón del tomate y la clorosis de plántulas de cítricos (Harvan & Pero, 1976, p.1). El género *Alternaria* comprende patógenos y saprófitos ubicuos. Pueden crecer incluso a bajas temperaturas y baja actividad de agua, por lo que generalmente se asocian con el deterioro de frutas y vegetales durante el transporte y almacenamiento (Man, Liang, Li & Pan, 2016; Prella,

Spadaro, Garibaldi & Gullino, 2013; Rodríguez-Carrasco, Mañes, Berrada & Juan, 2016); causando descomposición poscosecha.

Las especies de *Alternaria* son capaces de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios pertenecientes a diferentes grupos químicos. La *Alternaria alternata* es una especie frecuente y de particular interés porque produce varias micotoxinas, que incluyen alternariol, alternariol monometil éter, altertoxina I y ácido tenuazónico (Ostry, 2008, p.175; Reinhold & Bartels, 2010).

Cuadro 1. Lista de toxinas de *Alternaria* y especies de *Alternaria* que las producen

Micotoxina	Acrónimo	Especie Productora
Alternariol	AOH	<i>Alternaria alternata</i>
Alternariol monomethyl ether	AME	<i>A. alternata</i> ; <i>A. solani</i>
Tentoxin	TEN	<i>A. alternata</i>
Tenuazonic acid	TeA	<i>A. alternata</i> ; <i>A. tenuissima</i>
Altertoxins	ATXs	<i>A. alternata</i> .
<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> toxins	AAL-toxins	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Stemphytoxin III	Stemphytoxin III	<i>A. alternata</i>
Altenuene	ALT	<i>A. alternata</i>

Fuente: EFSA, 2011

La producción de micotoxinas varía con la cepa fúngica, el sustrato y el medio ambiente, condiciones de crecimiento, esto incluye factores como la actividad del agua, temperatura, valor de pH y luz. La producción de micotoxinas puede ser considerada como una adaptación a imposiciones abióticas o a otras tensiones de la especie micotoxigénica (Brzonkalik et al., 2011).

El crecimiento óptimo de la *Alternaria alternata* es cerca de 25°C con variaciones mínimas de -5 a 6.5°C y máximos cerca de 36°C. La a_w mínimo para el crecimiento a 25°C es 0.88. El crecimiento óptimo ocurre a pH 4-5.4, y el rango de pH para el crecimiento es 2.7-8.0. La *A. alternata* es capaz de crecer en concentraciones de oxígeno tan bajas como 0.25% (v/v) en N₂, con tasas de crecimiento proporcionales a la concentración de oxígeno (Ostry, 2008, p.178).

Las condiciones óptimas para la producción de AOH, AME y TeA identificadas por Pose, Oatriarca, Kyanko, Pardo, Fernandez-Pinto (2009), fueron de 21°C/0,954 a_w , 35 °C/0,954 a_w y 21°C/0,982 a_w , respectivamente.

La mayoría de las micotoxinas son relativamente estables al calor dentro del rango de las temperaturas de procesamiento de alimentos convencionales (80-121°C), por lo que se produce poca o ninguna destrucción en condiciones normales de cocción, como hervir y freír, o incluso después de la pasteurización (Gleadle, Mortby, Hatch, & Burt, 1998).

El impacto de la descomposición de alimentos inducida por hongos es grave; se estima que causa una pérdida del 25% del total de la producción agrícola mundial (Rychlik, 2012), y estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) indican que las pérdidas globales de productos alimenticios debido a las micotoxinas están en el rango de 1000 millones de toneladas por año.

Las frutas y vegetales afectados por *Alternaria* presentan regularmente áreas podridas visibles; sin embargo, las toxinas de *Alternaria* se pueden transferir de la parte podrida a los tejidos circundantes. Por lo tanto, las toxinas de *Alternaria* pueden estar también presentes en productos procesados debido a las limitaciones de los procedimientos industriales actuales, para eliminar completamente los tejidos en descomposición (Zhao, Shao, Yang & Li, 2015, p.343; Logriego, Moretti & Solfizzo, 2009).

Las mejoras en la seguridad alimentaria en los países desarrollados han eliminado la micotoxicosis humana aguda (en parte debido al uso de prácticas agrícolas modernas y presencia de regulaciones legislativas), sin embargo éstas aún ocurren en las comunidades rurales en el mundo en desarrollo, donde las condiciones climáticas y de almacenamiento son propicias para el crecimiento de hongos y en donde las micotoxinas han estado involucradas en muertes o enfermedades agudas reportadas (Fernández-Cruz et al., 2010, p.114; Milićević et al., 2010).

2.2. Clasificación y estructura química de las micotoxinas de *Alternaria*

Las micotoxinas de *Alternaria spp.* pueden ser divididas dentro de cinco categorías dependiendo de su estructura química, incluyen derivados de dibenzopironas, derivados de ácidos tetrámicos, derivados de perilenos, toxinas AAL (*Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*) y estructuras misceláneas (Man et al., 2016).

- Dibenzopironas: AOH, AME y ALT.
- Perileno quinonas: ATX-I, -II, -III.
- Ácidos tetrámicos: TeA.
- AAL toxinas: AAL-TA1, AAL-TA2, AAL-TB1, AAL-TB2.
- Estructuras misceláneas: TEN.

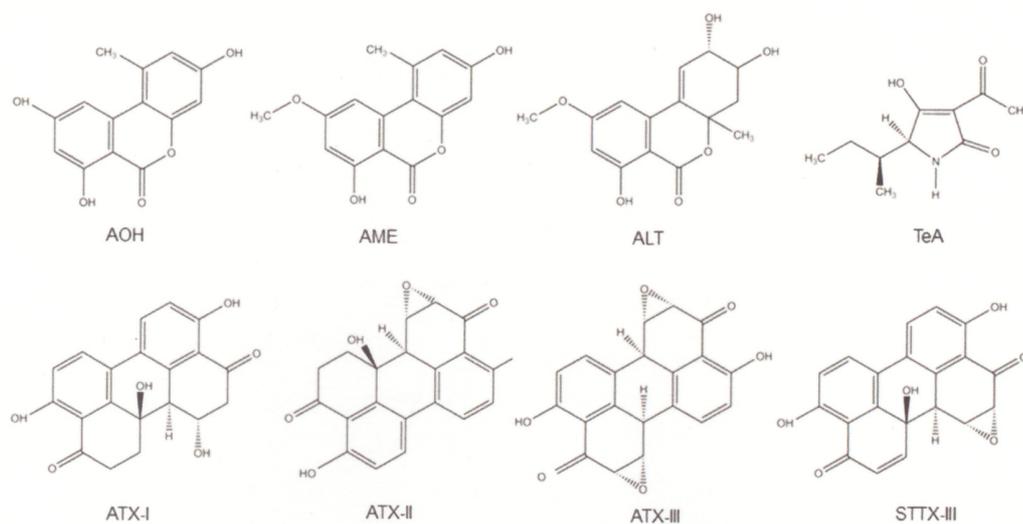


Fig. 1. Estructura química del AOH, AME, ALT, TeA, ATX-I, ATX-II, ATX-III y STTX-III

El alternariol (AOH), alatenariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), ácido tenuazónico (TeA), altertoxinas I, II y III (ATX-I, ATX-II, ATX-III) y la tentoxina (TEN) son consideradas como las micotoxinas de *Alternaria* más importantes (Man et al., 2016; Prelle et al., 2013, p.161).

Cuadro 2. Registro cronológico del descubrimiento de las micotoxinas de *Alternaria* más importantes

Micotoxina	Año de aislamiento	Referencia
AOH	1953	Raistrick <i>et al.</i> , 1953; Thomas, 1961; Pero and Main, 1969; Tirokata <i>et al.</i> , 1969
AME	1953	Raistrick <i>et al.</i> , 1953; Thomas, 1961; Pero and Main, 1969; Tirokata <i>et al.</i> , 1969
TeA	1957	Rosset <i>et al.</i> , 1957; Janardhanan and Husein, 1975
ALT	1971	Pero <i>et al.</i> , 1971; Rizk <i>et al.</i> , 1985
ATX-I, -II, -III	1973	Pero <i>et al.</i> , 1973b; Chu, 1981; Stack <i>et al.</i> , 1986; Stack and Prival, 1986

Fuente: Ostry, 2008.

El AOH y el AME, son producidos por la mayoría de *A. alternata*, así como también han sido aislados de otras muchas especies de *Alternaria*; ambos son compuestos incoloros, cristalinos (Harvan & Pero, 1976, p.2).

El TeA, es producido por una gran variedad de especies de *Alternaria spp.*, también es un metabolito de *Pyricularia, oryzae, Sphaeropsidales*, y algunos *Aspergilli*. El TeA es un aceite incoloro, viscoso y es un ácido monobásico con pKa 3.5. Es soluble en metanol y cloroformo; al calentarse o tratarse con una base, la actividad óptica se pierde y puede ocurrir la cristalización dando como resultado la formación de iso-TeA. Forma complejos con calcio, magnesio, cobre, hierro y níquel (EFSA, 2011, p.15).

2.3. Toxicología

El impacto de las micotoxinas en la salud depende de la concentración y la duración de la exposición a la toxina, la toxicidad del compuesto, el peso corporal del individuo, la presencia de otras micotoxinas (efectos sinérgicos), factores ambientales (manejo de granja) y otros efectos dietéticos (Kuiper-Goodman, 2004).

La toxicidad de las micotoxinas de *Alternaria* ha sido bien establecida; existe fuerte evidencia de que el AME y AOH podrían ser mutagénicos (An, Zhao, Miao, Liu, Zheng & Xu, 1989) actúan como antagonista de la topoisomerasa; además, el AME provoca roturas de cadena de ADN (Boettler et al. 2009; Bächler et al., 2010). Se ha sugerido que el AME y el AOH producido por *A. alternata* en granos podría ser un factor responsable de la alta incidencia de cáncer de esófago en humanos en el condado de Linxian, China (Liu, Qian, Zhang, Dong, Qi & Guo, 1992 citado por Asam, Konitzer, Schieberle & Rychlik, 2009).

La toxicidad del TeA se ha demostrado en plantas, embriones de pollo y en otras especies animales. En perros, la ingesta de dosis diarias de 10 mg/kg de peso corporal, provocó la aparición de hemorragias en diversos órganos. En las aves domésticas, una dosis de 10 mg/kg en la alimentación, disminuyó tanto la eficiencia alimenticia como la ganancia de peso e incrementó las hemorragias internas (Brzonkalik et al., 2011, p.1775; Streit et al., 2013).

Ratones que consumieron pienso contaminado con TeA durante 10 meses, desarrollaron alteraciones en la mucosa esofágica (cambios precancerosos), con dosis diaria de 25 mg/kg de peso corporal (Yekeler et al., 2001) lo que sugiere la posibilidad que la progresión al cáncer de esófago pueda ocurrir después de una exposición prolongada (EFSA, 2011). Además, el consumo de sorgo contaminado con TeA, se ha relacionado con la aparición de un desorden hematológico humano conocido como Onyalai

(Brzonkalik et al., 2011, p.1776), (Steyn & Rabie, 1976; Bottalico & Logriego, 1998; Ostry Ozcelik, & Beuchat, 1990). Entre las toxinas de *Alternaria*, el TeA es considerado como el que tiene la toxicidad aguda más alta, mostrando valores LD₅₀ de 225 mg/kg (peso corporal) en ratones y 37.5 mg/kg en polluelos.

El TeA es un fuerte agente quelante con propensión a quelar iones metálicos en varias sustancias biológicamente importantes. Puede quelarse con calcio, magnesio, cobre y otros metales, y luego de la quelación se combina con el centro activo de la transpeptidasa, por lo que se inhibe la formación de enlaces peptídicos de la síntesis de proteína (Carrasco & Vazquez, 1973; Robeson & Jalal, 1991; Brzonkalik et al., 2011).

El TeA es la única micotoxina *Alternaria* que se incluyó en la lista de Registro de sustancias químicas tóxicas de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Ostry, 2008).

Las ATX I y II han mostrado una considerable citotoxicidad; se ha reportado además que las ATX III, II y I muestran potencial mutagénico. Recientemente, se informó que ATX II es al menos 50 veces más potente como mutágeno que las otras ATs, AOH y AME en células cultivadas de hámster chino (Liu & Rychlik, 2015).

Los datos de toxicidad de las micotoxinas de *Alternaria* necesarios para la caracterización de peligros tales como, los Niveles de Efectos Adversos No Observados (NOAEL), los

Niveles de Efectos Adversos Observados más Bajos (LOAEL) y las dosis de referencia (BMD) no han podido ser establecidos aún para las ATs: AOH, AME, ALT, ATX-I-II (Ostry, 2008, p. 181).

2.4. Cultivo del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum L., syn. Lycopersicon esculentum Mill.*) es considerado uno de los principales cultivos hortícolas en el mundo. Sin embargo, la productividad económica global de este el cultivo está limitado por varios fitopatógenos; entre ellos la *Alternaria spp.* los cuales causan pérdidas significativas y reducen tanto la calidad como la cantidad de los alimentos ya que, deterioran sus nutrientes (Meena, Zehra, Dubey, Aamir, Gupta & Upadhyay, 2016).

La *Alternaria* es el hongo más frecuentemente encontrado en tomates mohosos, y es responsable de la enfermedad conocida como “*moho negro de tomate*”. Aunque los tomates se consumen en forma fresca, más del 80% del consumo de tomate viene de productos procesados, como jugo de tomate, pasta, puré, ketchup y sopa (Rodríguez-Carrasco et al., 2016). El consumo directo de tomates mohosos por parte de los consumidores es poco probable, pero estos tomates pueden ser utilizados para productos procesados del tomate (Patriarca, Vaamonde & Pinto, 2014).

La aparición de ATs en productos de tomate ha sido reportada en Argentina (Somma et al., 2011; Terminiello et al., 2006), Suiza (Noser, Schneider, Rother, & Schmutz, 2011), Brasil (Da Motta & Soares, 2001) y Alemania (Ackermann et al., 2011; Asam, Liu, Konitzer, & Rychlik, 2011).

La infección puede ocurrir en el extremo del tallo de la fruta o por una lesión mecánica, agrietamiento por humedad excesiva durante el crecimiento o enfriamiento. Algunas investigaciones han demostrado que la pudrición de *Alternaria* puede desarrollarse a todas las temperaturas de manejo aceptables y puede ser evitado sólo por manejo y mercadeo rápido (Patriarca, Vaamonde & Pinto, 2014, p.58).

Se ha reportado que el género *Alternaria spp.*, es el hongo más común que infecta a los tomates (Pose et al., 2004, 2010; Van de Perre, et al., 2014). Los tomates son particularmente susceptibles a la invasión de microorganismos debido a su epidermis blanda (Da Motta & Valente Soares, 2000, p.112; Van de Perre et al., 2014) y la infección es promovida por el clima cálido y lluvioso. En un medio sintético de tomate la *A. alternata* aislada de las frutas de tomate crecieron mejor a 21°C y en una a_w de 0.982 (Pose et al., 2009).

Pocos estudios se han llevado a cabo sobre la estabilidad de las micotoxinas de *Alternaria*, aunque al igual que otras micotoxinas, probablemente sean bastante estables (Patriarca et al., 2014).

2.5. Estudios previos sobre micotoxinas de *Alternaria spp.*

Las micotoxinas de *Alternaria* (ATs) han sido reportadas en investigaciones llevadas a cabo con diferentes alimentos, así por ejemplo, estudios han reportado la presencia de ATs en tomates (Asam et al., 2011; Da Motta & Soares, 2000), zanahorias (Solfrizzo, De Girolamo, Vitti, & Visconti, 2004), jugos de manzanas (Scott & Kanhere, 2001), olivas (Visconti, Logrieco, & Bottalico, 1986), cerveza (Siegel, Feist, Proske, Koch, & Nehls, 2010), entre otros.

Noser et al. (2011) evaluaron 85 productos de tomate, consistentes en tomates pelados y picados, sopa, salsas, purés, concentrados de tomate, ketchup, así como tomates frescos y deshidratados, los cuales fueron tomados del mercado suizo en 2010. Encontrando que el TeA fue la micotoxina que se encontraba con mayor frecuencia (81/85 muestras) y en los niveles más altos de hasta 790 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En la mitad de tomates pelados y picados los niveles de TeA estaban por encima de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Una muestra de conservas de tomates pelados contenía 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TeA. Tres salsas y un ketchup mostraron niveles de TeA superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los tomates fueron las únicas muestras donde no se detectó TeA.

Tomates y productos de tomate del mercado brasileño fueron evaluados por Da Motta & Valente Soares (2001) para TeA, AOH y AME. Siete de 22 muestras de pulpa contenían niveles de TeA hasta 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En cuatro de 22 muestras de puré se encontraron niveles de TeA en concentraciones de hasta 76 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Terminiello, Patriarca, Pose & Fernández Pinto (2006), encontraron que 39 de 80 muestras de puré de tomate argentino contenían

uno o dos de las micotoxinas TeA, AOH o AME. Dos laboratorios oficiales de control de alimentos en Alemania encontraron TeA en concentraciones de hasta 520 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y AOH hasta 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en tomates y productos de tomate (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen & Umweltschutz 2005, 2006; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit LAVES 2007). Por su parte, Gross et al. (2010) evaluaron productos comerciales de Alemania, utilizando el método ELISA; encontrando TeA en cuatro de los 15 jugos de tomate en el rango de 20-200 ng/mL y dos de 18 ketchups contenía TeA con 55 y 67 ng/mL respectivamente.

La aparición de micotoxinas de *Alternaria* (AOH, AME, TeA, TEN y ALT) en productos alimenticios en los Países Bajos también ha sido evaluada por López et al. (2016, 2014); los resultados mostraron que existían AOH, AME, TeA y TEN en uno o más productos alimenticios. El TeA se encontró en el 27% de las muestras, y en concentraciones relativamente altas (hasta 2345 $\mu\text{g}/\text{kg}$) se pudo encontrar en semillas de girasol, salsas de tomate e higos secos. El ALT apareció frecuentemente en cereales, salsas de tomate, higos, vino y semillas de girasol.

Müller & Korn (2013) investigaron un total de 1064 muestras de trigo en diferentes regiones del Estado de Brandenburgo (Alemania) entre los años 2001 a 2010; analizando AOH, AME, ALT y TeA mediante HPLC con detección de arreglo de diodos y fluorescencia. La ATs más frecuentemente encontrada fue TeA; en 322 de 1,064 muestras (30.3%), 86 de 1064 con AOH (8.1%), 33 de 1,064 con AME (3.1%) y 7 de 267 muestras

(2.6%) con ALT. Los contenidos máximos de toxinas en todos los años fueron 4224 mg/kg de TeA, 905 mg/kg de AME, 832 mg/kg de AOH, y 197 mg/kg ALT.

Vinueza, Martín & García (2009), evaluaron dos métodos de detección cromatográfica y de extracción de TeA a partir de muestras de tomate. Compararon la utilización de una fase móvil binaria compuesta de acetonitrilo y tampón de fosfato (25 + 75, v/v) a pH 3 con otra fase móvil compuesta por un gradiente de agua y acetonitrilo con ácido trifluoracético. Los mejores resultados se obtuvieron con la fase móvil de acetonitrilo y tampón de fosfato, con la que se observó un menor tiempo de retención (8,2 min frente a 23 min) y una mayor sensibilidad (límite de cuantificación de 1,5 µg/mL). Para la extracción y pre-purificación de las ATs, a partir de muestras de tomate se utilizó un método de extracción en fase sólida (SPE) y otro basado en extracción líquido-líquido (LLE), con disolventes orgánicos. Encontrando que la SPE proporcionó un cromatograma libre de interferencias de la muestra en el tiempo de retención del TeA con un límite de detección de 1 µg/g en muestras de tomate; mientras que el método de extracción líquido-líquido, además de ser más laborioso y emplear mayores cantidades de disolventes orgánicos, resultó inadecuado para la detección de AT debido a la co-extracción de otros compuestos de la muestra que interfieren con los resultados.

Da Motta & Valente Soares (2000), aplicaron a productos de tomate pasos simples de extracción, eliminación de grasa y división seguido de cromatografía de complejación metálica en una columna C18 de fase reversa. Los límites de cuantificación en los

productos de tomate fueron 11.0 ng/g para TEA. El TeA se cuantificó en el 21% de las muestras analizadas. Las concentraciones variaron entre <11 y 4021 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Las concentraciones más altas se reportaron para las muestras de puré de tomate (7 muestras fueron $\geq 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$). El TeA también se encontró en muestras de pulpa de tomate (39-111 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

El TeA ha sido encontrado en pasta de tomate en niveles que van desde 0.01 a 0.1 mg/kg (Scott & Kanhere, 1980), en tomates infectados naturalmente a niveles de 11-139 mg/kg (Stinson et al., 1981) y en tomates visiblemente con moho pero frescos recogidos en plantas productoras de ketchup, a niveles de 0.4 - 69.7 mg/kg (Mislivec et al., 1987).

Por su parte, Lohrey, Marschik, Cramer & Humpf (2013), describen una nueva estrategia eficiente y económica para la aplicación del ensayo de dilución de isótopos estables, en el cual logran la síntesis a gran escala de estándares internos marcados isotópicamente de $^{13}\text{C}_2$ -ácido tenuazónico por medio de un procedimiento de tres pasos. Además de un rápido y confiable método basado en purificación de la muestra con QuEChERS para la determinación de TeA en muestras de alimentos y piensos utilizando (HPLC-MS/MS). Este nuevo método tuvo un límite de detección (LOD) de 0.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y un límite de cuantificación (LOQ) de 2.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En total se analizaron 26 muestras de tomates y 4 de pimientos del mercado alemán. El TeA fue encontrado en cada muestra con niveles desde 3 hasta 2330 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (p.114).

Van de Perre et al. (2014) colectaron muestras enmohecidas de tomate fresco (n=161), pimientos (n=47), cebollas (n=61) y futas rojas suaves (n=50) en varios mercados en diferentes países (Bélgica, España, Egipto, Brasil, India y Sudáfrica), para examinarlas en su contenido de micotoxinas emergentes (AOH, AME, TeA) y micotoxinas más establecidas (OTA y fumonisinas: FB1, FB2 y FB3). Encontrando que los datos de consumo belgas y el valor medio obtenido (4230 ng/kg peso corporal/día) fueron más altos que el valor umbral de preocupación toxicológica (TTC) de 1500 ng/kg peso corporal/día establecido por la EFSA.

Tölgyesi, Stroka, Tamosiunas & Zwickelc (2015) describen un nuevo método para la determinación de cinco toxinas de *Alternaria* y *Citrinina* en muestras de tomate y jugo de tomate basadas en detección de LC-MS/MS; *“las muestras se extrajeron con metanol puro, seguido de un paso de derivatización con 2,4 dinitrofenilhidrazina para mejorar la determinación de TeA y para disminuir la gran diferencia de polaridad entre los compuestos de interés. Las muestras se purificaron en cartuchos de extracción de fase sólida de polímero de estireno hidrofílico modificado. El método fue utilizado en una prueba de competencia internacional y los puntajes satisfactorios obtenidos demostraron la fiabilidad del enfoque descrito”* (p.1512).

2.6. Métodos analíticos para el análisis de micotoxinas de *Alternaria*

Muchos de los métodos analíticos utilizados para la determinación de metabolitos fúngicos, son aún específicos para una sola micotoxina o un grupo estrechamente relacionado de micotoxinas. Por lo tanto, se requiere un análisis por separado para cada micotoxina de interés, una limitación importante para controlar una gran cantidad de micotoxinas (Streit et al., 2013).

Los métodos actuales generalmente incluyen un paso de extracción, un paso de limpieza para reducir o eliminar co-extractos no deseados, componentes de matriz (que involucran la limpieza por partición de solventes o extracción en fase sólida) y un paso de separación con capacidad de detección específica adecuada (Krska et al., 2008).

Hasta ahora, se han desarrollado muchos métodos analíticos para la detección y cuantificación de micotoxinas de *Alternaria*. Entre los métodos analíticos empleados para dicho fin se encuentran: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), cromatografía líquida-espectrometría de masas multi-etapa (LC-MSn) y el Ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), entre otros (Man et al., 2016).

Actualmente, hay una fuerte tendencia hacia el uso de métodos multi-micotoxinas para el análisis simultáneo de varias de las más importantes micotoxinas, esto se logra mejor mediante LC-MS/MS.

Para la etapa de extracción, las ATs (ALT, AOH, AME, TEN) son generalmente extraídas de alimentos sólidos y líquidos a través de solventes orgánicos, como diclorometano, metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, cloroformo, o mezclas de solventes orgánicos con agua (tamponada); mientras que en el caso del TeA, se sugiere una extracción con solvente ácido (Scott & Kanhere, 2001; EFSA, 2011, p.15).

Los procedimientos de purificación y concentración generalmente incluyen partición de solvente, extracción en fase sólida (SPE) mediante columnas o microextracción en fase sólida (SPME) (Scott & Kanhere, 2001), basadas principalmente en el uso de columnas de C18; sin embargo están disponible una gran variedad de materiales sorbentes C8, intercambiadores de cationes o aniones fuertes (SCX, SAX) o materiales poliméricos con propiedades combinadas (Krska et al., 2015, p.5).

Además de las técnicas de SPE y SPME, existe una técnica de preparación de muestra rápida, simple y efectiva, llamada QuEChERS (acrónimo en inglés) para abreviar, rápido, fácil, barato, efectivo, resistente y seguro, la cual se ha desarrollado recientemente para la detección de plaguicidas en frutas y verduras (Lehotay et al., 2007).

En cuanto al muestreo para el control oficial de los niveles de micotoxinas, éste ha sido establecido por la Comisión de Regulación (EC) No 401/2006, del 23 de febrero de 2006; sin embargo, el reglamento sólo se refiere a la aflatoxina B1, aflatoxinas totales, ocratoxina A y toxinas de *Fusarium* en cereales y productos de cereales. Los protocolos de muestreo para controlar las toxinas de *Alternaria* en productos alimenticios, por ejemplo los tomates, no se describen en la legislación de la UE (EFSA, 2011).

2.6.1. Técnicas Cromatográficas

2.6.1.1. Cromatografía en Capa Fina TLC

Es un método de análisis cualitativo simple y rápido, que ha sido aplicado para la determinación de ATs por Hasan (1995), usando una mezcla cloroformo:acetona (97:3, v:v) como sistema solvente para detectar AOH, AME, TeA, ATX-I y ATX-II, a partir de tomates por TLC-UV. Aunque la eficiencia de separación y la sensibilidad de detección de la TLC es menor que la de HPLC y GC, la TLC sigue siendo una herramienta analítica indispensable para la detección de micotoxinas en varias matrices debido a sus ventajas, tales como la simplicidad de operación y pretratamiento de la muestra, rapidez, rentabilidad y consumir cantidades más pequeñas de solventes que la LC.

2.6.1.2. Cromatografía de Gases GC

La GC acoplada a diferentes técnicas de detección también ha sido aplicada para la detección de ATs, especialmente la GC-MS, ya que presenta una alta sensibilidad y selectividad en mezclas. Es adecuada para la detección de sistemas no polares y semipolares; compuestos volátiles y semivolátiles, aunque la mayoría de las ATs son moléculas pequeñas, no volátiles y polares, por lo que generalmente necesitan derivatizarse antes del análisis con GC-MS (Köppen, Koch, Siegel, Merkel, Maul & Nehls, 2010).

El uso de la cromatografía de gases (GC) para el análisis de ATs en matrices de alimentos y piensos requiere una derivatización pre-columna. Harvan & Pero (1974) derivatizaron TeA utilizando una mezcla de acetiltrimetilsilano, trimetilsilano y piridina (6:2:9, v/v/v) y detectaron el TeA usando GC con un detector de ionización de llama (FID).

Scott, Weber, & Kanhere (1997) derivatizaron las ATs utilizando heptafluorobutirato (HFB) y trimetilsililo (TMS), y utilizaron GC-MS para la detección de AOH, AME, ALT, ALTX-I y TeA en jugo de manzana. Los resultados mostraron que tanto los derivados de HFB como de TMS son apropiados para la separación de micotoxinas de *Alternaria* por GC antes de la detección con MS y que los valores de LOD reportados para AOH y AME en jugo de manzana fueron de 1 µg/kg.

Sin embargo, la derivatización provoca desventajas, como interferencia de la matriz, pobre repetibilidad, consume mucho tiempo, utiliza costosos reactivos de derivatización y requiere una operación compleja en el proceso de detección GC-MS. Además, GC-MS también tiene efecto de memoria de la inyección de muestras anteriores. Por lo tanto las aplicaciones de GC para la determinación de las ATs son limitadas, debido a las laboriosas reacciones de derivatización necesarias (Man et al., 2016).

2.6.1.3. LC acoplada a detectores UV/DAD/FLD

La Cromatografía Líquida acoplada a un detector de UV (LC-UV) ha sido ampliamente utilizada para la detección de ATs porque la mayoría de las moléculas orgánicas y algunas moléculas inorgánicas tienen la propiedad de absorción ultravioleta. Los contenidos de TeA y AME en tomates y productos de tomate fueron determinados por LC-UV en fase reversa por Stack, Mislivec, Roach, Pohland (1984). Por su parte, Azcarate, Patriarca, Terminiello, Pinto (2008), analizaron 64 muestras de trigo cosechadas en Argentina en 2004 y 2005 utilizando HPLC-UV. Las concentraciones medias de AME, AOH y TeA en las muestras positivas fueron de 2118, 1054 y 2313 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Solfrizzo et al. (2004) utilizaron LC de fase reversa con detector UV con arreglo de diodos (LC-UV/DAD) para la detección de ATX-I, AOH, AME y TeA en zanahorias. Los resultados mostraron que los LOD de TeA, ATX-I, AME y AOH fueron 20, 20, 10 y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Comparado con el detector UV, el LC-DAD se usa raramente

para la detección de ATs debido a la poca sensibilidad. Sin embargo, la sensibilidad de la detección UV de arreglo de diodos (LC-UV/DAD) es alta.

Scott (1991), detectó TeA en productos de tomate por HPLC-DAD, usando una mezcla metanol-agua (90:10, v:v) como fase móvil que contenía 300 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. El LOQ de TeA fue de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por su parte, Myresiotis, Testempasis, Vryzas, Karaoglanidis, Papadopoulou-Mourkidou (2015), emplearon la técnica de extracción QuEChERS acoplada a HPLC-DAD para la determinación simultánea de AOH, AME y TEN en fruta y jugo de granada; los valores de LOD fueron de 15 a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que los LOQ fueron entre 50 y 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

El detector de fluorescencia FLD se usa comúnmente en HPLC; su selectividad y sensibilidad es más alta que la de los detectores UV y DAD. Ha sido empleado para la detección de AOH, AME y ALT en pasta de tomate, por Fente, Jaimez, Vázquez, Franco, Cepeda (1998). Aunque el detector FLD tiene alta sensibilidad de detección, tiene algunas limitaciones porque sólo unas pocas micotoxinas tienen la propiedad de fluorescencia; así por ejemplo el TeA, no se puede detectar por el detector FLD porque no tiene grupos funcionales fluorescentes. Por lo tanto, el uso de LC-UV y LC-DAD es mucho más extendido que la LC-FLD para detectar ATs (EFSA, 2011).

2.6.1.4. LC-MS

Las técnicas de detección de MS tienen mayor sensibilidad en comparación con detectores UV, DAD, FLD y ECD. La LC-MS, especialmente LC-MS/MS o LC-MSⁿ basados en ionización por electrospray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI), han jugado un papel importante en la detección y cuantificación simultáneas de ATs en varias muestras sin derivatización en los últimos años. La fuente de ionización ESI ha sido la más utilizada para la detección de ATs porque tiene mayor sensibilidad que APCI. Tanto la ionización APCI y la ionización ESI, han sido aplicadas a la LC(MS) y LC-MS/MS para la detección de AOH y AME en jugos de manzana y bebidas de otras frutas (Lau, Scott, Lewis, Kanhere, Cleroux & Roscoe, 2003).

El principal problema de la separación con HPLC es el pobre rendimiento cromatográfico del TeA en columnas de fase reversa, porque esta micotoxina tiene fuertes propiedades de quelación de metales y es un ácido relativamente fuerte ($pK_a = 3.5$); por lo que puede causar una forma de pico pobre en HPLC debido a la alta acidez y quelación de metales. Para superar esta limitación, se han diseñado técnicas de apareamiento de iones por adición de alquilamonio fosfato así como intercambio de ligandos o complejación metálica por adición de dodecildietilentriamina y $ZnSO_4$ adicionados a la fase móvil, cuando se utiliza fase reversa. Sin embargo, la aplicación de tales aditivos para mejorar la cromatografía a menudo no es compatible cuando la HPLC se usa acoplado con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Esta es una razón por la cual no

hubo durante mucho tiempo un método HPLC-MS/MS para la determinación de TeA descrito en la literatura (Lohrey et al., 2013, p.114).

Sin embargo, Siegel et al., reportaron en 2010, un método de HPLC-MS/MS que supera la dificultad cromatográfica descrita anteriormente utilizando derivatización del TeA con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e ionización por electrospray (ESI) en el modo negativo; los resultados mostraron que el derivado de DNPH-TeA puede dar una respuesta alta en ESI(+)-IT-MS2. El análisis fue aplicado a muestras de cereales y cerveza, encontrando que los LODs del TeA fueron de 10 y 2 $\mu\text{g}/\text{k}$ respectivamente, y los rangos de linealidad fueron de 50-5000 y de 8-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. El TeA fue detectado en 13 y cuantificado en 3 de 27 muestras de cereales; las concentraciones estuvieron por arriba de 851 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, este paso de derivatización es laborioso y no es compatible con métodos multimicotoxina.

También han sido utilizadas para el análisis de ATs, la LC de ultra-rendimiento (UPLC), y la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC). Walravens et al. (2016), analizaron AOH, AME, TEN, ALT y ATX-I en productos de tomate, jugos de frutas y vegetales, obteniendo resultados que mostraron que los LODs de estas toxinas en productos de tomate fueron de 3.0-8.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, los LOQs de 9.8-61.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y los LOQs de estas toxinas en los jugos de frutas y vegetales de 1.1-5.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$; mientras que, Noser et al. (2011) desarrollaron un método rápido de ultrarendimiento (UP) LC-MS/MS, que

permitió la determinación simultánea de seis ATs, en productos de tomate en Suiza noroccidental.

2.6.2. Ensayo de Dilución de Isótopos Estables SIDA

A pesar que el análisis HPLC-MS/MS, presenta múltiples ventajas como alta selectividad y sensibilidad, esta técnica es susceptible a los efectos de la matriz. La ionización del analito objetivo puede verse afectado por compuestos de coelución de la matriz, que pueden dar como resultado la supresión o mejora de iones. Para compensar los efectos de matriz, a menudo se aplica el análisis de dilución de isótopos estables (SIDA) el cual utiliza patrones isotópicamente etiquetados (Lohrey et al., 2013, p.115).

Además, el SIDA, puede ofrecer beneficios significativos para el análisis de trazas, rinde resultados más precisos y mejora la especificidad de la determinación. Hasta ahora, las principales aplicaciones de SIDA para el análisis de micotoxinas han sido revisados críticamente por Rychlik & Asam (2008 y 2015). En este sentido, Liu & Rychlik (2013) desarrollaron un método SIDA para LC-MS/MS, para la determinación de tentoxina (TTX), dihidrotentoxin (DHT) e isotentoxina (isoTTX) en diferentes productos alimenticios. Hasta el momento, se han desarrollado Ensayos SIDA para la determinación de las micotoxinas más importantes de *Alternaria*.

El enfoque de SIDA también fue utilizado por Lohrey et al. (2013) quienes desarrollaron un método LC-MS/MS para la determinación de ácido tenuazónico (TeA) en productos de tomate y pimiento. El patrón interno marcado isotópicamente $^{13}\text{C}_2$ -TeA fue sintetizado y agregado a las muestras antes de la extracción. Las muestras se suspendieron con agua, se extrajeron con MeCN ácido fórmico (10: 1.1, v:v) y los extractos de muestra fueron purificados utilizando un enfoque QuEChERS. Los valores de LOD y LOQ fueron 0.9 y 2.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente; obtuvo además valores aceptables de recuperaciones (91-99%) y precisión (1-6%). La aplicación de este método a muestras del mercado alemán reveló la presencia de TeA en las 30 muestras analizadas en niveles que variaban de 3 a 2330 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Berthiller, et al., 2014, p.11).

Asam, Liu, Konitzer & Rychlik (2011), desarrollaron un ensayo de dilución de isótopos estables (SIDA) para la micotoxina de *Alternaria* TeA. Para lo cual, el [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$]- ácido tenuazónico, se sintetizó a partir de [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$]-isoleucina mediante la ciclación intramolecular de Dieckmann después de la acetoacetilación con diceteno. El [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$]- ácido tenuazónico sintetizado se usó como estándar interno para la determinación de ácido tenuazónico en productos de tomate por LC-MS/MS después de derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

La validación del método reveló un límite de detección de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y un límite de cuantificación de 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La recuperación fue cercana al 100% en el rango de 3-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se logró un coeficiente de variación de 2.3% y 4.7% para muestras de tomate y

kétchup, respectivamente. Los contenidos de TeA en muestras de tomate (n=16) estuvieron entre 15 y 195 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que las muestras de ketchup, (n = 9), tuvieron valores de 363 y 909 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y las pastas de tomate (n = 2) valores de 8 y 247 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2.6.3. Ensayos de Inmunoespecificidad

Los inmunoensayos son una clase de técnicas analíticas en las que la reacción entre un antígeno y su anticuerpo se utiliza para la cuantificación del antígeno en una muestra desconocida. Los métodos inmunológicos además de ser utilizados en la detección y cuantificación de micotoxinas, también han sido utilizados en procedimientos de limpieza y concentración de muestras; para lo cual se emplean anticuerpos, ya sea monoclonales o policlonales, contra una micotoxina particular que se desea detectar (Sharma, Pillai, Gautam & Hajare, 2014).

Los inmunoensayos ofrecen varias ventajas sobre los métodos convencionales utilizados para la detección y cuantificación de micotoxinas, se puede analizar un gran número de muestras en un tiempo y el tiempo de respuesta del ensayo es relativamente bajo. Debido a la alta especificidad de los procedimientos de inmunoensayo, no es necesario una preparación elaborada de la muestra (Sharma, Pillai, Gautam & Hajare, 2014, p.869). Adicionalmente los métodos analíticos instrumentales de GC-MS y LC-MS requieren equipos costosos y técnicos altamente calificados, por lo que los inmunoensayos representan una opción relativamente económica y práctica.

2.6.3.1. ELISA

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se caracteriza por la simplicidad de operación, miniaturización, rapidez y portabilidad. Se ha convertido en un foco de investigación tanto cuantitativa como de detección semicuantitativa de micotoxinas, incluida las ATs. Hasta ahora, el método ELISA ha sido utilizado para detectar AAL, AOH y TeA, y puede ser útil para la evaluación de la ocurrencia de micotoxinas de *Alternaria* en alimentos y alimentos para animales (EFSA, 2011).

2.7. Regulaciones y normativas

Las autoridades sanitarias europeas han establecido niveles máximos permitidos de determinadas micotoxinas como las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1, ocratoxina A, patulina, deoxinivalenol, zearalenona y fumonisinas B1 y B2, y toxinas T-2 y HT-2 en los alimentos (Pavón Moreno et al., 2012). Pero a pesar que, son cada vez más frecuentes los casos de productos hortofrutícolas y sus derivados en los que se demuestra la presencia de micotoxinas de *Alternaria*; aún no existe regulación en la UE u otros países, para este grupo de micotoxinas (Fernández-Cruz et al., 2010, p.113; Man et al., 2016). Los organismos reglamentarios requieren métodos analíticos validados adecuados y pruebas de detección rápida para un control de alimentos rentable a gran escala.

El organismo responsable del componente de evaluación de riesgos del Codex Alimentarius es el JECFA. La función del JECFA es proporcionar al Codex Alimentarius

una evaluación científica de la toxicidad de los aditivos alimentarios y contaminantes, como las micotoxinas, para establecer niveles seguros para el consumo humano (Berg, 2000). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Comité Permanente Europeo han recomendado que los estados miembros de la Unión Europea recolecten datos sobre la existencia de micotoxinas de *Alternaria* en productos alimenticios; ya que la EFSA evidenció una falta de robustez de datos de aparición de ATs en alimentos y productos procesados, por lo que se recomendó la recolección de datos representativos en toda Europa para permitir una evaluación adecuada de riesgos (Rodríguez-Carrasco et al., 2016).

En 2011, la EFSA, publicó los resultados de un estudio nutricional exploratorio, realizado para evaluar la exposición diaria a AOH, AME, TeA y TEN en los grupos de población comprendidos entre los 18 y 65 años. En este estudio se determinó que los niveles diarios de ingesta eran de 1,9-39 ng/kg de peso corporal para el AOH, 0,8-4,7 ng/kg de peso corporal para el AME, 36-141 ng/kg de peso corporal para el TeA y 0,01-7 ng/kg de peso corporal para la TEN. Aunque la exposición a las micotoxinas de *Alternaria* spp., no se ha estudiado en la población infantil, se estima que su ingesta es dos o tres veces mayor que en la población adulta.

3. METODOLOGÍA

3.1. Descripción y diseño de la investigación

Esta investigación es de tipo aplicada, donde el objetivo central fue la identificación de micotoxinas producidas por especies del género *Alternaria spp.*, en muestras de tomate y pastas de tomates producidos en Panamá y los niveles de concentración de estas micotoxinas, mediante el uso de técnicas de análisis químico avanzadas.

La investigación desarrollada tiene un enfoque cuantitativo, de acuerdo al alcance es de tipo descriptivo y de acuerdo al diseño es experimental.

Se realizó inicialmente un análisis de tipo cualitativo de cada muestra (sin replicas), con esto se buscaba determinar la presencia o no de micotoxinas en la muestra. Aquellas que resultaron positivas a determinada micotoxina, eran entonces analizadas cuantitativamente mediante la adición de estándar interno marcado isotópicamente y analizada por duplicado mediante LC-MS/MS.

3.2. Diseño de muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio, sistemático al azar en zigzag en tres fincas productoras de tomate ubicadas en la provincia de Chiriquí (región de Cordillera de Boquerón y Volcán). El diseño de muestreo consistió en delimitar en cada finca, una parcela de 100 m² dentro de cada una de ellas se establecieron tres puntos de muestreo. Por cada punto de muestreo se colectó una muestra (es decir tres muestras por finca). Cada muestra

estuvo conformada por 5 tomates. Se logró colectar un total de nueve muestras de tomate. Adicionalmente, se tomó una muestra “control” o “testigo” de tomates que presentaba evidente daño o lesión fúngica correspondientes a la contaminación por *Alternaria spp.* (enmohecimiento negro). Esta muestra *control* estaba conformada por cinco tomates provenientes de las tres fincas bajo estudio.

En cuanto a las pastas de tomate se evaluaron dos marcas de pasta de tomate (producidas en el país con tomates panameños) las cuales fueron compradas en supermercados locales. Se obtuvo una muestra por cada marca. Cada muestra estaba conformada por cinco sobres de 113 g de pasta.

Las muestras fueron analizadas por duplicado en el laboratorio y cada una de ellas se evaluó en términos cuantitativos para tres micotoxinas: Ácido tenuazónico (TeA), Alternariol (AOH) y Alternariol monometil éter (AME); mientras que en términos cualitativos se determinó adicionalmente: Alvertoxina I, Alvertoxina II, Tentoxina y Alterperilenol ALPT.

3.3. Variables

Variables dependientes: concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de: alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), ácido tenuazónico TeA.

Variables independientes: temperatura, humedad, variedad de tomate, marca de la pasta de tomate, lote de producción de la pasta de tomate.

3.4. Planificación de la investigación

3.4.1. Fase pre-analítica

Las muestras de tomate colectadas fueron almacenadas bajo refrigeración a 4°C, en bolsas plásticas con sello hermético, antes de su pre-tratamiento. El pre-tratamiento de las muestras de tomate fue realizado en el laboratorio del Centro de Investigación en Productos Naturales y Biotecnología CIPNABIOT de la Universidad Autónoma de Chiriquí.

Las muestras fueron procesadas mediante trituración mecánica para lo cual se utilizó un “Hand Blender” Quick Prep® de Cousinart modelo CSB-33. Las muestras fueron homogenizadas durante 4 minutos cada una, empacadas posteriormente en tubos eppendorf para centrifuga de 50 mL, congeladas y enviadas bajo refrigeración a -4°C hasta Múnich, Alemania para su análisis al Laboratorio de Química Analítica de Alimentos de la Universidad Técnica de Múnich (Technische Universität München).

Una vez llegaron las muestras al laboratorio en Alemania, fueron almacenadas en un cuarto frío a -20°C hasta su análisis.

3.4.2. Fase Analítica

3.4.2.1. Preparación de la muestra

- ***Extracción de la muestra***

Las toxinas fueron extraídas de la matriz de muestra de estudio (tomate), utilizando una porción de 1 g la cual fue pesada (balanza Sartorius basic BA 210S) y transferida a un tubo de centrifuga de 15 mL. Se añadieron 0.5 g de NaCl (VWR International, Belgium) a cada muestra, y se extrajeron con 10 mL de la mezcla de solventes Metanol/Acetonitrilo/agua (10:45:45 v/v/v) pH 3.5, se homogenizó en vortex (Vortex-2 Genie Scientific Industries, Inc. G-560E) por 20 segundos y posteriormente se llevó a baño ultrasónico (Sonorex Bendelin Super RK106) por 30 minutos.

Los extractos de las muestras fueron centrifugados (Rotana 460R Hettich Zentrifugen) utilizando un ciclo de centrifugación de 3000 rpm a 20°C durante 5 minutos. El sobrenadante fue extraído y llevado a concentración en un rotavapor (Heidolph G3) adaptado a una bomba de succión al vacío (VWR International). Se concentró la muestra a 40°C hasta obtener la mitad del volumen inicial.

En el caso de las muestras de pasta de tomate fue necesario diluir 300 mg de pasta en 700 μ L de agua (HiPerSolv Chromanorm Reag. for LC/MS VWR Chemicals) y continuar el proceso de extracción antes descrito.

- ***Purificación de la muestra***

Las muestras fueron purificadas mediante extracción en fase sólida SPE, para lo cual se utilizaron cartuchos para SPE de 6 mL que contenían 500 mg de C-18 (Discovery® DSC-18 Supelco®, USA) y un sistema de vacío múltiple (con 24 conexiones) adaptado a un colector (SPE Vacuum manifold) para acomodar los cartuchos de SPE.

Los cartuchos para SPE fueron activados y acondicionados con 6 mL de metanol (VWR. BDH Chemicals, France), seguido de 6 mL de agua pH 5.5 (acidificada con ácido fórmico 0.1%), se eluyó dejando una pequeña capa del líquido en ambos casos. Se colocó el extracto de la muestra, posteriormente se lavó con 6 mL de agua pura y se eluyó hasta sequedad. Finalmente, la muestra fue eluída con 6 mL de metanol y 9 mL de una mezcla de metanol/hidróxido de amonio al 2%.

El extracto purificado fue llevado a evaporar hasta sequedad en el rotavapor a 40°C. El residuo de las paredes fue reconstituido con 500 µL de una mezcla metanol/agua (1:1 v/v). Se agitó en vortex por 20 segundos y se dejó bajo refrigeración durante una noche. Posteriormente se filtró utilizando microfiltros de 0.22 µm de espesor y jeringas de filtración 1x100 (NORM-JECT® 2mL (3mL), HSW, Germany).

3.4.2.2. Cuantificación de micotoxinas de *Alternaria*

- *Adición de Estándar interno*

Para la cuantificación de las toxinas de *Alternaria* se empleó un método de Ensayo de dilución de isótopos estables SIDA. Para lo cual se pesó 1 g de muestra y se añadió 100 μ L del estándar interno de las micotoxinas TeA, AME y AOH marcado isotópicamente, a cada muestra, y se continuó el proceso de preparación de la muestra, extracción y limpieza antes descrito.

Las diluciones de los estándares internos para AME y AOH estaban preparadas en acetonitrilo y para TeA en metanol. Los estándares internos fueron almacenados bajo refrigeración a -8°C .

Cuadro 3. Preparación de estándares internos para SIDA

Estándar interno	Concentración [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Volumen (μL)
[$^2\text{H}_4$]-AOH	1.0	100
[$^2\text{H}_4$]-AME	0.1	100
[$^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}$]-TeA	1.0	100

- *Análisis en HPLC-MS/MS*

La detección e identificación de las toxinas se realizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandém LC-MS/MS con ionización por electrospray ESI.

Para la separación de las micotoxinas se empleó un equipo HPLC compuesto por un cromatografo líquido LC-30 AD Nexera X2, adaptado a una unidad de desgasificación DGU-20 A5R, con auto sampler SIL-30AC Nexera X2, horno para columna CTO-20 AC Prominence, detector de arreglo de diodos SPD-M30A Nexera X2, módulo de comunicación CBM-20A, Shimadzu value unit. Como detector se empleó un espectrómetro de masa triple cuádruplo ión trap LC-MS-8050 Shimadzu Liquid Chromatograph Mass Spectrometer.

Las columnas utilizadas fueron; para el caso de la micotoxina TeA una columna de HPLC Gemini-NX 3u C18 110A, tamaño 150 x 4.60 mm (Phenomenex®, USA) y para las otras micotoxinas (AOH, AME, TEN, ATX, ALTP), una columna HPLC Hyperclone 3u BDS C18 130A, tamaño 150 x 3.20 mm, (Phenomenex®, USA).

El sistema de elución estuvo compuesto por dos bombas; bomba a (fase acuosa) y bomba b (fase orgánica), programadas de la siguiente manera:

Cuadro 4. Programa de elución del HPLC para AOH, AME, TEN, ATX-II y TeA

Parámetro	AOH, AME, TEN, ATX-II	TeA
Bomba A	Acetonitrilo/2-propanol/agua 17.5/17.5/65 v/v/v	Formiato de amonio 5mM pH 9.0
Bomba B	Metanol puro	Metanol puro
Velocidad de flujo (mL/min)	0.2	0.5
Vol. de inyección (µL)	10	10
Temperatura columna (°C)	30	40

Para el gradiente de composición de la fase móvil, se diseñaron dos programas: el programa 1 para las micotoxinas AME, AOH, ATX-I, ATX-II, TEN, ALTP y el programa 2 solamente para el TeA.

Cuadro 5. Gradiente de elución de fase móvil para AOH, AME, ATX I, ATX II, TEN y ALTP

Tiempo (min)	Módulo	Porcentaje (%)
03:00	Bomba B	0
22:00	Bomba B	100
23:00	Bomba B	100
25:00	Bomba B	0
30:00	Alto	

Cuadro 6. Gradiente de elución de fase móvil para TeA

Tiempo (min)	Módulo	Porcentaje (%)
03:00	Bomba B	5
08:00	Bomba B	100
10:00	Bomba B	100
12:00	Bomba B	5
23:00	Bomba B	5
23:00	Alto	

El tiempo de análisis en el equipo fue de 30 minutos para el programa 1 y de 23 minutos para el programa 2, por muestra. Para realizar los lavados se utilizó una mezcla agua/metanol 50:50 (v:v).

La detección de los analitos fue llevada a cabo por un analizador de masa de triple cuadrupolo (MS/MS) en el modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). Las condiciones

operacionales del detector fueron las siguientes: fuente de ionización ESI en modo negativo, la velocidad de flujo de gas de calentamiento 10 L/min, la velocidad de flujo del gas de nebulización 3 mL/min, el caudal de gas de secado 10 L/min. La temperatura del bloque de calentamiento 400°C, la temperatura de la línea de desolvatación 250°C, la temperatura de la interfase 300°C, tensión del capilar 4 kV, presión del gas de disociación inducida por colisión CID, 270 kPA.

El software utilizado para la adquisición de datos y procesamiento de los espectros obtenidos del equipo LC-MS/MS, fue LabSolutions (Shimadzu Kyoto, Japón).

3.5. Hipótesis

H1= no existen diferencias significativas entre los niveles de las ATs: AOH, AME y TeA encontrados en muestras de tomates en las fincas bajo estudio.

H2= no existen diferencias significativas entre los niveles de ATs: AOH, AME y TeA encontrados en las pastas de tomates de las marcas analizadas.

H3=no existe correlación entre los niveles de ATs: AOH, AME y TeA detectados en las muestras analizadas.

3.6. Tratamiento estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se realizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar la existencia o no de diferencias significativas en el contenido de las micotoxinas TeA, AME, AOH, entre las fincas bajo estudio y las marcas de pasta de tomate. Se aplicó esta prueba, debido a que los datos analizados no cumplían los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas necesarios para poder aplicar una prueba ANOVA. Para ello fue necesario inicialmente someter los datos a las pruebas Shapiro Wilks (normalidad) y Levene (homogeneidad de varianzas). En los casos en que existían diferencias significativas se empleó la prueba Tukey HSD, para determinar cuáles tratamientos eran diferentes con un nivel de significancia del 95%.

Para esta investigación se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), dadas las condiciones homogéneas de las unidades experimentales en el laboratorio.

El modelo matemático de este diseño tiene la forma:

$$\text{Respuesta} = \text{Constante} + \text{Efecto Tratamiento} + \text{Error}$$

Por lo tanto el modelo empleado será el Modelo Aditivo Lineal (MAL)

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$$

Donde:

μ =es la media global,

τ_i =es el efecto del i-ésimo tratamiento (finca/marca)

E_{ij} =es el error atribuible a la medición

Y_{ij} =corresponde al nivel de Micotoxina (AOH, AME o TeA) en las muestras de tomate

Las muestras fueron agrupadas por finca productora y las pastas de tomate por marca bajo estudio; ya que el principal objetivo de este estudio es detectar la prevalencia de muestras contaminadas con especies del genero *Alternaria spp.*, en las dos etapas estudiadas (campo y producto procesado).

Adicionalmente, se realizaron pruebas de correlación en forma independiente de los valores de las concentraciones entre las micotoxinas encontradas en las muestras analizadas, para lo cual se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. El programa estadístico utilizado fue R Studio 3.4.

3.7. Actividades

1. Realizar muestreo en tres fincas productoras de tomate en la provincia de Chiriquí.
2. Obtener muestras de pastas de tomate de producción nacional, de establecimientos comerciales en el distrito de David, provincia de Chiriquí.
3. Realizar pre-tratamiento y almacenamiento de las muestras de tomate y salsas de tomate en el laboratorio.
4. Realizar preparación de la muestra (extracción, limpieza, concentración, filtración) para su análisis cromatográfico.

5. Realizar análisis cromatográfico para determinar niveles de ATs en las muestras de tomate y pastas de tomate utilizando un método de LC-MS/MS.
6. Tabular datos y realizar cálculos de la concentración de ATs en $\mu\text{g}/\text{kg}$.
7. Analizar estadísticamente los resultados.
8. Redactar informe final de investigación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Preparación de muestra

Las muestras de frutos de tomate utilizadas en este estudio fueron recolectadas al azar en tres fincas del Distrito de Tierras altas, Provincia de Chiriquí, durante el mes de enero de 2018. Las muestras de pasta de tomate se obtuvieron como producto a la venta en supermercados de la localidad. Las muestras recolectadas fueron sometidas al proceso de preparación de muestra; el cual consistía en el uso de técnicas de extracción mediante mezcla de solventes orgánicos, baño ultrasónico, centrifugación y concentración en rotavapor. Posteriormente, las muestras fueron purificadas mediante extracción en fase sólida SPE y analizadas en su contenido de micotoxinas de *Alternaria* mediante LC-MS/MS.

Los métodos analíticos basados en cromatografía, tal como el que se aplicó en esta investigación, requieren de solventes de extracción para liberar la micotoxina de la matriz de la muestra y subsecuentemente limpieza del extracto para reducir los efectos de la matriz. Vinueza, Martín & García (2009); Da Motta & Soares (2000); Solfrizzo, De Girolamo, Vitti, & Visconti (2004); Scott & Kanhere (2001), han reportado el uso de diversas combinaciones de solventes orgánicos para la extracción de ATs, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las micotoxinas de interés; sin embargo para la aplicación de la etapa de extracción, las muestras de tomate y pasta de tomate utilizadas en este estudio, fueron tratadas siguiendo los protocolos desarrollados en el Laboratorio de Química Analítica de Alimentos de la Universidad Técnica de Munich, y descritos por Gotthardt et al. (2019), los cuales se obtuvieron mediante pruebas preliminares utilizando

diferentes proporciones de acetonitrilo, metanol y agua, así como la adición de diferentes cantidades de ácido fórmico con el fin de optimizar la extracción de las micotoxinas en este tipo de matrices y los cuales han reportado buenas tasas de recuperación para todos los analitos.

4.2. Extracción y purificación

Se pesó en un tubo de centrifuga de 15 mL, un gramo de muestra macerada y homogenizada. En el caso de las muestras de pasta de tomate, debido a que se encuentran más concentradas, fue necesario realizar la dilución de la misma (300 mg/700 μ L de agua) antes de realizar el proceso de extracción. Las micotoxinas fueron extraídas con una mezcla metanol/acetonitrilo/agua (10:45:45 v/v/v) pH 3.5.

En muestras que contienen un alto contenido de agua, como lo son los tomates (superior al 90%), Tölgyesi et al. (2015) indican que la extracción con solventes inmisible en agua no es conveniente a menos que se realicen extracciones en forma repetitiva (p.1519). Por tal razón, en esta investigación, la extracción se realizó con una mezcla de agua con disolventes orgánicos miscibles en ésta, tales como el metanol y acetonitrilo (solubilidad en agua 100% m/m).

Los extractos fueron sometidos a procesos de homogenización en vortex para facilitar la superficie de contacto entre la muestra y la mezcla extractora, de tal manera que se logrará

extraer la mayor cantidad de analitos posible. Así mismo la muestra fue sometida a sonicación para desgasificar y reducir posibles interferencias dentro del sistema HPLC. Posteriormente se centrifugó para decantar el extracto. Los extractos se concentraron mediante rotavapor hasta obtener la mitad del volumen inicial.

Para lograr una mayor purificación y el enriquecimiento del analito, los extractos fueron sometidos a extracción en fase sólida SPE. A pesar que existen en la actualidad una gran cantidad de materiales sorbentes, el más utilizado en fase reversa, son los cartuchos con C18 (octadecilsilano); con los cuales se logra una retención adecuada y suficiente de los analitos de interés. Adicionalmente, estudios preliminares realizados por Gothardt et al. (2019) demostraron, que las columnas de fase sólida fueron las que presentaron un mejor desempeño para la purificación simultánea de las ATs. Otra ventaja de éstos cartuchos es de acuerdo a Tölgyesi et al. (2012), la adsorción selectiva de componentes básicos de la matriz a pH ácido mediante interacción iónica.

Las condiciones de lavado y elución fueron cuidadosamente realizadas y consistieron en la adición de un total de 6 mL de metanol y 6 mL de agua pH 5.5, los cuales permitieron la activación y acondicionamiento de los cartuchos de SPE. La adición de ácido fórmico, para acidificar el agua, mejoró la extracción de las perileno quinonas. La activación es el primer paso en SPE, en él se utiliza un solvente orgánico que permite humidificar la fase estacionaria; por su parte en el acondicionamiento, la fase estacionaria de SPE se

acondiciona con el mismo solvente de la matriz, así, con matrices acuosas el solvente es agua.

Esta segunda etapa de acondicionamiento permite mejorar la interacción entre el analito y la fase estacionaria; se logra con ésto además, eliminar cualquier solvente orgánico residual, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna o cartucho.

Seguidamente se adicionó la muestra para la extracción en fase sólida; en esta etapa de retención, se dan las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria, quedando retenidas las que muestran afinidad por el adsorbente de SPE. El caudal de la muestra fue controlado mediante el uso de una bomba de vacío. Posteriormente, se lavó con 6 mL de agua pura (VWR. BDH Chemicals, France), lo que permitió la eliminación de compuestos matriciales que pudiesen causar interferencia, eliminándolos del adsorbente de SPE hasta que sólo las ATs quedarán atrapadas. Esto debido a que el C18, al retener compuestos hidrofóbicos puede con un lavado de agua, eliminar contaminantes, mientras que los compuestos de interés no son eluidos del adsorbente.

La elución de la muestra se realizó con 6 mL de MeOH puro y 9 mL de una mezcla MeOH+NH₄OH 2%; con lo cual se obtuvieron eluatos limpios para todos los compuestos de estudio. La realización cuidadosa del método de limpieza es esencial para la efectividad del método analítico.

Finalmente, la muestra purificada fue nuevamente concentrada en rotavapor, hasta sequedad; reconstituida con una mezcla metanol/agua (1:1 v/v), filtrada mediante microfiltros (0.22 μm) y almacenada en viales hasta su análisis en LC-MS/MS.

4.3. Calibración y cuantificación mediante el Ensayo de Dilución de Isótopos Estables (SIDA)

Un desafío que presenta el análisis de ATs es de acuerdo con Asam et al. (2009) el hecho que la *Alternaria spp.*, tenga la capacidad de infestar una gran variedad de sustratos; lo que amplía el rango de muestras analíticas que requieren diferentes procesos de preparaciones de muestras y validación de métodos por separado. Rychlik (2012), propone el uso de isótopos estables como estándares internos, ya que es una herramienta útil, que ayuda a reducir tanto las pérdidas de analitos durante la preparación de la muestra, como la supresión de iones en la interfaz ESI del instrumento LC-MS/MS.

El SIDA es reconocido como un método analítico primario; éste implica la adición de un estándar interno etiquetado isotópicamente, a la muestra. “*El estándar interno puede añadirse antes de la preparación de la muestra o antes de la medida*” (Rubinson & Rubinson, 2001, p.113). Los patrones internos deben ser sustancias muy similares a los analitos buscados en cuanto a su estructura molecular, pero diferente, respecto al peso molecular.

De acuerdo con Skoog, Holler & Nieman (2001): *“usualmente el marcaje implica la preparación de un estándar al que se han incorporado uno o más átomos de deuterio, carbono 13 o de nitrógeno 15. Se supone que durante el análisis las moléculas marcadas se comportan de la misma forma que las no marcadas”* (p.572).

Este método SIDA ha sido utilizado con éxito en el análisis de ATs por Asam et al. (2009, 2011), Liu & Rychlik (2013) y Lohrey et al. (2013); en muestras alimenticias complejas. Tölgyesi et al. (2015), identifica a las pastas de tomate como las muestras más complejas, debido a los aditivos y conservantes presentes en ellas y a la posibilidad de encontrar componentes coeluyentes de la matriz, los cuales podrían tener efectos sobre la intensidad de la señal de los analitos, reduciendo la precisión y exactitud (p.1519). En estos estudios no se encontraron efectos adversos en la sensibilidad, ni en la separación en cromatografía líquida al utilizar el método SIDA, mientras que aquellas muestras en las que se llevaron a cabo procedimientos de derivatización presentaron problemas serios de interferencia en el análisis por LC-MS/MS.

Los método de calibración por adición de estándar (como los marcados isotópicamente) se pueden usar para minimizar errores causados por el efecto de supresión iónica; ya que de acuerdo con Christian (2009), una dificultad que se encuentra a menudo en los métodos espectrométricos es la supresión (o a veces intensificación) de la señal original por la matriz de la muestra. En la calibración por adición de estándar, el estándar se agrega a la muestra, por lo que será sometido a los mismos efectos de la matriz que el analito. La

medición de la relación de señales de analito y estándar interno cancela las interferencias (p.533).

Antes de utilizar un estándar interno, es necesario una calibración, tanto para el estándar como para el analito (Rubinson & Rubinson, 2001, p.113). Skoog et al. (2001), señalan que se pueden obtener resultados más precisos cuando se añade una cantidad fija de un patrón interno tanto a las muestras analíticas como a los patrones de calibración.

En nuestro ensayo, se añadieron 100 μL de cada estándar interno marcados con isótopos estables de $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-AOH}$, $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-AME}$ y $[\text{}^{13}\text{C}_6\text{}^{15}\text{N}]\text{-TeA}$ a las muestras antes de su preparación. Cabe señalar que estos estándares internos marcados isotópicamente fueron añadidos únicamente a las muestras de tomate y pasta de tomate que en el análisis cualitativo preliminar resultaron positivos para la presencia de las micotoxinas AOH, AME y TeA.

Asam et al. (2009) han encontrado que la relación entre la señal del analito (A) y la del estándar (S) no es en general lineal, por lo que la determinación de un rango lineal de trabajo se debe llevar a cabo utilizando una función de respuesta. Por lo tanto, se llevó a cabo la calibración mediante la determinación del factor de respuesta (RF) entre el relación molar $n(\text{S})/n(\text{A})$ y la relación de áreas de los picos $A(\text{A})/A(\text{S})$ obtenidas del análisis espectrométrico.

En nuestros análisis de las micotoxinas AOH, AME y TeA las funciones de respuestas fueron las siguientes:

Cuadro 7. Funciones de respuesta para cada micotoxina analizada

AOH	AME	TeA
$y = 0.0826x + 0.0024$	$y = 0.6455x + 0.0206$	$y = -0.0052x^2 + 1.996x + 0.0588$

Donde $x = A(A)/A(S)$, $y = n(A)/n(S)$

En las Figuras 2 y 3, se observan las calibraciones previamente realizadas para las micotoxinas AOH, AME y TeA; en ellas se representan la relación entre la intensidad de la señal de las especies del analito y de los patrones internos en función de la concentración de analito.

Las propiedades fisicoquímicas de estas sustancias, y especialmente, los potenciales de ionización son muy parecidas o están muy cerca de las del analito que aparece en forma natural, pero es posible la distinción entre el analito y el patrón interno por el peso molecular más elevado (debido a la incorporación de isótopos).

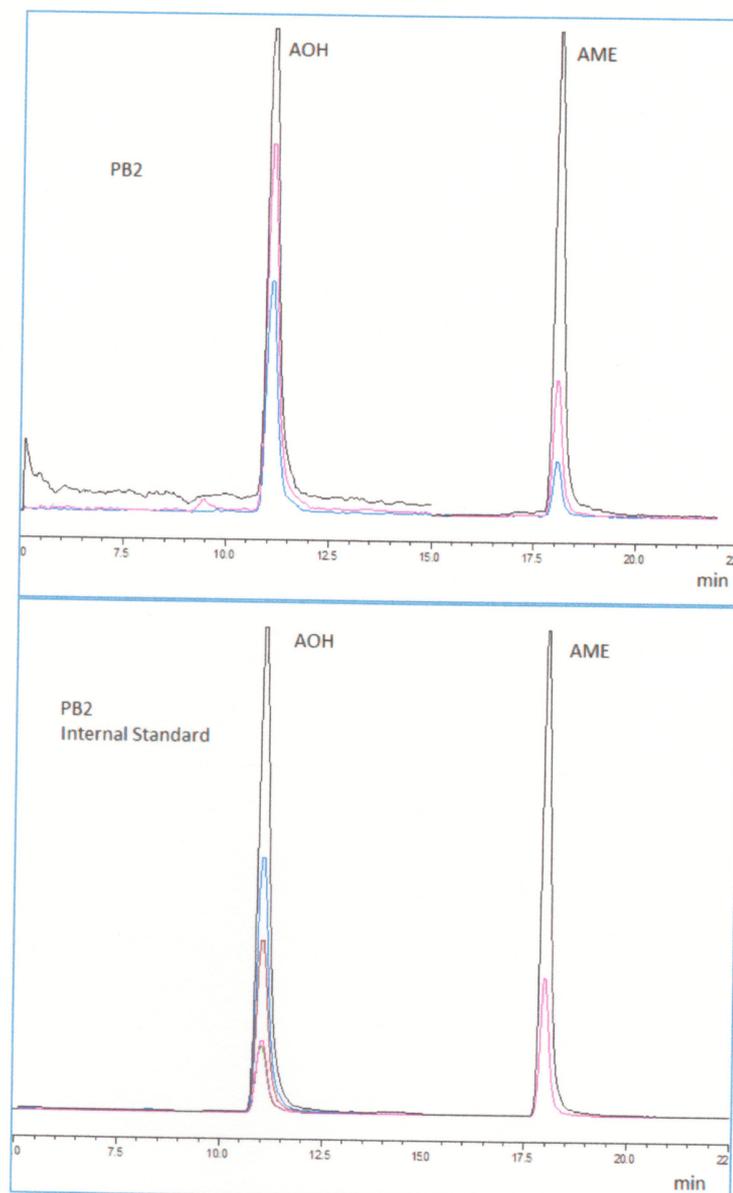


Fig. 2. Cromatograma de muestra de pasta de tomate naturalmente contaminada con AOH y AME vs calibración con estándar interno AOH y AME

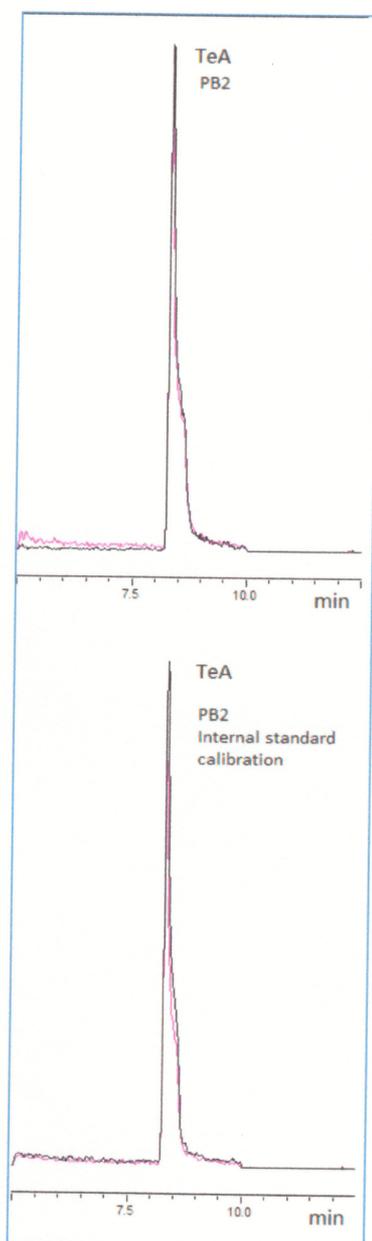


Fig. 3. Cromatograma de muestra de pasta de tomate naturalmente contaminada con TeA vs calibración con estándar interno de TeA

4.4. Gradiente de separación de AOH, AME, ATX-I-II, TEN, ALTP y TeA

Se programó un gradiente binario para la separación de AOH, AME, ATX I, ATX II, TEN y ALTP, con una tasa de flujo de 0.2 mL/min de la siguiente manera: 0-3 minutos 0%B, el gradiente fue elevado linealmente hasta 100% B, finalizando a los 23 minutos y desde 25 a 30 minutos 0% B. Mientras que para TeA el gradiente programado con una tasa de flujo de 0.5 mL/min fue de 0-3 minutos 5%B, seguido desde los 8 a 10 minutos 100% B y desde los 12-23 minutos regresó a 5%B. En las figuras 4 y 5 se muestran los gráficos de estos gradientes de separación cromatográfica.

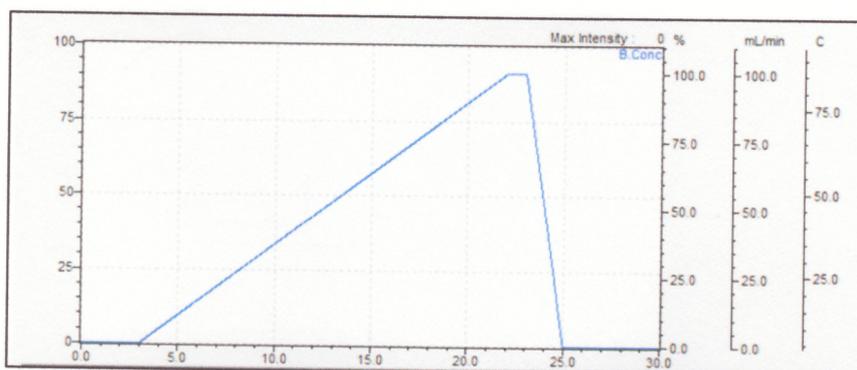


Fig. 4. Programa de gradiente de separación para AOH, AME, ATX I, ATX II, TEN, ALTP



Fig. 5. Programa de gradiente de separación para TeA

La separación de las micotoxinas AME, AOH, ATX-I, ATX-II, TEN, ALTP, se obtuvo bajo las condiciones de gradiente antes descritas durante 30 min y para TeA durante 23 minutos. Fue necesario el desarrollo de dos programas de elución debido a la diferencia de polaridad del TeA, con respecto a las otras ATs. Los tiempos de retención se pueden observar en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Tiempos de retención para cada micotoxina de *Alternaria*

Analito	AOH	[² H ₄]-AOH	AME	[² H ₄]-AME	TEN	ATX I	ATX II	ALTP	TeA	[¹³ C ₆ , ¹⁵ N]-TeA
Tiempo de retención (min)	11.0	11.0	18.0	18.0	12.3	9.4	13.5	9.35 y 9.95	8.3	8.3

4.5. Cuantificación de la micotoxinas por LC-MS/MS

Las micotoxinas estudiadas, fueron separadas por LC en fase reversa y la detección de los analitos fue llevada a cabo utilizando un espectrómetro de masa en tándem con fuente de ionización por Electrospray ESI en modo negativo. El analizador de masas de triple cuadrupolo (MS/MS) y trampa de iones, se trabajó en modo de MRM (monitoreo de múltiples reacciones), que mide respectivamente iones productos, obtenidos a partir de los iones progenitores por Disociación Inducida por Colisión (CID). Una de las características del cuadrupolo de trampa iónica es su capacidad para aislar un ión y fragmentarlo mediante CID, obteniéndose así el espectro de fragmentación ó espectro MS/MS.

Se identificó y cuantificó AOH, AME, TeA, ATX-I, ATX II, TEN y ALTP al comparar los tiempos de retención y espectros de masas registrados en el equipo con lo de sus estándares respectivos e integrando las áreas de los picos. Producto del escaneo completo se registraron los espectros de iones para AOH, AME y sus estándares deuterados; así como para el TeA y su estándar isotópicamente marcado.

La confirmación espectral de los picos obtenidos de las ATs consistió en la verificación de las transiciones específicas, seguida de la comprobación de las abundancias relativas de cada ión (Cuadro 9).

La espectrometría de masas (MS) es básicamente una técnica instrumental que produce, separa y detecta iones, para medir la masa de los iones y su abundancia en la fase gaseosa, según su relación masa/carga (m/z). En el caso de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), ésta permite fragmentar una especie de ión separada por espectrometría de masa de todas las demás producidas, y transmitir sus fragmentos a otro espectrómetro de masa para continuar su análisis.

La muestra se introduce a través de la fuente, se separa, se hace pasar por una abertura hacia una cámara en donde un fragmento dado se rompe aún más y después se analiza en un segundo espectrómetro de masas. Cualquier ión inicial se llama el ión original (ión padre), los iones fragmentados que pasan al segundo espectrómetro de masas se llaman iones producto (Rubinson & Rubinson, 2000, p.396).

La molécula se fragmenta mediante diferentes mecanismos; los fragmentos de la ruptura ayudan a corroborar la identidad de la molécula. Una vez obtenida la fragmentación del AOH, AME y TeA se verificaron las transiciones de masa de los cuantificadores y los calificadores de los analitos. En el Cuadro 9, se puede observar los respectivos iones precursores con sus iones productos para cada ATs y estándar marcado isotópicamente.

El equipo utilizado cuenta con un analizador de masa de triple cuadrupolo (MS/MS), éste se trata de una configuración de tres cuadrupolos situados de forma secuencial, de tal manera que el primero y último (Q1 y Q3) actúan como cuadrupolos normales, mientras que el segundo tiene unas características especiales y se denomina celda de colisión. En esta celda se introduce una pequeña cantidad de gas (He, Ar), de forma que los iones que entran, colisionan con los mismos fragmentándose. Los iones formados pasan al Q3 para finalmente ser analizados. Así, mientras que la celda de colisión no se utiliza como filtro de masas, los cuadrupolos Q1 y Q3 si funcionan como tales y pueden trabajar en modo SIM o SCAN de forma independiente.

La combinación de Q1 y Q3 permite trabajar en cuatro modos diferentes: Multiple Reaction Monitoring (MRM), Neutral Lost Scan (NLS), Precursor Ion Scan (PIS), Product Ion Scan. El seleccionado para este estudio fue MRM, en el cual los dos cuadrupolos trabajan en modo SIM (se fijan las condiciones para que sólo pase un ión con una determinada m/z). Con este modo se detectan de forma específica cada uno de los compuestos que nos interesan eligiendo correctamente el ión en Q1 y en Q3.

Cuadro 9. Transiciones iónicas MS/MS -Parámetros espectrales fijados para el análisis de ATs en el espectrometro de masa

Analito	Ión precursor m/z	Ión product m/z	Q1 Pre Bias [V]	CE [V]	Q3 Pre Bias [V]	Tiempo de retención [min]
AOH	257.30	215.05	14	24	13	11.0
		212.10	14	29	15	
[² H ₄]-AOH	261.30	219.05	14	24	13	11.0
		216.10	14	29	15	
AME	271.30	256.20	20	23	25	18.0
		228.20	19	30	13	
[² H ₄]-AME	275.30	260.20	20	23	25	18.0
		232.20	19	30	13	
TEN	413.30	141.05	15.0	23.0	23.0	12.3
		271.30	15.0	17.0	17.0	
ATX I	351.20	297.20	25.0	28.0	19.0	9.4
		314.20	27.0	32.0	21.0	
		315.20	25.0	18.0	20.0	
ATX II	349.40	313.25	16.9	25.0	12.0	13.5
		331.30	20.0	15.0	20.0	
		285.30	16.0	36.0	18.0	
ALTP	349.30	261.25	18.0	28.0	15.0	9.35 and 9.95
		303.00	18.0	19.0	18.0	
		331.20	19.0	13.0	23.0	
		233.05	18.0	41.0	23.0	
		313.05	19.0	23.0	19.0	
TeA	196.30	285.0	19.0	28.0	17.0	8.3
		139.00	14	22	11	
[¹³ C ₆ , ¹⁵ N]-TeA	203.25	112.05	22	26	20	8.3
		142.00	14	22	11	
		113.05	22	26	20	

Los resultados proporcionados por el equipo LC-MS/MS fueron analizados en el ordenador mediante el software LabSolution de Shimadzu. Para analizar los resultados se consideró hacer las correcciones de las áreas de integración de los picos, se compararon los tiempos de retención de los picos, con los tiempos de retención de los estándares internos y de la calibración; se deben considerar la forma de los picos, que sean definidos (tener cuidado con el ruido), que el área de integración de los picos estuviese bien realizados (base a base) y que existiese coherencia o concordancia entre el ión precursor y los iones producto.

4.6. Calibración y Validación del método

Tanto el protocolo de preparación de muestra como el método LC-MS/MS empleado fueron validados por Gotthardt et al. (2019) siguiendo la metodología de Vogelgesang & Hädrich (1998).

Cuadro 10. Valores de LOD, LOQ y porcentajes de recuperación del método LC-MS/MS para AOH, AME y TeA

Análisis	LOD [μg/kg]	LOQ [μg/kg]	Recuperación [%]		
			spiking level 1	spiking level 2	spiking level 3
AOH	0.07	0.20	102 ± 8	103 ± 6	107 ± 2
AME	0.02	0.06	104 ± 6	108 ± 7	110 ± 3
TeA	0.45	1.4	114 ± 8	109 ± 2	104 ± 3

De acuerdo a la calibración realizada, el límite de detección LOD, el límite de cuantificación LOQ de este análisis de ATs, así como los porcentajes de recuperación se muestran en el Cuadro 10.

Para la determinación de los límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs) del AOH, AME y TeA se enriquecieron las matrices en blanco en cuatro niveles diferentes, respectivamente [AOH (0,15, 0,6, 1,0 y 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AME (0.015, 0.06, 0.1 y 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$), TeA (1.5, 6.0, 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$)], cada nivel fue preparado por triplicado y la preparación de la muestra se realizó como se describió anteriormente; las muestras fueron analizadas por LC-MS/MS. Para obtener un blanco de matriz de tomate, se utilizaron tomates frescos y sanos. Los tomates enteros se hicieron puré y se analizaron por LC-MS/MS para confirmar la ausencia de micotoxinas de *Alternaria*.

En cuanto a las recuperaciones para cada micotoxina se determinaron enriqueciendo el puré de tomate con: AOH (0.6, 1.0, y 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AME (0.06, 0.1 y 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y TeA (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Cada nivel fue preparado por triplicado. Las muestras fueron preparadas como se describió anteriormente y analizadas por LC-MS/MS. El contenido de toxinas en las muestras se calcularon utilizando SIDA y la recuperación se calculó para cada toxina de la siguiente manera:

$$R = \text{cantidad encontrada } [\mu\text{g} / \text{kg}] / \text{cantidad enriquecida } [\mu\text{g} / \text{kg}].$$

4.7. Incidencia natural de micotoxinas de *Alternaria* en tomates y pastas de tomate en Panamá

Con base en el análisis de los datos proporcionados por el equipo, se calcularon los niveles en $\mu\text{g/Kg}$ de las micotoxinas AME, AOH y TeA. De las diez muestras de tomate provenientes de las tres fincas bajo estudio, sólo en una de ellas (Finca 2, F2M3) se detectó la presencia del ácido tenuazónico; sin embargo, en todas las muestras de tomate se encontraron niveles detectables de las micotoxinas AOH y AME.

No se detectó presencia de otras micotoxinas de *Alternaria* en las muestras de tomate bajo estudio. En el Cuadro 11, se presentan los resultados del análisis cualitativo de las micotoxinas de *Alternaria* detectadas en las muestras estudiadas.

Cuadro 11. Presencia micotoxinas de *Alternaria* en muestras de tomate

Finca	Muestra	AOH	ALTP	ATX I	TEN	ATX II	AME	TeA
1	F1M1	+	LOQ	LOQ	-	-	+	-
	F1M2	+	-	LOD	-	-	+	-
	F1M3	+	-	-	-	-	+	-
Finca 2	F2M1	+	-	-	-	-	+	-
	F2M2	+	-	-	-	-	+	-
	F2M3	+	-	-	-	-	+	+
Finca 3	F3M1	+	-	-	-	-	+	-
	F3M2	+	-	-	-	-	+	-
	F3M3	+	-	-	-	-	+	-
Testigo	T1	+	-	-	-	-	+	-

El AOH, AME y TeA, fueron las toxinas de *Alternaria* predominantes en las pastas de tomate estudiadas; se encontró que el 100% (10/10) de las muestras de pastas de tomate,

presentaban niveles detectables de las micotoxinas AOH, TeA y AME. Tres de las replicas de la marca (PA) y las cinco replicas de la marca (PB) presentaron niveles de tentoxina (TEN) por debajo del límite de detección (LOD 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Al respecto, Delgado, Gómez-Cordovés, & Scott (1996) señalan que el TeA, es la principal toxina en tomates deteriorados, y que las otras micotoxinas de *Alternaria*, se producen en cantidades mucho más pequeñas (p. 109).

Cuadro 12. Presencia de micotoxinas de *Alternaria* en muestras de pasta de tomate

	Muestra	AOH	ALTP	ATX I	TEN	ATX II	AME	TeA
M A R C A 1	PA1	+	-	-	-	-	+	+
	PA2	+	-	-	LOD	-	+	+
	PA3	+	-	-	-	-	+	+
	PA4	+	-	-	LOD	-	+	+
	PA5	+	-	-	LOD	-	+	+
M A R C A 2	PB1	+	-	-	LOD	-	+	+
	PB2	+	-	-	LOD	-	+	+
	PB3	+	-	-	LOD	-	+	+
	PB4	+	-	-	LOD	-	+	+
	PB5	+	-	-	LOD	-	+	+

Los niveles de AOH encontrados en las muestras de tomate bajo estudio (Cuadro 13) oscilaron entre 0.58-5.33 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras que para AME fueron de 0.29-3.96 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y para el TeA la única muestra que presentó contaminación, tenía una concentración de 10.07 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Cabe señalar que la finca que presentó los niveles más altos de contaminación por micotoxinas fue la Finca 1.

Cuadro 13. Niveles en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de micotoxinas de *Alternaria* en muestras de tomate

Muestras	AOH [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	AME [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	TeA [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
F1M1	2.17	3.96	---
F1M2	5.33	1.96	---
F1M3	2.47	1.25	---
Media	3.32	2.39	
F2M1	1.23	0.60	---
F2M2	1.35	0.68	---
F2M3	0.83	0.47	10.07
Media	1.14	0.87	10.07
F3M1	2.57	1.83	---
F3M2	0.78	0.49	---
F3M3	0.58	0.29	---
Media	1.31	0.87	
T1	0.73	0.30	---

En cuanto a los niveles de micotoxinas encontrados en muestras de pastas de tomate, el Cuadro 14 muestra que para el AOH los valores oscilaron entre 1.77 - 8.12 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y para el AME en un rango de 0.74 - 7.03 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En términos de concentración, la micotoxina que se encontró en mayor concentración en las pastas de tomate fue el TeA cuyos niveles se encontraron en un rango de 29.19 a 37.99 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Los niveles más altos del AOH y TeA fueron encontrados en la marca PB, con un valor medio de 5.34 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 36.64 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente; mientras que los niveles medios de AME fueron similares en ambas marcas 3.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para la marca PA y 2.9 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para la marca PB.

Cuadro 14. Niveles en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de micotoxinas de *Alternaria* en muestras de pasta de tomate

Muestras	AOH [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	AME [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	TeA [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
PA1	8.12	7.03	33.18
PA2	1.77	0.78	29.46
PA3	4.85	2.23	29.19
PA4	4.15	1.83	31.66
PA5	5.55	3.19	31.57
Media	4.88	3.01	31.01
PB1	4.63	2.03	37.58
PB2	7.13	5.51	36.25
PB3	7.93	4.03	37.99
PB4	2.25	0.74	36.61
PB5	4.76	2.29	34.79
Media	5.34	2.92	36.44

Estos resultados coinciden con los reportados en Suiza por Noser et al. (2011), quienes evaluaron tomates y productos a base de tomate, encontrando que la micotoxina TeA se encontraba en mayor concentración (hasta $790 \mu\text{g}/\text{kg}$) en las muestras. Igualmente, los frutos de tomates fueron las únicas muestras donde no se detectó TeA. Por su parte, Stinson et al. (1981), reportaron también en su investigación con tomates, que las micotoxinas AOH, AME y ALT se encontraban en niveles mucho más bajos que el TeA ($13,9 \text{ mg}/\text{kg}$), o estaban ausente.

En América del Sur, Terminiello et al. (2006), encontró que 39/80 muestras de puré de tomate argentino contenían uno o dos de las micotoxinas TeA, AOH o AME, lo que sugiere una co-existencia frecuente de estas micotoxinas en muestras de esta naturaleza.

Al comparar los valores encontrados en esta investigación con los de otros estudios, podrían considerarse bajos; ya que en Alemania por ejemplo se han encontrado concentraciones de TeA de hasta 520 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y AOH en hasta 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en tomates y productos de tomate (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen and Umweltschutz 2005, 2006; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit LAVES 2007).

Al hacer una comparación en los niveles o contenidos de las micotoxinas AME y AOH en las muestras de tomate estudiadas, se puede observar en el gráfico de caja bigotes (Figura 6), que no hay diferencia significativa en los contenidos de AOH y AME entre la Finca 2, 3 y el testigo. La Finca 1 mostró diferencias significativas con respecto a las otras fincas para las dos micotoxinas contrastadas.

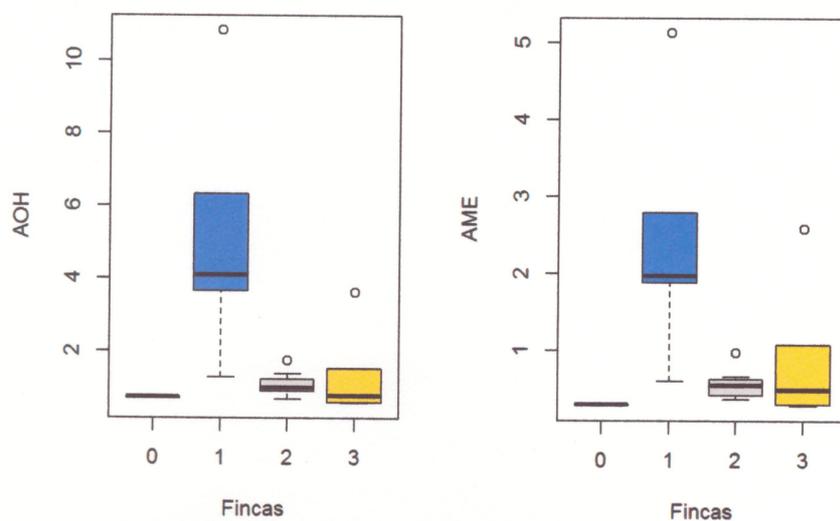


Fig. 6. Comparación de los niveles en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AOH y AME en fincas de tomate

Al realizar la prueba de normalidad Shapiro Wilk, para contrastar la H_0 que los datos seguían una distribución normal; se obtuvo un valor $p=0.0007032 < 0.05$; lo que nos indica que los valores no siguen una distribución normal.

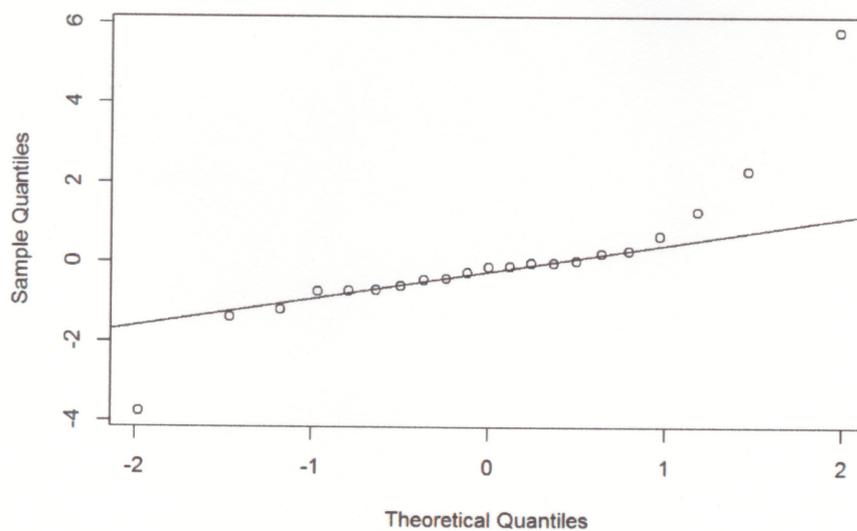


Fig. 7. Prueba de Normalidad para AOH en tomates

Por otro lado, al realizar la prueba de Levene, para homogeneidad de varianzas y contrastar la $H_0: \sigma^2_i = \sigma^2_j$; se obtuvo un valor ($Pr > F$) 0.1448 que muestra que existe homogeneidad entre las varianzas de las muestras de las Fincas 1, 2, 3 y testigo.

De igual manera, se realizó la prueba de normalidad para la micotoxina AME en muestras de tomate y dado que el valor $p < 0.05$ ($p = 0.0009237$) se rechaza la H_0 , por lo que los datos no siguen una distribución normal. Sin embargo, existe homogeneidad en las varianzas ($Pr = 0.2993 > F$).

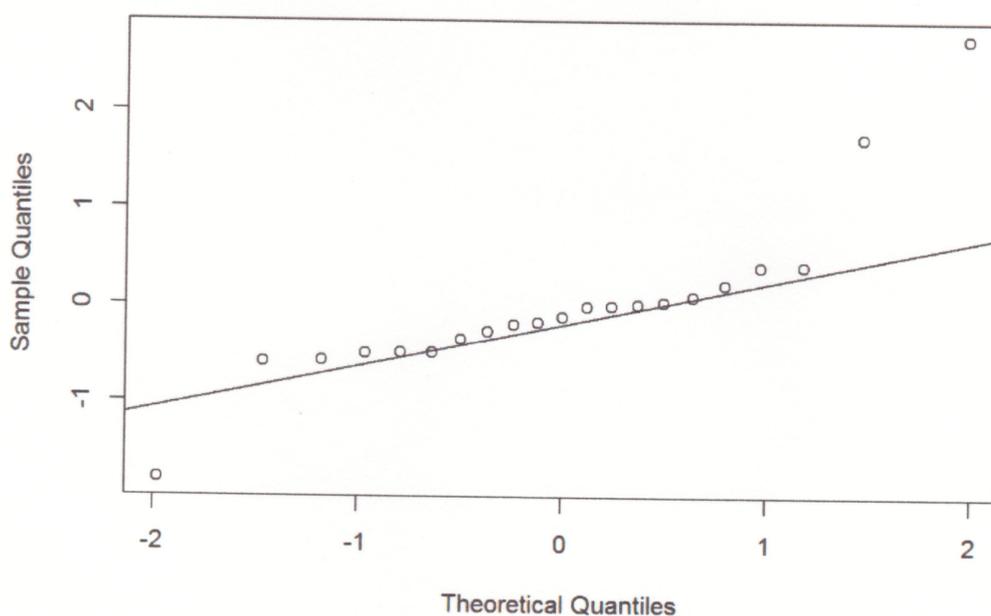


Fig. 8. Prueba de Normalidad para AME en tomates

Dado que los valores no cumplen con el requisito de normalidad de los datos, no es posible realizar la prueba de ANOVA; por lo que se hizo necesario realizar el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, para el establecimiento o no, de diferencias significativas en el contenido de AME y AOH entre las fincas. Al contrastar la hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_0$$

Para el caso de la micotoxina AOH se obtuvo un valor $\Pr(>F) < 0.05$ ($\Pr = 0.01142$); lo que indica que existen diferencias significativa en el contenido de AOH entre las tres fincas y el testigo.

El resultado obtenido de la prueba de Kruskal Wallis es producto de la mayor concentración de AOH encontrada en la Finca 1; lo cual fue comprobado mediante la prueba de Tuckey HSD que muestra que las concentraciones de AOH son estadísticamente similares para las fincas 2 y 3

Cuadro 15. Prueba Tukey para comparación de múltiples medias para AOH en muestras de tomate

Finca	Diff	lwr	upr	p adj
1-0	4.3183333	-0.07454915	8.7112158	0.0549223
2-0	0.3642857	-3.94943925	4.6780107	0.9949458
3-0	0.5800000	-3.81288248	4.9728825	0.9813705
2-1	-3.9540476	-6.94729248	-0.9608028	0.0077734
3-1	-3.7383333	-6.84457033	-0.6320963	0.0155738
3-2	0.2157143	-2.77753058	3.2089591	0.9968372

Para la micotoxina AME se obtuvo un valor $Pr=0.01716 < 0.05$, lo que demuestra que existen diferencias en el contenido de esta micotoxina entre las tres fincas y el testigo. La prueba de Tuckey HSD, muestra nuevamente las diferencias con respecto a la Finca 1.

Cuadro 16. Prueba de Tukey para comparación de múltiples medias para AME en muestras de tomate

Finca	Diff	lwr	upr	p adj
1-0	2.0916667	-0.140837	4.32417030	0.0706346
2-0	0.2700000	-1.922275	2.46227505	0.9847592
3-0	0.5716667	-1.660837	2.80417030	0.8845850
2-1	-1.8216667	-3.342861	-0.30047186	0.0161287
3-1	-1.5200000	-3.098618	0.05861846	0.0613496
3-2	0.3016667	-1.219528	1.82286148	0.9414641

Los datos de las pastas de tomate fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para las micotoxinas AOH, AME y TeA.

Para la micotoxina AOH según los resultados de la prueba de Shapiro Wilks ($p=6.71 \times 10^{-5} < 0.05$) los datos no siguen una distribución normal; mientras que de acuerdo con la prueba de Levene ($Pr=0.8738 > 0.05$) si cumplen con el criterio de homogeneidad de varianzas.

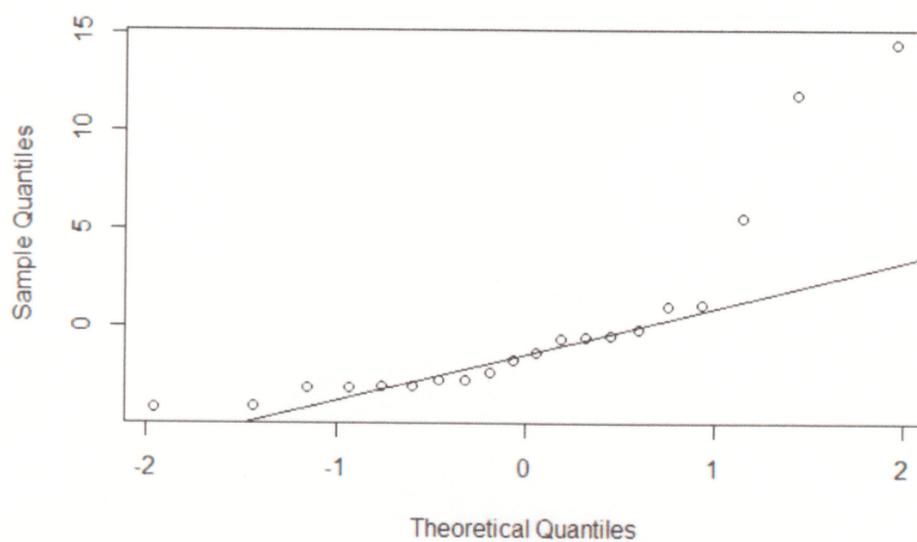


Fig. 9. Prueba de Normalidad para AOH en pastas de tomate

Para la micotoxina AME la prueba de Shapiro Wilks ($p=5.528e^{-5}<0.05$) muestra que los datos no siguen una distribución normal; pero si cumplen con la homogeneidad de varianzas de acuerdo con la prueba de Levene ($Pr=0.8775>0.05$).

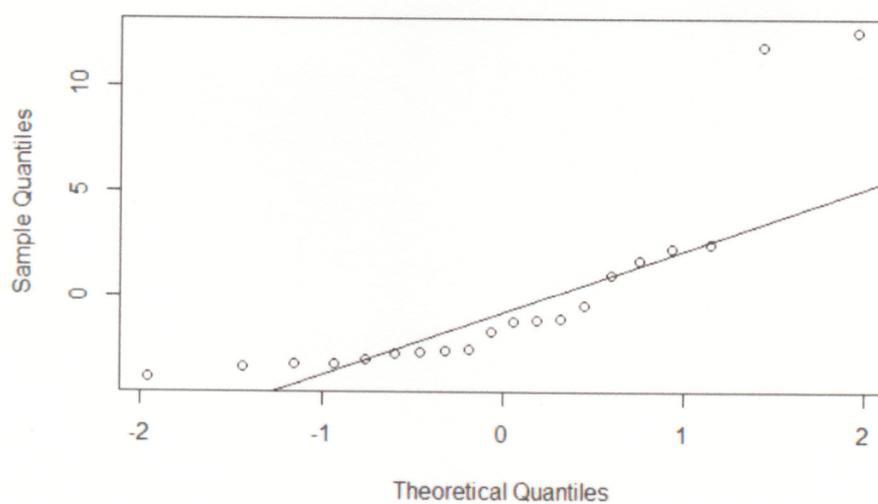


Fig. 10. Prueba de Normalidad para AME en pastas de tomate

Finalmente, para la micotoxina TeA, las pruebas Shapiro Wilks ($p=0.6416>0.05$) y Levene ($Pr=0.7681>0.05$), muestran respectivamente que los datos siguen una distribución normal y existe homogeneidad entre las varianzas de la muestras de las marcas A y B.

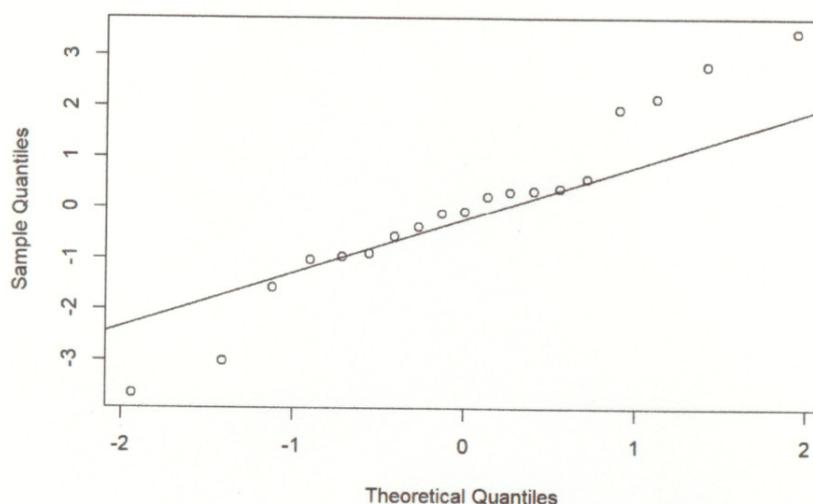


Fig. 11. Prueba de Normalidad para TeA en pastas de tomate

El análisis de Kruskal Wallis realizado a las muestras de pasta de tomate, demuestra que no existen diferencias significativa ($P>0.05$) en el contenido de las micotoxinas AOH ($p=0.3643$) y AME ($p=0.5967$) entre las marcas de pasta de tomate A y B. Sin embargo para el caso de la micotoxina TeA, si se encontró diferencias significativas en el contenido de ésta entre las marcas A y B de pasta de tomate, dado el valor $p=0.0001562<0.05$.

En los gráficos de cajas y bigotes podemos observar que existe una distribución similar en los contenidos de las micotoxinas AME y AOH entre ambas marcas de pastas de tomate; sin embargo para la micotoxinas TeA, la marca B presentan un mayor contenido.

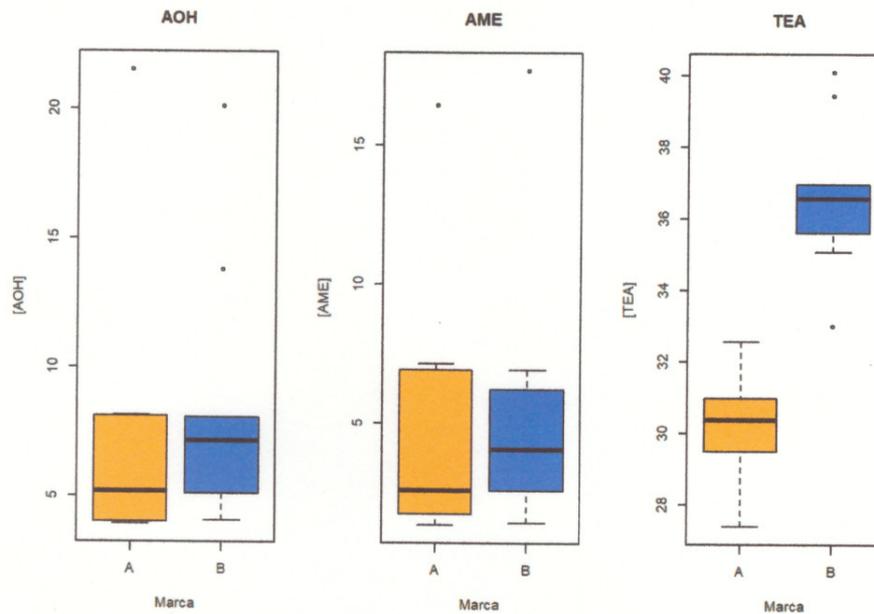


Fig. 12. Comparación de los niveles en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AOH, AME y TeA entre dos marcas de pasta de tomate

Con respecto a la coexistencia de las micotoxinas de *Alternaria* (AME; AOH y TeA) en las muestras analizadas; el AME y AOH aparecen simultáneamente en todas las muestras de tomate y pastas de tomate analizadas; las Fig. 13 y Fig. 14, muestran las correlaciones altamente significativa con respecto a la concentración entre ambas toxinas ($r=0.95$, $P<0.01$) en tomates y ($r=0.95$, $P<0.01$) en pastas de tomate.

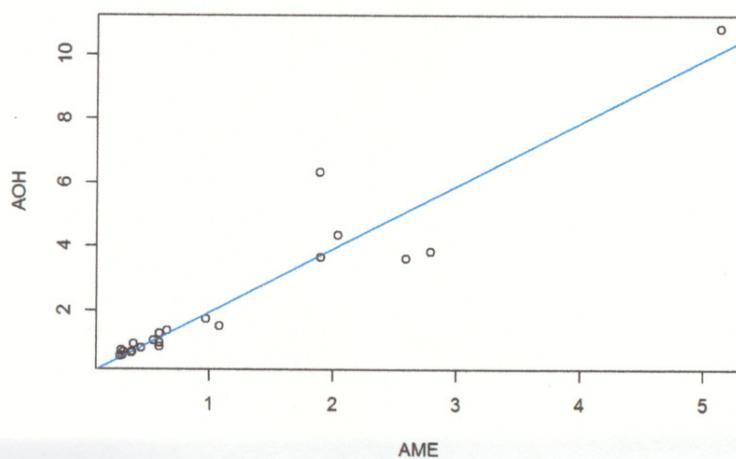


Fig. 13. Prueba de correlación entre las micotoxinas AOH y AME en tomates

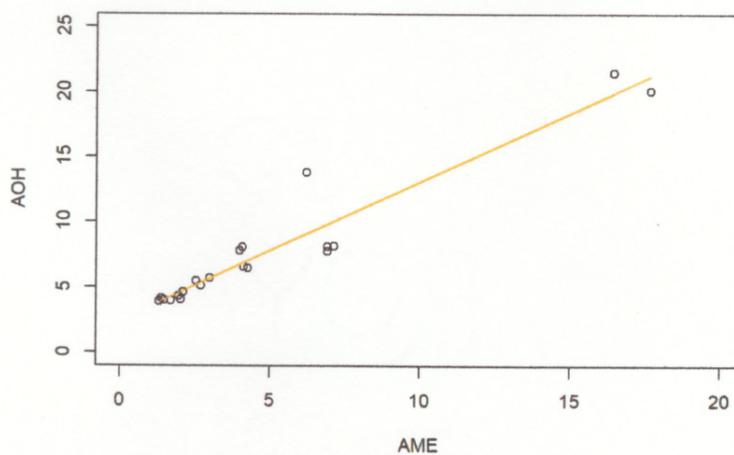


Fig. 14. Prueba de correlación entre las micotoxinas AOH y AME en pastas de tomate

La existencia simultanea de ATs en productos alimenticios ha sido reportada anteriormente por Zhao, Shao, Yang, Li, Zhu (2015b), quienes encontraron la producción de estas toxinas en granos de trigo en China, con una correlación también significativa. El AME y TeA, y el AOH y AME aparecieron juntos en el 97.2% y 91.2% de las muestras respectivamente; las regresiones lineales demostraron una relación significativas entre la

concentración de las toxinas AOH y AME ($r=0.877$); TeA y AME ($r=0.757$), TEN y TeA ($r=0.747$) todas a un nivel de significancia de $P < 0.01$.

Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio sobre la incidencia de toxinas de *Alternaria spp.*, en productos alimenticios en Panamá; por lo que los datos expuestos en esta investigación constituyen una primera aproximación en materia de micotoxinas emergentes en el país.

CONCLUSIONES

1. El método de Ensayo de Dilución de Isótopos estables SIDA, combinado con LC-MS/MS demostró ser un método sensible, selectivo y específico para detectar la presencia de micotoxinas de *Alternaria* en las dos matrices alimenticias empleadas.
2. La extracción en fase sólida SPE en combinación con la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem permitió la determinación de niveles trazas de micotoxinas con mayor sensibilidad.
3. La presencia de diversos tipos de micotoxinas de *Alternaria* en las muestras de pasta de tomate analizadas, indica que la contaminación por hongos del género *Alternaria spp.*, es latente por lo que se requiere profundizar en su monitoreo para asegurar una mayor inocuidad alimentaria.
4. Los resultados encontrados muestran que las micotoxinas provenientes de la contaminación por hongos de *Alternaria spp.*, en los tomates panameños, permanecen hasta en los productos industrializados.
5. Los niveles de Alternariol, Alternariol monometil éter y ácido tenuazónico encontrados en las muestras de tomate y pastas de tomate, pueden ser considerados bajos o moderados; si se les compara con valores reportados en otros estudios similares en Europa, Asia y Sur América.

6. Existe una prevalencia de las micotoxinas de *Alternaria*, AME, AOH y TeA en las muestras de pastas de tomate panameños, analizadas. Aún cuando estos niveles no representan un riesgo relevante para la salud de los consumidores, la presencia de estas micotoxinas en las muestras analizadas, sugiere la necesidad de una supervisión más amplia de los productos alimenticios presentes en el mercado.
7. En este estudio se encontró una alta correlación entre las micotoxinas AME y AOH, similar a las reportadas en otros estudios en tomates y productos a base de tomate.
8. El método aplicado dio lugar a bajos LODs, LOQs y buenos porcentajes de recuperación para todos los analitos, lo que confirma la precisión y robustez del método.

RECOMENDACIONES

1. Son necesarios más estudios sobre la existencia de micotoxinas de *Alternaria* en productos alimenticios de consumo habitual en el mercado nacional, tales como frutas, vegetales y cereales.
2. Se requiere profundizar en los métodos analíticos pero también en las implicaciones toxicológicas que pueden causar los niveles encontrados de esta micotoxina en la población.
3. Es necesario mejorar los programas de control de calidad en los alimentos e impulsar nuevos estudios de caracterización de las toxinas de *Alternaria*; así como establecer valores máximos permitidos para cada una de estas micotoxinas en los alimentos.
4. Se recomienda el desarrollo de investigaciones periódicas que permitan monitorear la presencia de micotoxinas a lo largo del tiempo.
5. Se recomienda la realización de esta investigación también durante la estación lluviosa cuando los valores de humedad varían, para establecer el efecto de las condiciones atmosféricas sobre la producción de micotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ An, Y.H., Zhao, T.Z., Miao, J., Liu, G.T., Zheng, Y.Z., Xu, Y.M., et al. (1989). Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *J Agric Food Chem* 37, 1341-1343.
- ❖ Asam, S., Konitzer, K., Schieberle, P. & Rychlik, M. (2009). Stable Isotope Dilution Assays of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5152–5160. DOI:10.1021/jf900450w
- ❖ Asam, A., Liu, Y., Konitzer, K. & Rychlik, M.(2011). Development of a Stable Isotope Dilution Assay for Tenuazonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2980–2987
- ❖ Asam, S., & Rychlik, M. (2015). *Anal Bioanal Chem* 407:7563–7577
- ❖ Azcarate, M., Patriarca, A., Terminiello, L., Pinto, V.F. (2008) *J Food Protect*® 71:1262–1265
- ❖ Berg, T. Development of the codex standard for contaminants and toxins in food. *En International Standards for Food Safety*; Rees, N.; Watson, D., Eds.; Aspen Publishers: Gaithersburg, MD, USA, 2000. CAC (Codex Alimentarius Commission). Procedural Manual, 11th ed.; Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO: Rome, Italy, 2000.
- ❖ Bottalico, A. & Logrieco, A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. *En: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Eds Sinha KK & Bhatnager D, Marcel Dekker, New York, 65-108.
- ❖ Berthiller, F., Burdaspal, P.A., Crews, C., Iha, M.H., Krska, R., Lattanzio, V.M.T., MacDonald, S., Malone, R.J., Maragos, C., Solfrizzo, M., Stroka, J. &

- Whitaker, T.B. (2014). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. *World Mycotoxin Journal*, 7 (1): 3-33
- ❖ Benavidez Rozo, M.E., Patriarca, A., Cabrera, G. & Fernández Pinto, V.E. (2014). Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate. *Rev Iberoam Micol.*;31(2):119–124
 - ❖ Brzonkalik, K., Herrling, T., Syldatk, C. & Neumann, A. (2011). Process development for the elucidation of mycotoxin formation in *Alternaria alternata*. *AMB Express* 2011, 1:27
 - ❖ Carrasco, L., Vazquez, D. (1973) *Biochem. Biophys. Acta -Nucleic Acids and Protein Synthesis* 319:209–215
 - ❖ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Lebensmittelüberwachung und Umweltschutz (2006) Jahresbericht 2006 Recuperado de: <http://www.cvua-sigmaringen.de/Daten/Jahresberichte/JB2006.pdf>
 - ❖ Da Motta, S. & Valente Soares, L.M. (2000). Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. *Food Chemistry* 71, 111-116.
 - ❖ Da Motta, S. & Soares, L.M. (2001). Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Additives and Contaminants*, 18, 630-634.
 - ❖ EFSA European Food Safety Authority. (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and

- food. Scientific Opinion. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA Journal 2011;9(10):2407
- ❖ Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M. L. & Tadeo, J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research* (2010) 1, 113–122.
 - ❖ Gleadle, A.E., Mortby, E.M., Hatch, A., Burt, R. (1998). Scientific Co-operation Task on Aflatoxins: the co-ordinators view. In *Mycotoxins and Phycotoxins: Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*; Miraglia, M., van Egmond, H., Brera, C.; Gilbert, J., Eds.; Alaken Inc.: Fort Collins, CO, USA,
 - ❖ Gotthardt, M., Asam, S., Gunkel, K., Moghaddam, A.F., Baumann, E., Kietz, R. & Rychlik, M. (2019) Quantitation of Six *Alternaria* Toxins in Infant Foods Applying Stable Isotope Labeled Standards. *Front. Microbiol.* 10:109. doi:10.3389/fmicb.2019.00109
 - ❖ Greco, M., Patriarca, A., Terminiello, L., Fernández Pinto, V. & Pose, G. (2012). Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries. *International Journal of Food Microbiology* 154 (2012) 187–191
 - ❖ Harvan, D. J. & Pero, R. W. (1976). The Structure and Toxicity of the *Alternaria* Metabolites. En *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*; Rodricks, J.; *Advances in Chemistry*; American Chemical Society: Washington, DC, 1976.
 - ❖ Harvan, D. & Pero, R. (1974) *J Chromatogr A* 101:222–224.
 - ❖ Hasan, H. (1995). *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit. Conditions and regulation of their production. *Mycopathologia*, 130, 171-177.

- ❖ Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. & Crews, C. (2008) Mycotoxin analysis: An update, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25:2, 152-163, DOI: 10.1080/02652030701765723
- ❖ Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010) *Appl Microbiol Biot* 86:1595–1612.
- ❖ Kuiper-Goodman, T. (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In *Mycotoxins in Food. Detection and Control*; Magan, N., Olsen, M., Eds.; CRC Press, Woodhead Publishin Limited: Abington Hall, Abington, MA, USA, 2004; pp. 3–31
- ❖ Lau, B. P. Y., Scott, P. M., Lewis, D. A., Kanhere, S. R., Cleroux, C., & Roscoe, V. A. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *Journal of Chromatography A*, 998, 119–131.
- ❖ Liu, Y. & Rychlik, M. (2015). Biosynthesis of seven carbon-13 labeled *Alternaria* toxins including altertoxins, alternariol, and alternariol methyl ether, and their application to a multiple stable isotope dilution assay. *Anal Bioanal Chem* (2015) 407:1357–1369. DOI 10.1007/s00216-014-8307-5
- ❖ Logrieco, A., Moretti, A. & Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129-140.
- ❖ López, P., Venema, D., de Rijk, T., de Kok, A., Scholten, J., Mol, H., & de Nijs, M. (2014). Occurrence of *Alternaria* mycotoxins in food products in the Netherlands. In: *World Mycotoxin Forum*, Vienna, Austria

- ❖ Lohrey, L., Marschik, S., Cramer, B., & Humpf, H.U. (2013). Large-Scale Synthesis of Isotopically Labeled $^{13}\text{C}_2$ -Tenuazonic Acid and Development of a Rapid HPLC-MS/MS Method for the Analysis of Tenuazonic Acid in Tomato and Pepper Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61, 114–120
- ❖ López, P., Venema, D., de Rijk, T., de Kok, A., Scholten, J.M., Mol, H.G., de Nijs, M. (2016) *Food Control* 60:196–204
- ❖ Man, Y., Liang, G., Li, A. & Pan, L. (2016). Analytical Methods for the Determination of Alternaria Mycotoxins. *Chromatographia* DOI 10.1007/s10337-016-3186-x
- ❖ Meena, M., Zehra, A., Dubey, M., Aamir, M., Gupta V., & Upadhyay, R. (2016). Comparative Evaluation of Biochemical Changes in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Infected by *Alternaria alternata* and Its Toxic Metabolites (TeA, AOH, and AME). *Frontiers in Plant Science* September 2016 | Volume 7 | Article 1408. doi: 10.3389/fpls.2016.01408
- ❖ Milićević, D., Škrinjar, M. & Baltić, T. (2010). Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins* 2010, 2, 572-592; doi:10.3390/toxins2040572
- ❖ Mislivec, P. B., Bruce, V. R., Stack, M. E., & Bandler, R. (1987). Molds and tenuazonic acid in fresh tomatoes used for catsup production. *Journal of Food Protection*, 50(1), 38-41.
- ❖ Müller, M. & Korn, U. (2013). *Alternaria* mycotoxins in wheat-A 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control* 34 (2013) 191e197

- ❖ Myresiotis, C.K., Testempasis, S., Vryzas, Z., Karaoglanidis, G.S., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015) *Food Chem* 182:81–88
- ❖ Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit LAVES (2007) *Verbraucherschutzbericht 2007* Recuperado de: http://www.laves.niedersachsen.de/live/live.php?&article_id=73746&navigation_id=20150&_psmand=23
- ❖ Noser, J., Schneider, P., Rother, M. & Schmutz, H. (2011). Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. *Mycotoxin Research* · November 2011. DOI 10.1007/s12550-011-0103-x
- ❖ Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, May 2008; 1(2): 175-188
- ❖ Ozcelik, S., Ozcelik, N., & Beuchat, L. (1990). Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Food Microbiology*, 11 (1990) 187-194.
- ❖ Patriarca, A., Vaamonde, G. & Pinto, V.F. (2014). *Alternaria*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00007-0>
- ❖ Pavón Moreno, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R. & García Lacarra, T. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutr Hosp.* 2012;27(6):1772-1781

- ❖ Pose, G., Oatriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V. (2009) Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *Int J Food Microbiol* 135(1):60–63
- ❖ Prella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. (2013). A new method for detection of five alternaria toxins in food matrices based on LC–APCI-MS. *Food Chemistry* 140 (2013) 161–167.
- ❖ Rasmussen, R.R., Storm, I.M.L.D., Rasmussen, P.H., Smedsgaard, J. and Nielsen, K.F., (2010). Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 765-776.
- ❖ Reinhold, L. & Bartels, I. (2010). LC-MS/MS Determination of *Alternaria* Toxins in Vegetables and Fruit Beverages. Application Note. ©Agilent Technologies Inc. LAVES, Lebensmittelinstitut Braunschweig, Germany.
- ❖ Robeson, D.J. & Jalal, M. (1991). Tenuazonic Acid Produced by an *Alternaria alternata* Isolate From *Beta vulgaris*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 44, 109-116 (1991)
- ❖ Rodríguez-Carrasco, Y., Mañes, J., Berrada, H. & Juan, C. (2016). Development and Validation of a LC-ESI-MS/MS Method for the Determination of *Alternaria* Toxins Alternariol, Alternariol Methyl-Ether and Tentoxin in Tomato and Tomato-Based Products. *Toxins* 2016, 8, 328; doi:10.3390/toxins8110328
- ❖ Rosett, T., Sankhala, R.H., Stickings, C.E., Taylor, M.E., Thomas, R. (1957) Studies in the biochemistry of micro-organisms. 103. Metabolites of *Alternaria tenuis* Auct; culture filtrate products. *Biochem. J.* 1957, 67, 390–400

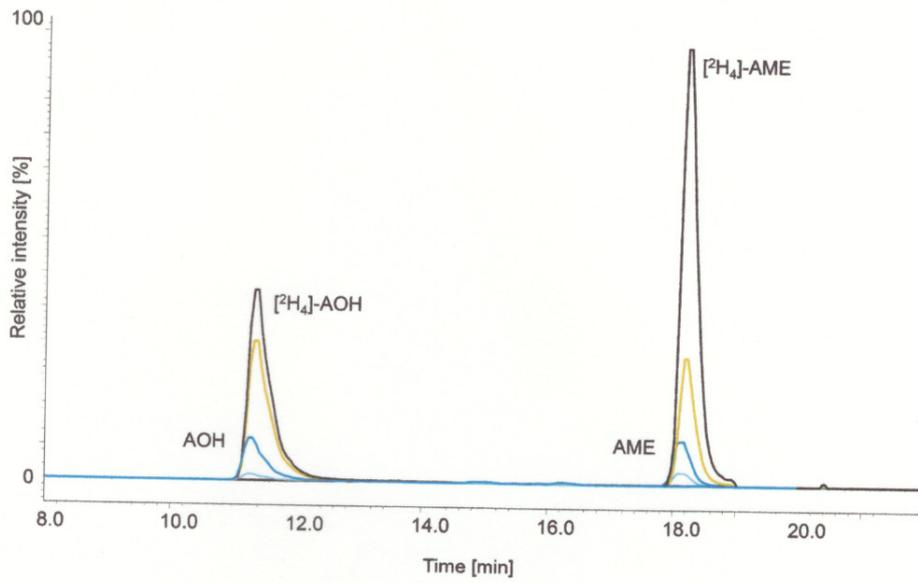
- ❖ Rychlik, M. (2012). Mycotoxins in foods. Chapter 13 In book: Chemical Contaminants and Residues in Food, pp.320-34. DOI: 10.1533/9780857095794.2.320
- ❖ Rychlik, M., Lepper, H., Weidner, C. & Asam, S. (2016). Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control* 68 (2016) 181-185.
- ❖ Rychlik, M., Asam, S. (2008) *Anal Bioanal Chem* 390:617–628
- ❖ Scott, P. 1991. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 28:819–827.
- ❖ Scott, P., Weber, D., Kanhere, S. (1997) *J Chromatogr A* 765:255–263
- ❖ Scott, P.M. & Kanhere, S.R. (1980). Liquid chromatographic determination of tenuazonic acids in tomato paste. *Journal of AOAC International*, 63, 3.
- ❖ Scott, P. M., & Kanhere, S. R. (2001). Chromatographic method for *Alternaria* toxins in apple juice. *Methods in Molecular Biology*, 157, 225–234.
- ❖ Sharma, A., Pillai, MRA., Gautam, & Hajare, SN. (2014). Immunological Techniques for Detection and Analysis. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00233-0>
- ❖ Shephard, G.S., Berthiller, F., Burdaspal, P., Crews, C., Jonker, M.A., Krska, R., MacDonald, S., Malone, B., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., van Egmond, H.P: & Whitaker, T.B. (2010). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotoxin Journal*, February 2011; 4 (1): 3-28
- ❖ Siegel, D., Merkel, S., Koch, M., Nehls, I. (2010) *Food Chem* 120:902–906

- ❖ Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C. & Visconti, A. (2004). Liquid Chromatographic Determination of Alternaria Toxins in Carrots. *Journal of AOAC International* Vol. 87,(1):101-106
- ❖ Stack, M.E., Mislivec, P.B., Roach, J.A.G. & Pohland, A.E. (1985). Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. *Journal of AOAC International*, 68, 640-642.
- ❖ Stack, M.E., Mislivec, P.B., Roach, J., Pohland, A.E. (1984) *J Assoc Off Anal Chem* 68:640–642
- ❖ Stinson, E.E., Osman, S.F., Heisler, E.G., Siciliano, J., Bills, D.D. (1981) Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *J Agric Food Chem* 29:790–792
- ❖ Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R. & Schatzmayr, G. (2013). Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. *Toxins* 2013, 5, 504-523; doi:10.3390/toxins5030504
- ❖ Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G. & Fernández Pinto, V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22(4), 236- 240.
- ❖ Tölgyesi, A., Stroka, J., Tamosiunas, V. & Zwickelc, T. (2015). Simultaneous analysis of Alternaria toxins and citrinin in tomato: an optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015 Vol. 32, No. 9, 1512–1522, <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1072644>

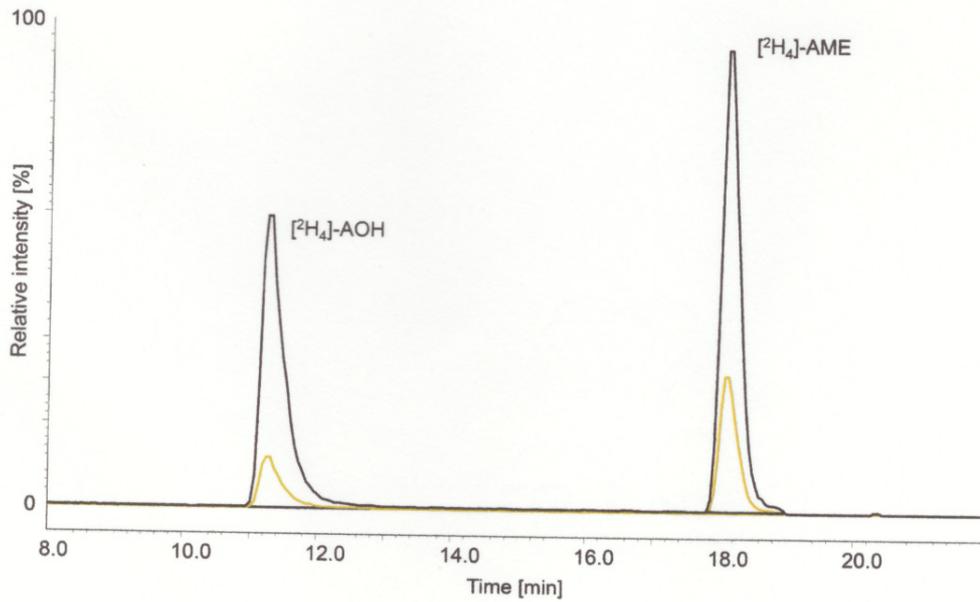
- ❖ Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., Rychlik, M., Devlieghere, F. & De Meulenaer, B. (2014). Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control* 37, 165-170
- ❖ Vinueza, C., Martín, R. & García, T. (2009). Comparación de dos métodos de extracción y detección cromatográfica de ácido tenuazónico a partir de muestras de tomate. *RCCV* 3 (2). 2009
- ❖ Vogelgesang, J., and Hädrich, J. (1998). Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. *Accredit Qual. Assur.* 3, 242–255. doi: 10.1007/s007690050234
- ❖ Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Devos, T., Njumbe Ediage, E., Di Mavungu, J.D., Jacxsens, L., Van Landschoot, A., Vanhaecke, L., De Saeger, S. (2016) *J Agric Food Chem* 64:5101–5109
- ❖ Yekeler, H., Bitmis, K., Ozcelik, N., Doymaz, M.Z., Calta, M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicol. Pathol.* 2001, 29, 492–497.
- ❖ Zhao, K., Shao, B., Yang, D. & Li, F. (2015a). Natural Occurrence of Four *Alternaria* Mycotoxins in Tomato- and Citrus-Based Foods in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (1), pp 343–348. DOI: 10.1021/jf5052738
- ❖ Zhao K, Shao B, Yang D, Li F, Zhu J (2015b) Natural Occurrence of *Alternaria* Toxins in Wheat- Based Products and Their Dietary Exposure in China. *PLoS ONE* 10(6): e0132019. DOI:10.1371/journal.pone.0132019

ANEXOS

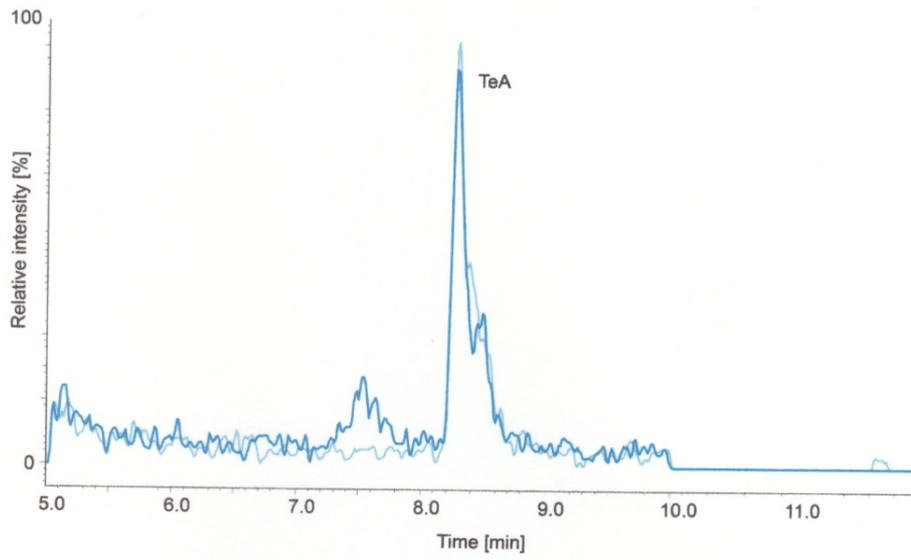
Cromatograma AOH y AME en muestra F1M1



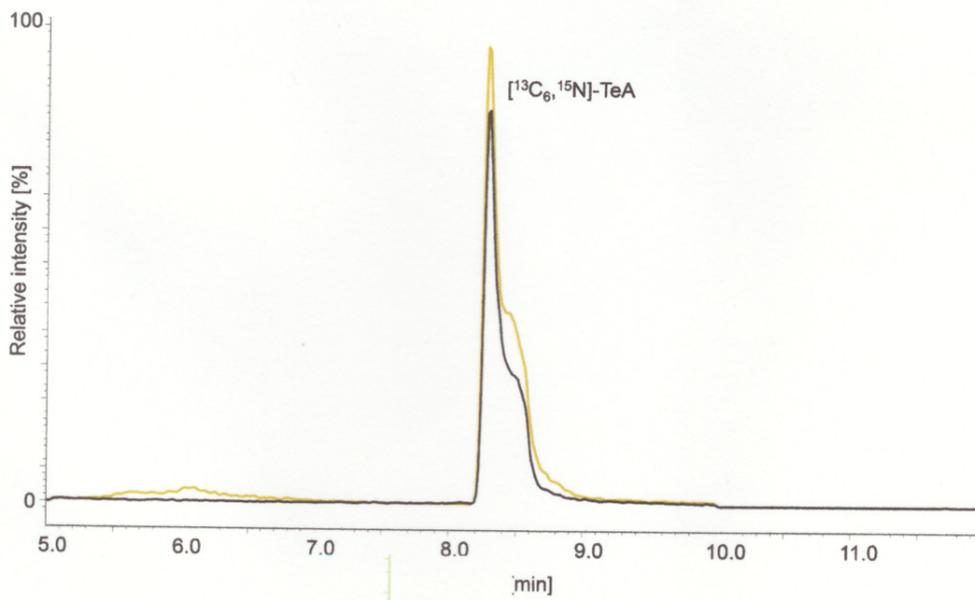
Cromatograma estándar interno de AOH y AME en solvente



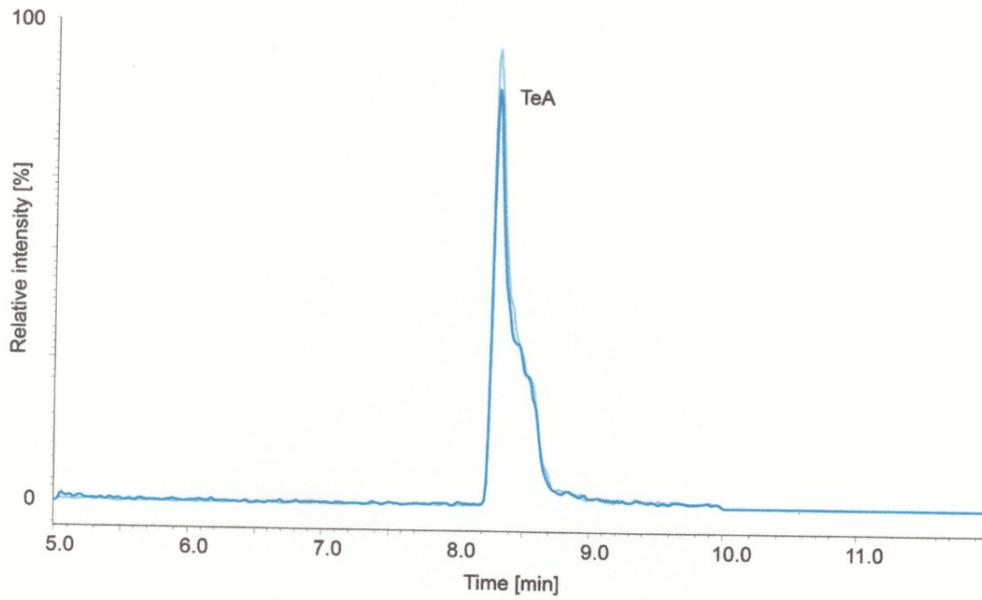
Cromatograma de TeA en muestra PA3



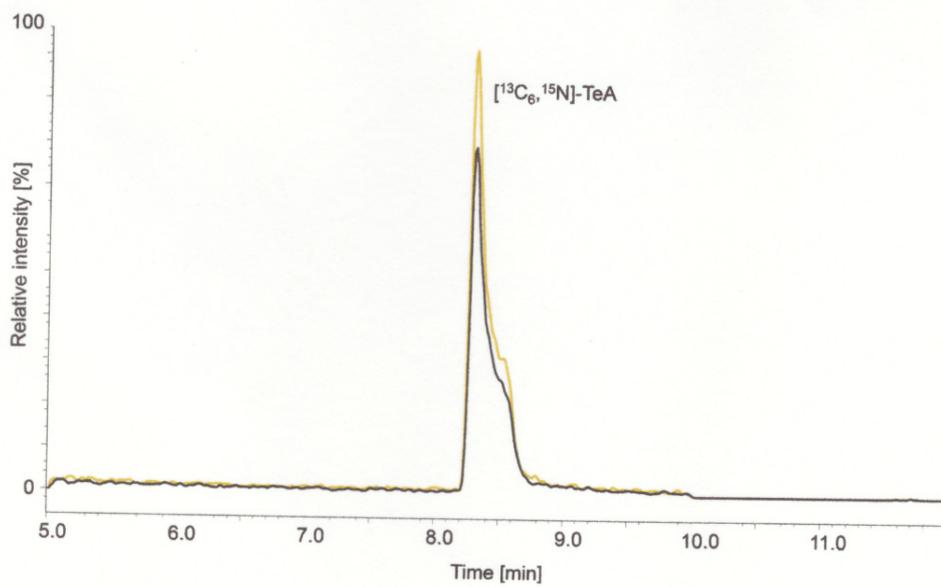
Cromatograma estándar interno TeA en muestra PA3



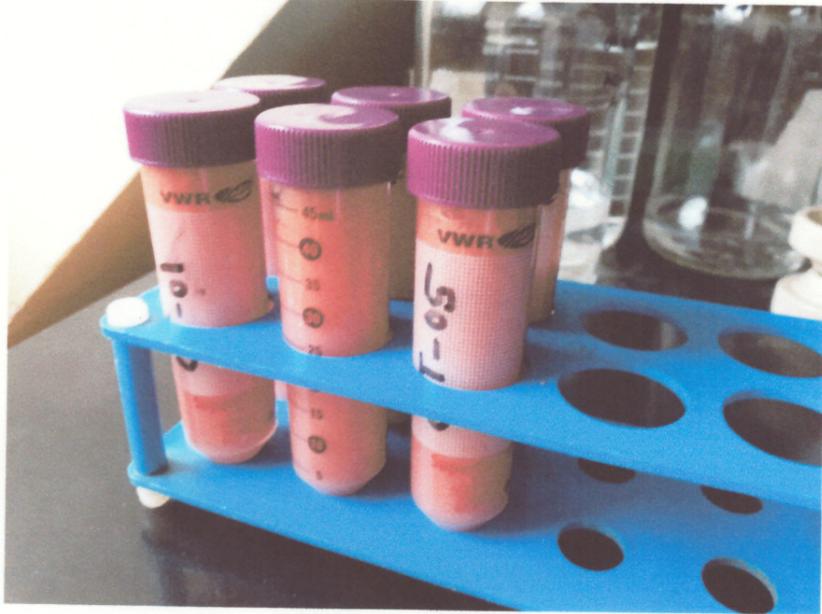
Cromatograma de TeA en solvente



Cromatograma de estándar interno de TeA en solvente



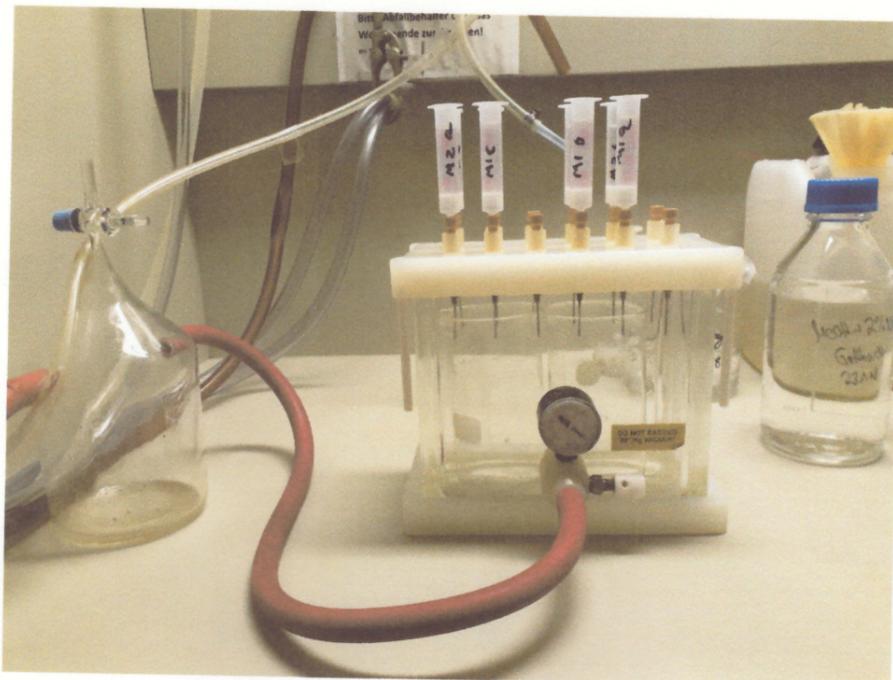
Muestras de tomate homogenizadas



Sonicación de muestras



Sistema de Extracción en Fase Sólida



Extractos de muestra purificados



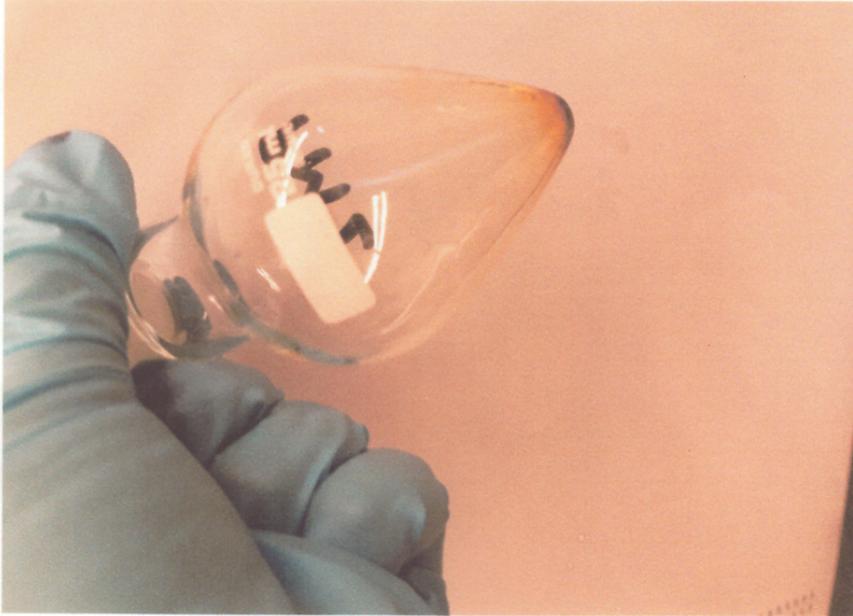
Centrifugación de muestras



Concentración de muestras en rotavapor



Residuo concentrado de la muestra



Equipo LC-MS-8050 Shimadzu Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

