

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDO TENUAZÓNICO A PARTIR DE MUESTRAS DE TOMATE

COMPARISON OF TWO METHODS FOR THE EXTRACTION AND CHROMATOGRAPHIC DETECTION OF TENUAZONIC ACID FROM TOMATO SAMPLES

Christian Vinueza, Rosario Martín, Teresa García.

Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria. Universidad
Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n. Ciudad Universitaria. 28040 -
MADRID

RESUMEN

Este trabajo evalúa dos métodos de detección cromatográfica y de extracción de ácido tenuazónico (AT) a partir de muestras de tomate. Para llevar a cabo la detección cromatográfica se comparó la utilización de una fase móvil binaria compuesta de acetonitrilo y tampón de fosfato 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 AT a partir de muestras de tomate se utilizó un método de extracción en fase sólida y otro basado en extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos. La extracción en fase sólida proporcionó un cromatograma libre de interferencias de la muestra en el tiempo de retención del AT con un límite de detección de 1 µg/g en muestras de tomate. Sin embargo 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.

Palabras clave: ácido tenuazónico, HPLC, tomate, extracción en fase sólida, extracción líquido-líquido.

ABSTRACT

This paper evaluates two methods of chromatographic detection and two methods of tenuazonic acid (TA) extraction from tomato paste. Chromatographic detection using a binary mobile phase consisting of acetonitrile and phosphate buffer, at pH 3, was compared to a

mobile phase consisting of a gradient of water and acetonitrile in presence of trifluoroacetic acid. The best chromatographic results were obtained with the mobile phase of acetonitrile and phosphate buffer, which showed a lower retention time (8.2 min) and greater sensitivity (quantification limit of 1.5 µg/ml). TA extraction and clean-up from tomato samples was performed using either a solid phase extraction method or a defating and partitioning extraction method with organic solvents. Regarding TA extraction and clean-up, a clearer chromatogram was obtained using the solid phase extraction method, with a detection limit of 1 µg/g in tomato samples. However, the defating and partitioning extraction method, besides being cumbersome, had a low performance because of the co-extraction of components from the samples that made it difficult the chromatographic interpretation.

INTRODUCCIÓN

El ácido tenuazónico (AT) es una micotoxina producida por hongos del género *Alternaria* y por diversas especies de los géneros *Phoma* y *Magnaporthe* (Lebrun *et al.*, 1990). Su presencia se ha detectado en varias regiones del mundo en cereales, frutas y verduras y sus efectos tóxicos se han comprobado tanto en animales de experimentación como en personas (King & Schade, 1983; Motta & Valente Soares, 2000; Azcarate *et al.*, 2008). En las aves domésticas una dosis de 10 mg/kg en el pienso disminuye tanto la eficiencia alimenticia como la ganancia de peso e incrementa las hemorragias internas en las canales (Ostry, 2008). En ratones causa hemorragias y muerte, mientras que en perros causa hemorragias en diversos órganos. En las personas se ha relacionado el AT con un síndrome hematológico conocido como Onyalay (Logrieco *et al.*, 2003; Ostry, 2008).

Para la extracción de AT y otras micotoxinas producidas por *Alternaria spp.* a partir de alimentos sólidos se utilizan disolventes orgánicos, preferiblemente acidificados, en métodos de extracción líquido-líquido, columnas de extracción en fase sólida o microextracción en fase sólida (Scott, 2001; Aresta *et al.*, 2003; Solfrizzo *et al.*, 2004).

La detección y cuantificación de AT en alimentos se realiza principalmente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección ultravioleta, pero también se han descrito otros métodos como cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) y cromatografía en fase gaseosa (GC) (Ostry, 2008).

El objetivo de este trabajo ha consistido en la evaluación de dos métodos de detección cromatográfica y dos métodos de extracción de AT a partir de muestras de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de AT mediante cromatografía líquida (HPLC)

Para llevar a cabo la separación cromatográfica del AT se utilizó un cromatógrafo Varian 920-LC equipado con una columna Phenomenex Ultremex 5 μ m C18 (250 x 4,6 mm) y un detector de array de diodos (279 nm). Para la puesta a punto de la separación cromatográfica se compararon dos métodos. El primero se llevó a cabo en modo gradiente, utilizando como fase móvil agua más ácido trifluoracético 0,1% (fase A) y acetonitrilo más ácido trifluoracético 0,1% (fase B). En la Tabla 1 se muestra el programa de gradiente utilizado para la elución.

Tabla 1 Programa de gradiente utilizado para la elución de AT.

Tiempo (minutos)	Fase A (%)*	Fase B (%)
0	95	5
25	53	47

*Fase A: agua con ácido trifluoracético 0.1%; ** Fase B: acetonitrilo más ácido trifluoracético 0,1%

En el segundo método se empleó una fase móvil binaria compuesta de acetonitrilo y tampón de fosfato (25 + 75, v/v) a pH 3 (Solfrizzo *et al.*, 2004). En ambos métodos se empleó un volumen de inyección de 50 μ l y un caudal de 1 ml/min.

Para determinar el tiempo de retención y el límite de detección del AT se emplearon como patrones la sal de cobre del AT (AT^{Cu}) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y AT sintético preparado por el Dr. Guillermo Orellana (Departamento de Química Orgánica, UCM). Para cuantificar el AT se utilizó el método de estándares externos integrando las áreas de los picos obtenidos en tiempos de retención acordes a los estándares correspondientes.

Estudio de recuperación de at a partir de muestras de tomate

Para la extracción del AT a partir de tomate se compararon las características de un método de extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos (Motta & Valente Soares, 2000) y un segundo método basado en la extracción en fase sólida con columnas poliméricas Oasis® HLB (Solfrizzo *et al.*, 2004).

La contaminación de las muestras se realizó con patrones de AT^{Cu} de 50, 100, 200, 300 y 1000 μ g/ml, que se prepararon disolviendo el AT^{Cu} en metanol. Los ensayos de recuperación se realizaron por triplicado sobre 20 g (método de extracción en fase sólida) o 25 g (extracción líquido-líquido) de pulpa de tomate obtenida asepticamente a partir de tomates

sanos. A cada muestra de 20 g de tomate se le adicionaron 200 μ l del patrón de 50, 100, 200 o 300 μ g/ml, con el fin de obtener concentraciones finales de 0,5, 1, 2 y 3 μ g de AT^{Cu} por gramo de tomate, respectivamente. Para la extracción líquido-líquido se adicionaron 200 μ l del patrón de 1000 μ g/ml a 25 g de pulpa de tomate para obtener una concentración final de AT^{Cu} en tomate de 8 μ g/g.

Tras la contaminación de las muestras con una solución de AT^{Cu} en metanol se mantuvieron durante 30 min a temperatura ambiente para permitir la evaporación del metanol, antes de proceder a la extracción. En todos los casos se analizaron como control muestras de pulpa de tomate sin contaminar simultáneamente con las muestras contaminadas

Método de extracción líquido-líquido.

Este método es una adaptación del descrito por Motta & Valente Soares (2000) para la detección del AT en productos de tomate.

En un matraz erlenmeyer se mezclaron 25 g de pulpa de tomate y 75 ml de metanol y se homogenizaron en un agitador orbital durante 10 minutos. La mezcla se filtró a través de un filtro Whatman N° 4 junto a 25 ml adicionales de metanol, con los que se recuperaron los restos de tomate del matraz. El extracto metanólico se transfirió a un embudo de decantación, se añadieron 20 ml de hexano, se agitó la mezcla suavemente durante 1 minuto y se dejó en reposo para permitir la separación de las fases. A continuación se descartó la fase de hexano. A la fase metanólica se añadieron 25 ml de agua a temperatura inferior a 8°C y se ajustó la solución a pH 2 con HCl concentrado. Posteriormente se realizaron dos extracciones con 20 ml de cloroformo agitando durante 2 minutos en cada ocasión. Todo el cloroformo se recogió en un embudo de decantación y se lavó con 15 ml de agua. El extracto de cloroformo se evaporó en un rotavapor a 35°C. El residuo se resuspendió en 2 ml de metanol y se filtró a través de una columna de sulfato anhidro de sodio. La muestra se conservó en un vial de vidrio ámbar a 4 °C hasta su análisis en HPLC.

Método de extracción en fase sólida.

Este método es una adaptación del descrito por Solfrizzo *et al.* (2004) para la extracción de AT a partir de zanahorias. Se añadieron 50 ml del solvente de extracción (acetonitrilo + metanol + agua destilada, 45+10+45 v/v/v, pH 3) a los 20 g de pulpa de tomate. La mezcla se ajustó a pH 3 con HCl 1 M, se agitó durante 30 min en un agitador orbital y se filtró por un filtro Whatman N° 4. A continuación se tomaron 2,5 ml del filtrado a los que se añadieron 5 ml de una solución 0,5 M de NaH₂PO₄·2H₂O, pH 3. Para la extracción en fase sólida se conectó una columna Oasis HLB (Waters. Massachusetts, Irlanda) a un colector de vacío y se acondicionó con 2 ml de acetonitrilo. Posteriormente se incorporaron los 7,5 ml de la solución

a la columna y se dejó fluir a una velocidad de 1-2 gotas/segundo, descartándose el eluato. Finalmente se añadió 1 ml de solvente de elución (acetonitrilo + metanol + fosfato sódico dihidrogenado 0,05M; 35+35+30, v/v/v) a un flujo de 1 gota/segundo. El volumen eluido se recogió en un vial de vidrio ámbar, se evaporó bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en 0,25 ml de metanol. Las muestras se guardaron en viales a 4 °C hasta su análisis en HPLC. Cada muestra se analizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cromatogramas obtenidos tanto con el método de elución en gradiente como con el que utiliza una fase móvil binaria de acetonitrilo y tampón de fosfato, demostraron la existencia de un pico específico para el AT^{Cu} mientras que el AT sintético presentó dos. El análisis de los espectros de absorción de los picos obtenidos mostró que tanto el pico único del AT^{Cu} como los dos picos del compuesto sintético eran idénticos (Figura 1). La presencia de dos picos en el compuesto sintético se interpreta como la presencia de dos isómeros (L y D) con una relación entre sus concentraciones que corresponde a un 60% del isómero que eluye en primer lugar y un 40% del segundo. Teniendo en cuenta que el AT^{Cu} eluye exactamente con el mismo tiempo de retención del segundo pico, se empleó la sal de cobre para los ensayos de recuperación a partir de muestras de tomate.

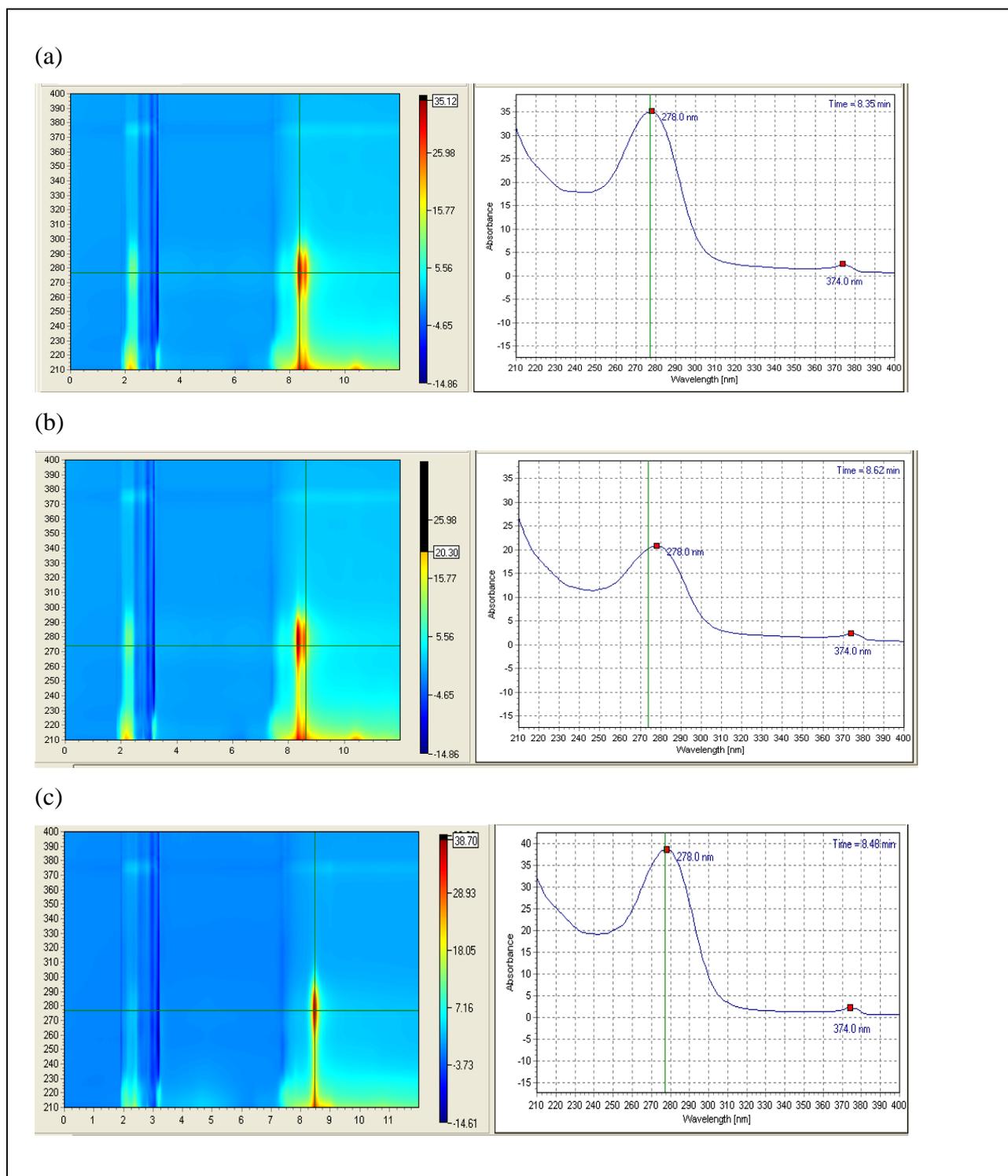


Figura 1. Espectro de absorción UV (210-400 nm) de los picos cromatográficos correspondientes al AT obtenidos con una fase móvil de acetonitrilo y tampón fosfato, pH 3: (a) Espectrograma del primer pico del AT sintético (b) Espectrograma del segundo pico del AT sintético (c) Espectrograma del pico de AT^{Cu} .

El tiempo de retención del AT^{Cu} con la fase móvil binaria de acetonitrilo y tampón de fosfato fue de aproximadamente 8,2 minutos (Figura 2) mientras que utilizando el método en gradiente de agua y acetonitrilo en presencia de ácido trifluoracético fue de 23 minutos

(Figura 3). Además, el análisis de las áreas de los picos del cromatograma obtenido con el método en gradiente proporcionó menor sensibilidad en la detección ($2,5 \mu\text{g/ml}$). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se eligió el método de separación cromatográfica sin gradiente, basado en el trabajo publicado por Solfrizzo *et al.* (2004), para ensayos posteriores de sensibilidad y recuperación de AT a partir de tomate. La recta de calibración obtenida a partir de patrones de $1,5, 2,5, 5$ y $10 \mu\text{g/ml}$ de AT^{Cu} mostró un coeficiente de correlación de $r=0.9999$ para el intervalo analizado, con un límite de cuantificación de $1,5 \mu\text{g/ml}$ de AT^{Cu} (Figura 4).

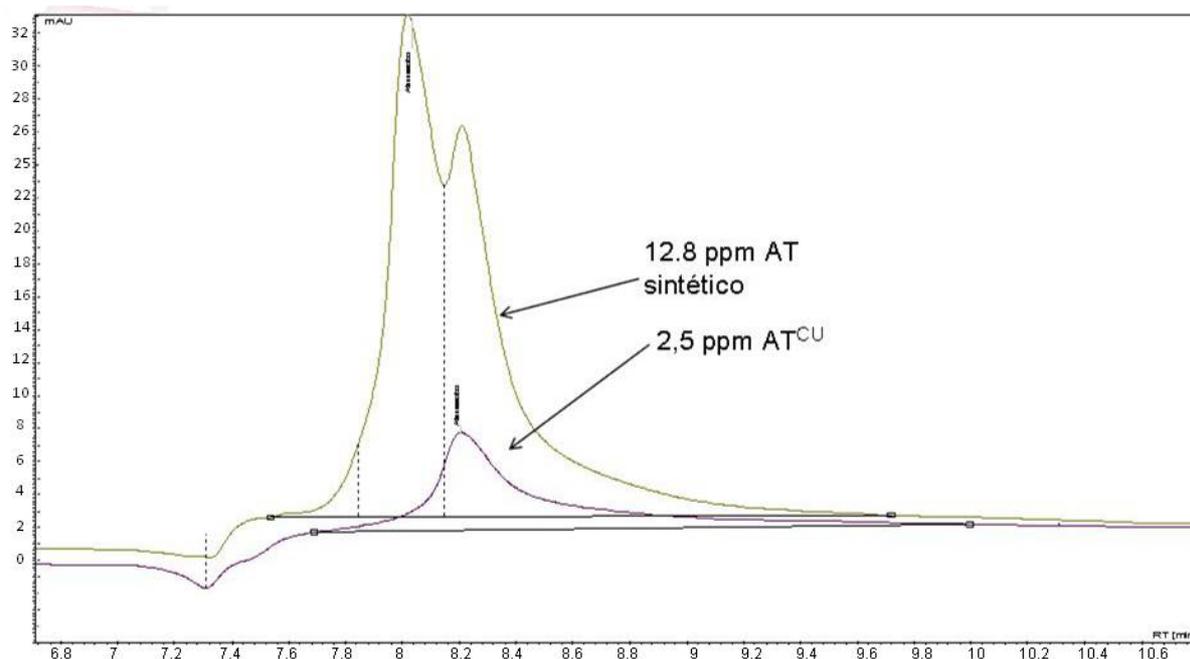


Figura 2. Cromatogramas de los patrones de AT sintético y AT^{Cu} utilizando una fase móvil binaria de acetonitrilo y tampón de fosfato, pH 3.

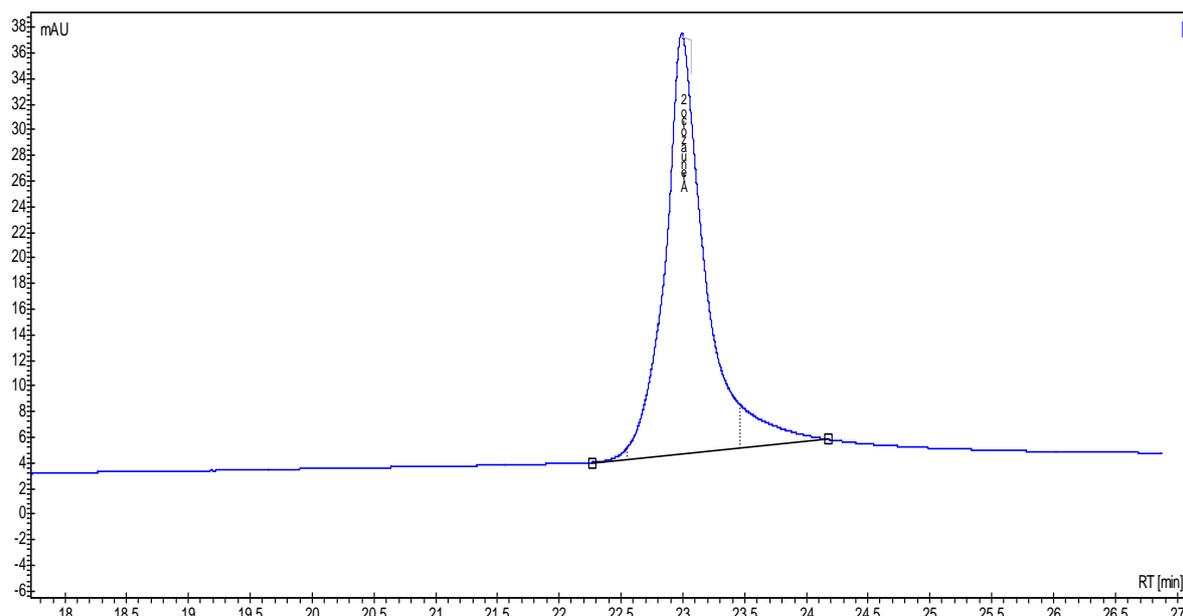


Figura 3. Cromatograma de un patrón de 10 $\mu\text{g/ml}$ de AT^{Cu} obtenido mediante elución con un gradiente de agua y acetonitrilo en presencia de 0,1% de ácido trifluoroacético.

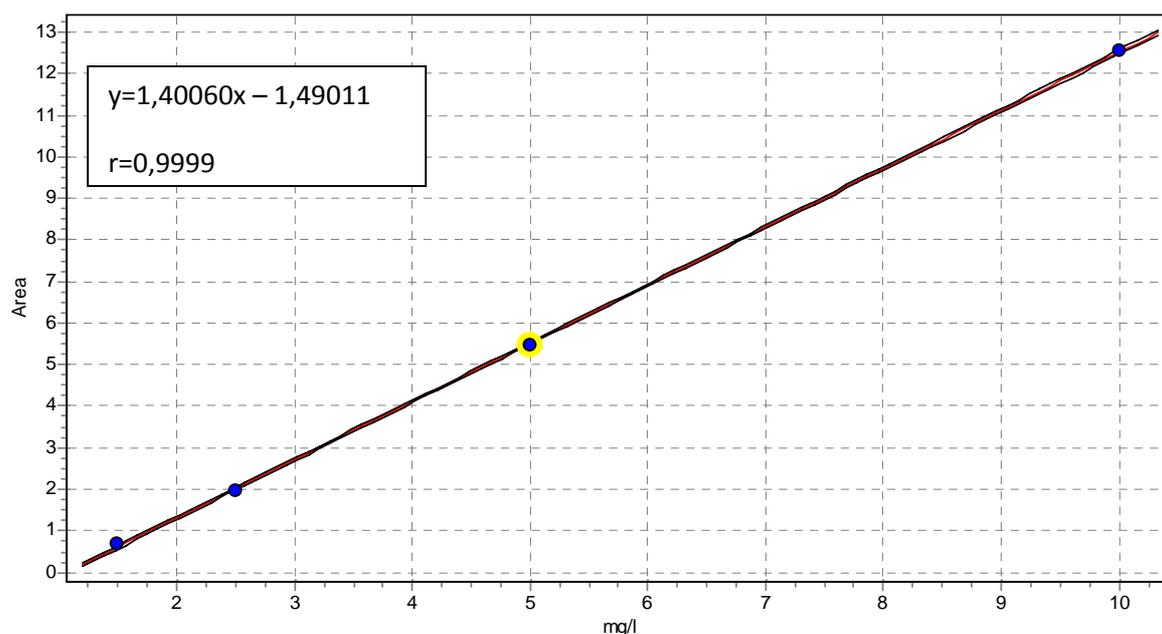


Figura 4. Recta de calibración obtenida en la técnica de HPLC utilizando patrones de 1,5, 2,5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ AT^{Cu} y una fase móvil binaria de acetonitrilo y tampón fosfato, pH 3.

Con relación a los métodos evaluados para la extracción de AT a partir de muestras de tomate, conviene señalar que en los cromatogramas correspondientes al método de extracción líquido-líquido descrito por Motta y Valente Soares (2000) se observaron una gran cantidad de interferencias que no permitieron distinguir el pico de AT^{Cu} en las muestras contaminadas con 200 μl de una solución de 1000 ppm de AT^{Cu} , equivalente a 8 $\mu\text{g/g}$ de AT^{Cu} en pulpa de

tomate (Figura 5), por lo que este método no se consideró adecuado para la realización de análisis posteriores.

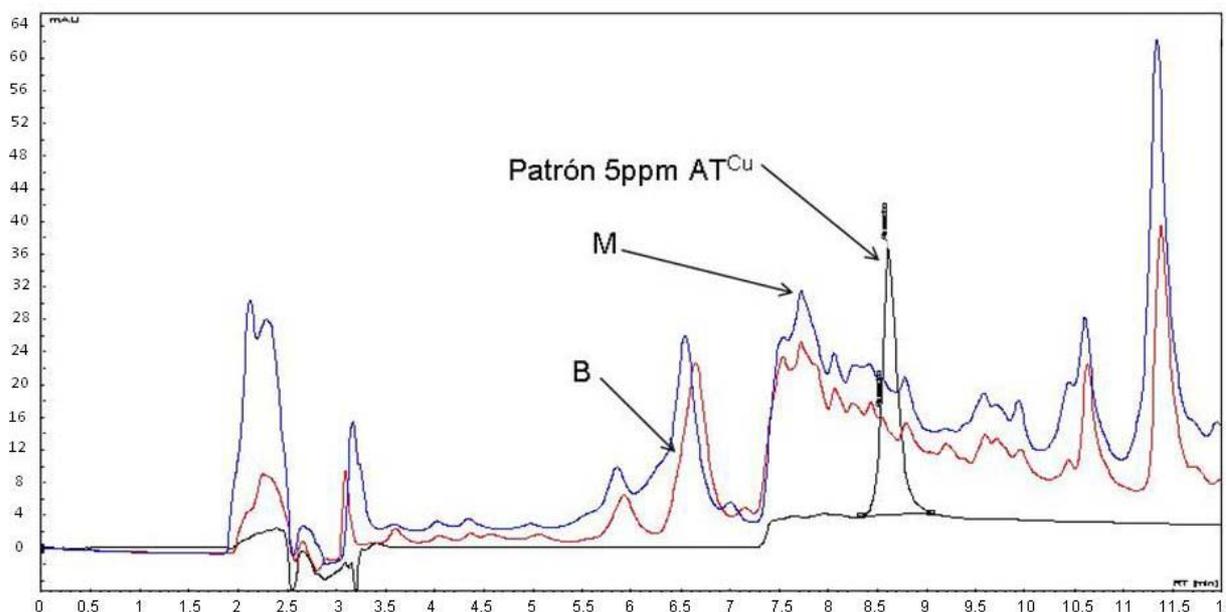


Figura 5. Cromatograma obtenido con el método de extracción líquido-líquido a partir de una muestra de tomate sin contaminar (B) y contaminado con 8 µg/ml de AT^{Cu} (M).

El método de extracción en fase sólida proporcionó cromatogramas limpios, en los que se pudieron identificar claramente los picos correspondientes al AT (Figura 6), por lo que se escogió este método para evaluar la recuperación de AT^{Cu} en pulpa de tomate. Los índices de recuperación obtenidos con este método fueron superiores al 72 % en muestras contaminadas con 2 y 3 µg de AT^{Cu} por gramo de tomate y del 59 % en las que contenían 1 µg/g, pero no fue posible detectar la micotoxina en las muestras contaminadas con 0,5 µg/g (Tabla 2).

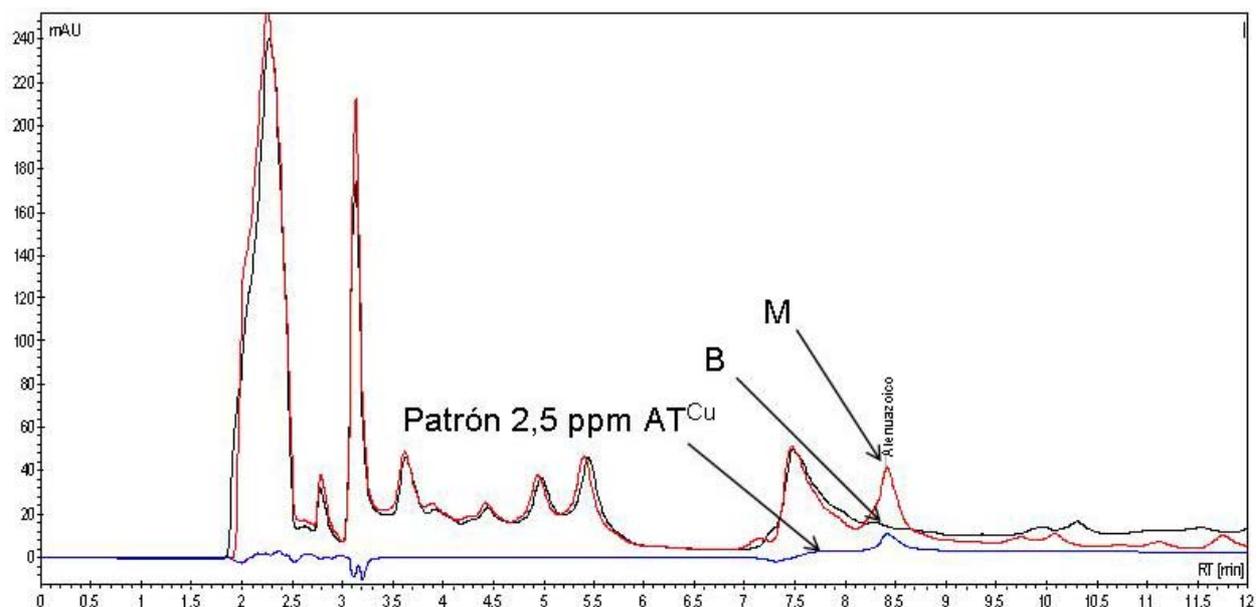


Figura 6. Cromatograma obtenido con el método de extracción en fase sólida a partir de una muestra de tomate sin contaminar (B) y contaminada con 3 $\mu\text{g/ml}$ de AT^{Cu} (M).

Tabla 2. Índice de recuperación de AT^{Cu} obtenido a partir de muestras de pulpa de tomate utilizando el método de extracción en fase sólida y una fase móvil binaria de acetonitrilo y tampón fosfato, pH 3.

Concentración de AT^{Cu} ($\mu\text{g/g}$)	Recuperación Media (%)	D.E	Réplicas
0,5	0	0	3
1	59,25	19,95	3
2	83,00	9,87	3
3	72,65	2,26	3

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha puesto a punto un método analítico para la detección de AT en muestras de tomate. Tras comparar y adaptar dos métodos previamente descritos en la bibliografía, se comprobó que la metodología que proporcionó mejores resultados fue la utilización de un método de extracción en fase sólida, seguido de la detección por HPLC utilizando una fase móvil binaria de acetonitrilo y tampón fosfato a pH 3 (Solfrizzo et al., 2004).

Conviene señalar que tanto la detección y cuantificación como la extracción de AT a partir de tomate han resultado más eficaces modificando un método que parte de una matriz de zanahoria (Solfrizzo et al., 2004) que el descrito por otros investigadores (Motta & Valente Soares, 2000) para muestras de tomate.

Una de las modificaciones realizadas al método de Solfrizzo et al. (2004) es la concentración de la muestra, evaporándola y resuspendiéndola en 0,25 ml de metanol. Este procedimiento ha permitido identificar y cuantificar cantidades más bajas de AT^{Cu} . La extracción de AT en un

medio ácido ha proporcionado resultados satisfactorios y concuerda con los resultados expuestos por varios investigadores (Scott, 2001; Ostry, 2008).

Los resultados obtenidos constituyen una plataforma previa para la identificación de AT en productos derivados de tomate.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL2006-07659) y por la Dirección General de Universidades de la Comunidad de Madrid (programa de vigilancia sanitaria S-0505/AGR/000265). Los autores agradecen al Dr. Guillermo Orellana (Dep. Química Orgánica, Universidad Complutense de Madrid) la síntesis del AT empleado en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Aresta, A., Cioffi, N., Palmisano, F. & Zambonin, C. G. 2003. Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic, and tenuazonic acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5232-5237.

Azcarate, M. P., Patriarca, A., Terminiello, L. & Fernandez, P., 2008. Alternaria toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *J. Food Prot.* **71**: 1262-1265.

King, D.A. & Schade, J. E. 1983. Alternaria toxins and their importance in food. *J. Food Prot.* **47**: 886-901.

Lebrun, M. H., Dutfoy, F., Gaudemer, F., Kunesch, G. & Gaudemer, A. 1990. Detection and quantification of the fungal phytotoxin tenuazonic acid produced by *Pyricularia oryzae*. *Phytochemistry* **29**: 3777-3783.

Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A. & Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 645-667.

Motta, S. & Valente Soares, L. M. 2000. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. *Food Chem.* **71**: 111-116.

Ostry, V. 2008. Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* **1**: 175-188.

Scott, P. M. 2001b. Analysis of agricultural commodities and foods for Alternaria mycotoxins. *J. AOAC Int* **84**: 1809-1817.

Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A. & Van den, B. R. 2004. Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *J. AOAC Int* **87**: 101-106.