

## Red de Seguridad Alimentaria

### *“Calidad higiénica de conservas de tomate. El caso de los mohos filamentosos”*

#### Grupo de trabajo ad hoc



**Junio 2017**



**Participantes** (por orden alfabético):

**Arévalo, Laura Viviana.** Lic. en Bromatología (UNCuyo); Profesora Titular de Tecnología de Productos Deshidratados, Tecnología de carnes y Directora de tesis de investigación de alumnos y Miembro del Consejo Directivo de la Facultad de Don Bosco de Enología y Ciencias de la Alimentación (UCCuyo).

**Astoreca, Andrea.** Dra. en Ciencias Biológicas, Investigadora Adjunta, CONICET, Miembro del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI, La Plata). Jefa de Trabajos Prácticos de la cátedra de Higiene y Salud Pública de la Facultad de Ciencias Exactas perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Área de especialización: Micología y micotoxicología.

**Bianchinotti, María Virginia (Coordinador).** Dra. en Biología, Investigador Independiente, CONICET. Micóloga, especialista en micromicetes filamentosos. Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS). CONICET- CCT-Bahía Blanca. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur.

**Chulze, Sofía Noemí.** Dra. en Ciencias Biológicas (UNRC), Investigadora Superior, CONICET. Profesor Titular de la orientación Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Especialista en micología de los alimentos y micotoxicología.

**da Cruz Cabral, Lucía.** Lic. en Ciencia y Tecnología de Alimentos (UBA). Tesista doctoral y Jefe de Trabajos Prácticos del Dto. de Química Orgánica, Área Química y Microbiología de Alimentos, FCEN, UBA. Miembro del Instituto de Micología y Botánica (INMIBO-CONICET, UBA). Especialista en micología de alimentos y micotoxinas.

**Della Mónica, Ivana Florencia.** Dra. en Cs. Biológicas (FCEN, UBA), Becaria Postdoctoral, CONICET. Integrante del Instituto de Micología y Botánica (INMIBO-CONICET, UBA). Especialista en microbiología (hongos y actinobacterias) aplicada al mejoramiento de la producción vegetal frente a condiciones de estrés biótico y abiótico.

**Frisón, Laura Noemí .** Mag. en ciencia y Tecnol. de Alimentos (Dpto de Ing. en Alim., FIQ,UNL). Profesora Adjunta Exclusiva A. Integrante de la Unidad Ejecutora Microbiología de Alimentos (CETRI-UNL). Especialista en el control del desarrollo, caracterización e identificación de hongos, evaluación de la carga fúngica ambiental y su eliminación mediante diferentes técnicas de sanitización.

**López, Abel.** Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA). Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFYN). Universidad Nacional de Córdoba.



**Olivero, Laura Maria.** Lic. Cs. Biológicas. Miembro del Instituto de Micología y Botánica (INMIBO-CONICET, UBA). Especialista en filogenia de hongos Epichloë, endófitos de gramíneas.

**Olmedo, Mariana Cecilia** . Ing. En Alimentos (INTI-Agroalimentos). Miembro de la Coordinación de Microbiología y Biología Molecular de INTI-Agroalimentos. Especialista en Calidad Industrial de Alimentos.

**Oteiza, Juan Martín (Coordinador).** Dr. en Cs. Exactas (UNLP), Investigador Adjunto, CONICET. Miembro del grupo de trabajo de Microbiología de IFU. Especialista en Microbiología y Tecnología de los Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI AC-Neuquén).

**Patriarca, Andrea (Coordinador).** Dra. en Cs. Químicas (UBA), Investigadora Adjunta, CONICET. Profesora Adjunta del Dto. de Química Orgánica, Área Química y Microbiología de Alimentos, FCEN, UBA. Miembro del Instituto de Micología y Botánica (INMIBO-CONICET, UBA). Especialista en micología de alimentos y micotoxinas.

**Pavicich, María Agustina.** Lic. en Ciencia y Tecnología de Alimentos (UBA). Tesista doctoral y Ayudante de 1º del Dto. de Química Orgánica, Área Química y Microbiología de Alimentos, FCEN, UBA. Miembro del Instituto de Micología y Botánica (INMIBO-CONICET, UBA). Especialista en micología de alimentos y micotoxinas.

**Pesquero, Natalia Victoria.** Especialista en Bromatología e Industrialización de Alimentos (UBA), Ing. en Alimentos, Tesista de la Maestría en Bromatología e Industrialización de Alimentos (UBA). Investigadora del Instituto de Tecnología de alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, INTA, Castelar.

**Portnoy, Julia Inés.** Licenciada en Ciencias Biológicas (UBA). Especialización en microscopía de alimentos y contaminantes en FDA (Atlanta - USA). Laboratorio de Microscopía de Alimentos, Departamento de Control y Desarrollo (INAL - ANMAT)

**Ramirez, María Laura:** Dra. en Ciencias Biológicas (UNRC), Investigadora Independiente, CONICET. Docente de Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Especialista en micología de los alimentos y micotoxicología.

**Rodriguez, Laura:** Ingeniería en Alimentos, Candidata a Mg. en Tecnologías Ambientales. Docente en Ingeniería de Bioprocesos e Ingeniería de las Reacciones Bioquímicas, Departamento de Ingeniería Química, y Docente Investigador en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan. Especialidad Tecnologías de Fermentación en estado sólido para valorización de residuos agroindustriales.



## **ÍNDICE**

	<b>Página</b>
<b>1- Planteamiento de la problemática</b>	<b>5</b>
<b>2- Conclusiones</b>	<b>12</b>
<b>3- Propuesta del grupo ad hoc de la RSA</b>	<b>14</b>
<b>4- Referencias</b>	<b>14</b>

## **1) Planteamiento de la problemática**

De acuerdo al Art. 982 del Código Alimentario Argentino con la denominación genérica de conserva de tomates, se entienden los productos elaborados con los frutos maduros, sanos y limpios, libres de pedicelo, semillas y cálices del *Lycopersicum esculentum* P. Miller (= *Solanum lycopersicum*), de variedades rojas o rojizas.

Los productos a base de tomate (incluyendo las conservas) son ampliamente consumidos en Argentina, siendo este uno de los vegetales con mayores volúmenes de industrialización en nuestro país (Terminiello y col., 2006). Estos frutos son susceptibles a contaminaciones fúngicas debido a su elevado contenido de humedad, calidad nutricional y a su delgada piel. Los causantes de lesiones más frecuentes son *Alternaria* (causante de la pudrición negra), *Botrytis* (pudrición por moho gris), *Geotrichum* spp. (pudrición ácida) y *Rhizopus* spp. (pudrición algodonosa). Asimismo, en menor proporción, se suele observar la presencia de especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Phytophthora*. En Argentina, la podredumbre algodonosa y la podredumbre negra ocasionan el 70% de las pérdidas de origen sanitario registradas en el Mercado Central de Buenos Aires (Pose, 2007).

Actualmente, para evaluar la calidad de las conservas de tomates (pero sobre todo para determinar la calidad de la materia prima utilizada), el Código Alimentario Argentino (CAA) establece como metodología oficial el método de recuento de hifas en cámara de Howard-Stephenson. Esta metodología desarrollada por B.J Howard en 1911, requiere del uso de un portaobjetos especial (cámara) y de una grilla o cuadrícula que se coloca en el ocular del microscopio. El método se basa en la observación directa y recuento de hifas, realizando el conteo contra la cuadrícula. El resultado de dicha metodología, se encuentra íntimamente relacionado tanto con el estado sanitario de la materia prima (en lo que a contaminación fúngica se refiere) como de las condiciones de almacenamiento e instalaciones de procesamiento.

Para los diferentes tipos de conservas mencionados en el CAA, los valores de recuento de mohos aceptados son:

### **1) Conserva de tomates pelados y con proceso de cubeteado (Art 943 tris):**

No podrá contener más de 50 % de campos positivos de filamentos de mohos, cuyo recuento se realizará sobre la fracción escurrida.

### **2) Tomates con piel en conserva (Art 944):**

No podrá contener más de 50 % de campos positivos de filamentos de mohos, cuyo recuento se



realizará sobre el jugo o porción líquida.

3) Concentrados de tomate (Art 946):

No podrá contener más de 60% campos positivos de filamentos de mohos, cuyo recuento se realizará en la dilución en agua que corresponda para que la muestra tenga una concentración de 8,37 a 9,37 gramos por ciento de residuo sólido.

4) Pulpa de tomate (Art 947):

No podrá contener más de 50 campos positivos de filamentos de mohos.

5) Tomate triturado (Art 948):

No podrá contener más de 50 campos positivos de filamentos de mohos, cuyo recuento se realizará sobre el líquido tal como se extrae del envase, o bien diluido a la concentración de 8,37 a 9,37 gramos por ciento de residuo sólido.

Las normas del Codex para los productos concentrados de tomate (STAN 57-1981) y tomates en conserva (STAN 13-1981), mencionan a la metodología AOAC 965.41 como referencia para la determinación de filamentos de mohos en estos productos.

Recientemente, el grupo de trabajo *ad hoc* realizó una encuesta tendiente a obtener información vinculada con las ventajas y desventajas del empleo del recuento de mohos por el método de Howard. De la misma participaron empresas, cámaras y entidades de Salud Pública provinciales.

A continuación, se presentan tanto los resultados de las encuestas realizadas como información obtenida de la bibliografía respecto de este tema:

**Ventajas**

- Método económico y relativamente sencillo de llevar a cabo.
- Se emplea como indicador de calidad tanto a nivel de recepción de la materia prima, en pasta de tomate, puré y pulpa de tomate, tomate pelado entero y cubos de tomate.
- A grandes rasgos, cuando un producto en base a tomates parte de una materia prima de buena calidad, los resultados así lo demuestran, siendo significativamente diferente en el caso de materia prima de mala calidad o con adulterantes.
- Reconocido tanto en legislaciones como en normas de identidad y directivas en diversos países, (Argentina, Brasil, Chile, Venezuela, Malasia, Estados Unidos, Canadá, Unión Europea, entre otros).
- Comercialmente aceptado en especificaciones técnico-comerciales de productos a base de



tomate (purés, pastas y concentrados) en diversos países (Argentina, Chile, Malasia, China, Estados Unidos, entre otros) muchos de ellos importadores de productos argentinos.

### **Desventajas**

- Alta dependencia y subjetividad por parte del operador.
- Baja reproducibilidad y precisión.
- Necesidad de contar con Cámara de Howard de diámetro establecido con su respectivo cubreobjetos con 25 campos calibrados a 1,382 mm.
- Necesidad de contar con microscopio con uno de los oculares con disco micrométrico, marcado con 36 cuadrados, para evaluar en el recuento exactamente las hifas que superen 1/6 del campo o la sumatoria de las 3 más grandes que superen 1/6).
- Variabilidad según la fuente de luz utilizada en el microscopio.
- Volumen de carga en la cámara subjetivo.
- Entrenamiento especial de los operadores.
- Mayor probabilidad de errores de conteo debidos a fatiga visual del operador.
- Imposibilidad de realizar varios análisis al mismo tiempo.
- Se deben realizar diluciones y 3 recuentos por cada muestra (mayor tiempo de análisis).
- No tiene en cuenta la industrialización que ha sufrido el tomate ni el efecto de las operaciones industriales de transformación de los productos, tales como la molienda, homogeneización y centrifugación. En estos casos, las hifas no están en su forma normal, sino que sufren un proceso físico de ruptura que incrementa el recuento de mohos en el producto dificultando su cumplimiento por parte del CAA (Estudios realizados por INTI BA y MDZA).
- La muestra debe ser homogénea y deberá estar bien distribuida sobre la cámara.
- Estudios interlaboratorios no comparables (en una misma muestra los resultados son completamente dispares).
- Carencia de patrones para realizar calibraciones y controles externos de calidad.
- Diferencias en las tolerancias a nivel mundial.

Cabe destacar que casi la totalidad de los encuestados coincidieron en que la metodología de Howard resulta obsoleta y debería ser reemplazada.

Por otra parte, también se observó una gran coincidencia respecto de que en el CAA no existe ninguna relación entre los valores de tolerancias según la concentración del producto ya que por ejemplo, en un tomate pelado (con una concentración mínima) permite valores del 50% mientras que en puré (a una concentración de 8,37 de extracto seco) permite valores del 60 %.

Asimismo también el 100% de los encuestados coinciden en que desconocen la existencia de alguna metodología para su reemplazo.



Según el Consejo Mundial del Tomate Procesado (WPTC), organización internacional sin fines de lucro que representa a la industria procesadora del tomate, la referencia al método de Howard en los criterios de calidad debería ser eliminada, siendo el método inexacto, anticuado y extremadamente subjetivo.

Debido a la serie de desventajas que presenta el método de recuento de filamentos de mohos por el método de Howard, se ha incrementado la importancia de la búsqueda de la estimación de la contaminación fúngica por métodos alternativos.

Algunos metabolitos y constituyentes naturales como la quitina y el ergosterol, que son producidos por mohos y levaduras, se han utilizado como candidatos potenciales para el desarrollo de métodos rápidos de detección de mohos.

A continuación se describen algunos de los métodos alternativos, mencionados en la bibliografía disponible, destinados a determinar la calidad de las conservas a base de tomate.

### **Quitina**

Es un carbohidrato que forma parte de las paredes celulares de los hongos la cual está formada por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas entre sí con enlaces  $\beta$ -1,4. Su análisis, o el de algunos de los productos de su hidrólisis han sido propuestos como indicadores de la contaminación fúngica en reemplazo del método de Howard por varios autores (Ride y col., 1972 y Ekblad y cols, 1998). Si bien su detección es rápida, los estudios realizados demostraron baja sensibilidad y reproducibilidad junto con una baja especificidad, por ello el método ha sido desestimado.

### **Tinciones con fluorocromos**

Estas metodologías han sido exploradas para estimar biomasa en muestras ambientales. Son técnicas relativamente sencillas. Su mayor dificultad consiste en la disponibilidad y costo del equipamiento e insumos (microscopio de fluorescencia, fluorocromos).

### **Lectinas**

El uso de lectinas fluorescentes (las cuales reaccionan específicamente con la quitina de los mohos) fue empleada por Potts y cols. (2000) para analizar la presencia de mohos asociados con el deterioro de tomates (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum* y *Stemphylium botryosum*) en comparación con el recuento de mohos por Howard, obteniendo valores de correlación entre ambas metodologías de 0.76. Por otra parte, dicha metodología fue empleada para evaluar la calidad de jugos de tomate sin pasteurizar (Potts y cols., 2001). Según el autor, el empleo de lectinas podría ser una alternativa para la detección de mohos en tomate.

### **Espectroscopía por infrarrojo cercano (NIR)**

Siguiendo con la búsqueda de metodologías alternativas al recuento de mohos según Howard, varios autores han propuesto a la espectroscopía por infrarrojo cercano (NIR) como alternativa para investigar la contaminación fúngica en alimentos. Singh y cols (2007) la han empleado para determinar la presencia de mohos en maíz mientras que Kiskó y cols. (2011) para estimar biomasa fúngica en puré de tomate. Esta metodología presenta la dificultad de que requiere de equipamiento costoso para su implementación.

### **Ergosterol**

Es el principal esteroles presente en la membrana celular de los hongos. Los animales poseen predominantemente colesterol, mientras que las células vegetales poseen otros esteroides, y el ergosterol está ausente o su contenido es mínimo; por ello el ergosterol es considerado un carácter de origen evolutivo que define a los hongos. Es un precursor biológico de la vitamina D<sub>2</sub>, por ello también es comúnmente conocido como ergosterina o provitamina D<sub>2</sub>.

En bacterias el contenido de esteroides es a nivel de trazas (ca. 0.01% de su peso seco corresponde a esteroides totales, mientras que un porcentaje aún menor a ergosterol).

Para el caso de levaduras, la producción de ergosterol se encuentra descrita para *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei* y *Debaryomyces hansenii*.

La cuantificación de ergosterol ha sido utilizada por varios autores como indicador de contaminación por hongos en productos a base de tomate, jugo de manzana, granos, higos secos y puré de uvas (Porep y cols., 2014).

A nivel mundial, varios países han optado por utilizar métodos basados en la estimación de ergosterol para determinar la calidad sanitaria de los productos a base del tomate. Italia por ejemplo, hace varios años emplea dicho parámetro como indicador de calidad del producto; algo similar ocurre en Turquía desde el año 2006.

Distintas metodologías han sido propuestas para la determinación de ergosterol en productos a base de tomate. El método propuesto por Kadakal (2012) se basa en el método propuesto por Ghiretti y cols. (1995) que emplea la cromatografía como método de detección.

En el 2014, la Asociación Internacional de Jugos de Frutas y Vegetales (IFU), publicó el método de análisis N°81 (Determination of Ergosterol by HPLC; adjunto en anexo al documento) basado en la metodología empleada originalmente en Italia. Actualmente dicho método es utilizado en diversos países de Europa como método de referencia para evaluar la calidad de las conservas a base de tomate (en reemplazo del método propuesto por Howard), logrando unificar un criterio de análisis para este metabolito.



Respecto a los límites de aceptación de ergosterol en conservas a base de tomate, la Asociación Europea de Jugos de Fruta (AIJN) fijó como valor provisional (por dos años y sujeto a revisión) 0.76mg/l. Tanto la metodología como el límite máximo, son considerados de referencia por varias industrias elaboradoras de productos a base de tomate en Europa.

Cabe destacar que ciertos países han adoptado otros criterios respecto del valor propuesto por la AIJN, siendo Turquía un ejemplo de esto al fijar valores máximos de 15 mg/l para el contenido de ergosterol en pasta de tomate (Kadakal y cols., 2004).

Diversos autores han evaluado la posible correlación entre el recuento en placa de mohos (UFC) y la cuantificación de ergosterol.

Estudios realizados por Tothill y cols. (1992) obtuvieron una buena correlación entre ambos métodos en semillas de trigo en condiciones de  $a_w$  de 0.95 pero no de 0.85. Similares resultados fueron obtenidos por Castro y cols. (2002) para el caso de maíz (con valores de  $a_w$  de 0.85 y 0.92). Por otro lado, Schnürer y Jonsson (1982) obtuvieron valores de correlación ( $r$ ) entre el contenido de ergosterol y el recuento de mohos (UFC) del orden de 0.77 en recuentos realizados en agar DG18 y de 0.69 en recuentos realizados en agar extracto de malta (MEA), poniendo de manifiesto la dependencia del medio de cultivo en el cual se realiza el recuento de mohos. Asimismo, Battilani y cols. (1996) obtuvieron una correlación baja entre el contenido de ergosterol total y el recuento por Howard.

Por otra parte, Kadakal y cols. (2004) observaron una buena correlación lineal entre el grado de pudrición del tomate y el recuento de mohos por Howard así como con el contenido de ergosterol (con valores de  $r$  cercanos a 0.96).

Otros autores sugieren incluso que el contenido de ergosterol podría ser un buen índice para predecir el contenido de aflatoxinas en maíz (Castro y cols., 2002).

#### **Ventajas:**

- Resultados confiables (debido a que su doble enlace en los carbonos 5-6 y 7-8 causa una fuerte absorción a la luz ultravioleta a 240 y 300 nm, mientras que los esteroides de las plantas absorben débilmente a longitudes de onda superiores a 240 nm).
- Baja subjetividad.
- Alta repetibilidad.
- Posibilidad de analizar varias muestras al mismo tiempo.

#### **Desventajas:**

- Procedimiento más largo y costoso que el recuento de mohos por Howard.

- Necesidad de contar con un HPLC.
- Contenido influenciado por la especie fúngica, la edad del moho, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y el método de análisis.
- Comercialmente aún no reconocido.

### **Micotoxinas**

Algunos de los géneros fúngicos mencionados anteriormente como alteradores de los tomates (*Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*) son capaces de producir metabolitos tóxicos para el consumo humano, las micotoxinas. Para evitar la presencia de estos compuestos en productos procesados, es importante partir de materia prima de buena calidad. Si bien un recuento elevado de mohos no puede relacionarse directamente a la presencia de micotoxinas, el uso de materia prima contaminada está asociado a un riesgo toxicológico en el producto final. Diversos estudios han demostrado que un paso clave para evitar la acumulación de toxinas fúngicas en alimentos derivados de vegetales es la utilización de materias primas de buena calidad (Drusch y Ragab, 2003).

La mayoría de las toxinas fúngicas reportadas en productos de tomate son producidas por el género *Alternaria*, siendo las más estudiadas el ácido tenuazónico (TA), el alternariol (AOH) y su derivado monometil éter (AME). El TA ha ocasionado toxicidad aguda en diferentes animales, tales como ratones, pollos y perros y ha sido asociado a desórdenes hematológicos en humanos como Onyalai (Andersen y col, 2015). Los AOH y AME son mutagénicos y genotóxicos en células bacterianas y de mamíferos *in vitro*. Además, su presencia ha sido relacionada con el desarrollo de cáncer de esófago en China (Andersen y col, 2015). Otros compuestos con bioactividad producidos por *Alternaria* incluyen altenueno (ALT), que mostró actividad citotóxica sobre *Artemia salina* (Pavón y col, 2012) y tentoxina (TEN), que se considera una fitotoxina no hospedador-específica (Lou y col, 2013). Otros derivados de benzopirona, ácido tetrámico y altertoxina-I también se han reportado en este género.

Tanto la especie *alternata* como otras especies de *Alternaria* (*tenuissima*, *arborescens*, *brassicae*, *capsiciannui*, *longipes*, *solani*, *radicina*) poseen la capacidad de producir diversas toxinas (Andersen y Frisvad, 2004).

Respecto de la incidencia natural de las toxinas de *Alternaria* en Argentina, el único estudio realizado hasta el momento fue llevado a cabo por Terminiello y cols. (2006) en puré de tomate. Se analizaron 80 muestras correspondientes a 23 marcas comerciales disponibles en mercado en la ciudad de Buenos Aires. El 49% de las muestras analizadas se encontraban contaminadas con alguna de las toxinas estudiadas. El TA fue la toxina detectada con mayor frecuencia (29% de las



muestras), en un rango de 39 a 4021 mg/kg, seguido por AME (26% de las muestras, rango: 84-1734 mg/kg). Por último, en el 6% de las muestras se detectó AOH en niveles de 187 a 8756 mg/kg.

Por otra parte, un estudio realizado en Brasil en 2001 determinó la presencia de TA en muestras de pulpa (39-111 ng/g) y puré (29-76 ng/g) de tomate mientras que no se observó la presencia de AOH y AME en 80 muestras analizadas (da Motta y Valente Soares, 2001).

Recientes estudios en diversos países de la Unión Europea han detectado toxinas de *Alternaria* en productos de tomate, con una alta incidencia, especialmente de TA. Por citar algunos ejemplos: en Bélgica se hallaron AOH, AME, TA, TEN y ALT en concentrados, jugos y salsas (Walravens y cols., 2016); en Alemania AOH, AME y TA en diversos productos (Hickert y cols., 2016); en Holanda AOH, AME y TA en salsas (López y cols., 2016); mientras que en Suiza TA, AOH y AME en concentrados y purés (Noser y cols., 2011).

Asimismo, en el 2011, el panel de la autoridad europea en inocuidad alimentaria (EFSA) CONTAM publicó su opinión sobre el riesgo para los animales y la salud pública en relación a la presencia de toxinas de *Alternaria* (AOH, AME, ATe, iso-ATe, ATXs, TEN, ALT, AAL) en piensos y alimentos, en el cual concluyó que los datos de toxicidad y de exposición dietaria eran hasta el momento insuficientes para establecer límites en los alimentos susceptibles. Sin embargo, se pudo establecer que, en los países europeos, la mayor contribución de AOH, AME, TA y TEN a la dieta está dada por el consumo de granos, frutas y vegetales, y entre estos últimos, particularmente, por productos de tomate (EFSA, 2011).

En 2016, un nuevo informe evaluó la exposición dietaria a toxinas de *Alternaria* en la Unión Europea. Entre las conclusiones de este informe se destaca que los mayores niveles de las 4 principales toxinas de *Alternaria* están asociados, entre otros, a productos procesados a base de tomate (EFSA, 2016).

Desde el punto de vista analítico, existen varias metodologías disponibles para la detección y cuantificación de las toxinas de *Alternaria* en tomate y productos a base de tomate. Sin embargo, las publicaciones recientes sugieren que la detección a través del uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS-MS) sería una de las metodologías de mayor elección (Rodríguez-Carrasco y cols., 2016; Walravens y cols., 2016).

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, hasta la fecha no existen límites permitidos, ni reglamentación con respecto a estas micotoxinas, emitidos por alguna autoridad regulatoria a nivel mundial.

## **2) Conclusiones**

Teniendo en cuenta que los tomates son susceptibles a contaminaciones fúngicas debido a sus características, es necesario contar con un método para determinar tanto la calidad sanitaria de la materia prima como de los productos terminados.

Si bien actualmente el Código Alimentario Argentino (CAA) establece como metodología oficial al recuento de hifas de mohos en cámara de Howard-Stephenson, debido a que el mismo presenta una serie de desventajas reconocidas tanto por sectores gubernamentales como industriales (tales como su baja reproducibilidad y elevada dependencia del operador) merece que su aplicación sea replanteada como metodología de elección. Asimismo, según el Consejo Mundial del Tomate Procesado (WPTC), la referencia al método de Howard en los criterios de calidad debería ser eliminada, siendo el método inexacto, anticuado y extremadamente subjetivo.

Es por ello que en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de métodos alternativos para la estimación de la contaminación fúngica en productos a base de tomate. Dentro de estos, la bibliografía menciona que algunos metabolitos y constituyentes naturales como la quitina y el ergosterol podrían ser utilizados como candidatos potenciales para tal fin. Por otra parte, y con menor difusión a nivel mundial, se mencionan técnicas como la tinción con fluorocromos, las lectinas fluorescentes y la espectroscopia por infrarrojo cercano (NIR).

A nivel mundial, varios países han optado por el empleo de ergosterol para determinar la calidad sanitaria de los productos a base del tomate (en reemplazo del método de Howard). En el 2014, la Asociación Internacional de Jugos de Frutas y Vegetales (IFU), publicó el método de análisis N°81, utilizado en diversos países de Europa como método de referencia. Respecto de los límites máximos sugeridos, no existe un único valor de referencia quedando el mismo a consideración del país productor/importador, siendo este un tema que necesita ser estudiado con mayor profundidad.

La presencia de micotoxinas en productos procesados a base de tomate está comprobada a nivel mundial (particularmente la de toxinas de *Alternaria*) y merece especial atención ya que existe evidencia de su presencia en productos elaborados en Argentina. La ausencia de legislación al respecto se debe principalmente a la escasez de datos de toxicidad, y a la necesidad de ampliar la información sobre la exposición dietaria a las mismas, a fin de establecer un límite razonable para su presencia en los alimentos más susceptibles a la contaminación. Asimismo, se requiere el desarrollo de técnicas analíticas oficiales a fin de ser implementadas por los organismos de control.

Consideramos que las micotoxinas son uno de los principales riesgos para la salud asociado al consumo de productos de tomate. Cuando los tomates mohosos se incorporan a la producción,



estos metabolitos tóxicos no son destruidos por el tratamiento térmico del proceso, por lo cual prevalecen en el producto final, y según el tipo de producto, pueden incluso concentrarse en el mismo. Asimismo, es de vital importancia evitar la incorporación de tomates enmohecidos a la línea de proceso, ya que ésta es la principal acción preventiva para reducir el riesgo asociado a las micotoxinas.

Por lo expuesto, consideramos que se debe disponer de una técnica precisa, objetiva, y de alta reproducibilidad, para evidenciar la presencia de mohos en la materia prima destinada al proceso. Esta técnica deberá ser utilizada como índice de calidad de la materia prima por los organismos de control a fin de reducir el riesgo para el consumidor. Asimismo, sería importante incluir a las micotoxinas en el listado de metabolitos de riesgo asociados al consumo de este tipo de productos.

### **3) Propuesta del grupo ad hoc de la RSA**

1) Evaluar la pertinencia actual que posee el método de recuento de hifas de mohos en cámara de Howard-Stephenson (según metodología AOAC 965.41) para determinar la calidad de las conservas de tomate.

2) Evaluar la factibilidad del reemplazo de dicha técnica por la determinación del contenido de ergosterol, utilizando la metodología recomendada por la International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) (metodología N°81, 2014) para determinar la calidad de las conservas de tomate.

3) Realizar estudios tendientes a determinar el/los valores límites máximos sugeridos para el contenido de ergosterol en estos productos.

4) Instalar la problemática relacionada con la presencia de ciertas micotoxinas en las conservas a base de tomate, de manera de incluirlas en el listado de metabolitos de riesgo asociados al consumo de este tipo de productos.

### **4) Referencias**

Andersen, B., Nielsen, K.F., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., 2015. Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of Food Microbiology*. 196:1-10.

Andersen, B., Frisvad, J.C., 2004. Natural Occurrence of Fungi and Fungal Metabolites in Moldy Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7507-7513.

- ANON, 2008. Tomato paste and puree, Turkish Standards Institute (Turk Standartlari Enstitusu) TSE 1466.
- AOAC, 1999. AOAC official method 965.41 mold in tomato products. In: official methods of analysis of AOAC International. 16d Ed.sth Revision. Gaithersburg, MD: AOAC International. P 63-64.
- Battilani, P., Chiusa, G., Cervi, C., Trevisan, M., Ghebbioni, C., 1996. Fungal growth and ergosterol content in tomato fruits infected by fungi. Italian Journal of Food Science. 4:283-289.
- Castro, M.F.P.M, Bragagnolo, N., Toledo Valentini, S.R., 2002. The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. Brazilian Journal of Microbiology. 33:22-26.
- CODEX, 1981. Norma del Codex para el concentrado de tomate elaborado (CODEX STAN 57-1981) Enmienda 2013.
- CODEX, 1981. Norma del Codex para los tomates en conserva (CODEX STAN 13-1981) Enmienda 2013.
- da Motta, S., Valente Soares, L.M., 2001. Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. Food Additives and Contaminants. 18(7):630-634.
- Drusch, S., Ragab, W., 2003. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. Journal of Food Protection. 66(8):1514-1527.
- Ekblad, A., Wallander, H., Näsholm, T., 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living biomass in ectomycorrhizae. New Phytologist. 138:143-149.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. EFSA Journal. 9:2407-2504.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2016. Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. EFSA Journal. 14(12):4654.
- Ghiretti, G.P., Spotti, E., 1995. Ergosterol production by different types of moulds able to colonize tomatoes. Industria Conserve. 70:3-12.
- Hickert, S., Bergmann, M., Ersen, S., Cramer, B., Humpf, H.U., 2016. Survey of *Alternaria* toxin contamination in food from the German market, using a rapid HPLC-MS/MS approach. Mycotoxin Research. 32:7-18.
- Kadalkal, C., Artik, N., 2004. A new quality parameter in tomato and tomato products: ergosterol. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 44:349-351.
- Kadalkal, C., 2012. A Survey of ergosterol content of tomato products in Turkey during 2006-2010. Italian Journal of Food Science. 24: 396-401.
- Kiskó, G., Kaffka, K., Daood, H., 2011. Preliminary studies on developing a new method for quality control of tomato purée. Acta Alimentaria. 40:59-66.

- López, P., Venema, D., de Rijk, T., de Kok, A., Scholten, J.M., Mol, H.G.J., de Nijs, M., 2016. Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. *Food Control*. 60:196-204.
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., Zhou, L., 2013. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*. 18(5):5891-5935.
- 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*. 27:265-271.
- Pavón, M. Á., Luna, A., de la Cruz, S., González, I., Martín, R., García, T., 2012. PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of alternuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. *Food Control*. 25(1):45-52.
- Porep, J.U., Walter, R., Kortekamp, A., Carle, R., 2014. Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. *Food Control*. 37:77:84.
- Pose, G., 2007. Tesis Doctoral. Caracterización de hongos fitopatógenos-toxicogénicos en productos frutihortícolas. El modelo *Alternaria* causante de 'enmohecimiento negro' en tomates cultivados en Argentina. Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.
- Potts, S.J., Thompson, J.F., Slaughter, D.C. 2000. A Fluorescent lectin test for mold in raw tomato juice. *Food Microbiology and Safety*. 65(2):346-350.
- Potts, S.J., Thompson, J.F., Slaughter, D.C. 2001. The effect of fungal species on the fluorescent lectin test. *Journal of Microbiological Methods*. 46:187-191.
- Ride, J.C., Drysdale, R.B., 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiology of Plant Pathology*. 1:409-420.
- 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*. 8, 328.
- Singh, C.B., Jayas, D.S., Paliwal, J., White, N.D.G., 2007. Fungal detection in wheat using near-infrared hyperspectral imaging. *Transactions of the ASABE*. 50(6): 2171-2176.
- Schnürer, J., Jonsson, A., 1992. Ergosterol levels and mould colony forming units in Swedish grains of food and feed grade. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*. 42: 240-245.
- 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.
- Tothill, I.E., Harris, D., Magan, N., 1992. The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grain. *Mycology Research*. 96:965–970.



Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Devos, T., Ediage, E.N., Di Mavungu, J.D., Jacxsens, L., Van Landschoot, A., Vanhaeckef, L., De Saeger, S., 2016. Validated UPLC–MS/MS methods to quantitate free and conjugated *Alternaria* toxins in commercially available tomato products and fruit and vegetable juices in Belgium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64:5101-5109.