

DESCONTAMINACIÓN DE PASA DE UVA CONTAMINADA CON OCRATOXINA A MEDIANTE EL USO DE ÁCIDO CÍTRICO Y CARBÓN ACTIVADO

N.D. Martínez*, A.M. Rodríguez, D.A. Gómez, A.R. Gutiérrez y E.B. Gómez

Instituto de Ingeniería Química (Universidad Nacional de San Juan)

Libertador San Martín 1109 (Oeste) - 5400 San Juan - Argentina

e-mail: noramart@unsj.edu.ar

Resumen. La pasa de uva puede contener hongos generadores de micotoxinas cuando las condiciones del medio son propicias. Para una de ellas, la ocratoxina A (OTA), se establece, en la mayoría de los países importadores, un límite máximo de 10 µg/kg. En este trabajo se proponen dos técnicas de abatimiento de OTA: lavado con ácido cítrico y lavado con agua conteniendo carbón activado proveniente de escobajo de uva. Para llevar a cabo los ensayos se utilizó pasas conteniendo 22,5 µg/kg de OTA. Se realizó un ensayo blanco con 25 g de las pasas contaminadas lavando con 250 ml de agua de red, determinándose que la toxina en la fruta no se modificó con este proceso. Alícuotas de 25 g cada una se pusieron en contacto de la misma manera que en el ensayo en blanco, con la misma cantidad de agua y diferentes cantidades de carbón activado por 30 minutos. Además, alícuotas de 25 g de pasas se pusieron en contacto con 250 ml de solución de ácido cítrico de diferentes concentraciones, manteniendo el mismo tiempo de contacto. En todos los casos, se analizó la pasa por HPLC para determinar la cantidad remanente de OTA. En las pruebas con carbón activado se alcanzó un abatimiento de OTA del 36%. En los ensayos realizados con ácido cítrico se consiguió una disminución del 67%. Los resultados son promisorios y se continúa trabajando para mejorar la calidad del producto.

Palabras clave: Pasa de uva, Ocratoxina A, Acido Cítrico.

* A quien debe enviarse toda la correspondencia

1. Introducción

La pasa de uva tiene, debido a su composición química, importantes propiedades que la convierten en un excelente alimento: ayuda a eliminar toxinas acumuladas en el organismo, mejora la salud dental, ocular, ósea e intestinal, tiene alto contenido en antioxidantes naturales, es muy eficaz para la prevención de tumores y cáncer de colon y es una excelente fuente de energía.

Argentina representa el 3% de la producción mundial de pasas de uva, ubicándose en el séptimo lugar entre los principales países exportadores (INV, 2011). La provincia de San Juan es el primer productor y exportador del país, concentrando el 91% de la producción argentina de pasas. San Juan cuenta con condiciones climáticas excelentes para la obtención de un producto de alta calidad, especialmente por la cantidad de días de sol y por su bajo nivel de precipitaciones.

La pasa se obtiene por secado al sol de la uva en fresco, distribuyendo los racimos encima de rejillas colocadas sobre el terreno pedregoso, propio de la región pedemontana de la cordillera de los Andes, asegurando un secado homogéneo y en caso de lluvias, de por sí muy escasas, un escurrimiento de forma inmediata. Actualmente se está probando la técnica californiana de secado de la uva en el viñedo mismo, o sistema DOV (*dry on vine*), donde los racimos se desprenden de la parra luego de estar sometidos a secado natural (Espíndola *et al.*, 2013)

Es común que la vid contenga hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Estos hongos generan micotoxinas como la ocratoxina A (OTA) y las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, cuando las condiciones del medio (temperatura, actividad del agua, etc.) son propicias (Martínez *et al.*, 2015), trasladándose a la uva en fresco y sus subproductos, pasas, mosto y vino.

La ocratoxina A (ver Fig. 1) es considerada nociva para los seres vivos debido a su acción cancerígena, nefrotóxica y teratogénica (López de Cerain and Soriano, 2007). La legislación de la mayoría de los países importadores establece para esta micotoxina, un límite máximo de 10 µg/kg. En años en que los factores climáticos son favorables para el desarrollo de los hongos mencionados, los valores de OTA pueden elevarse por encima del límite permitido, afectando gravemente la producción y exportación de uvas pasas. Es necesario entonces, encontrar técnicas de abatimiento de OTA, que permitan

mejorar de la calidad del producto, sin modificar sus características organolépticas, en forma inocua y con bajo costo.

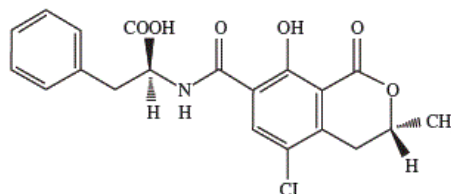


Fig. 1. Estructura química de la OTA.

En este trabajo se prueban dos posibles técnicas de abatimiento de OTA: lavado con ácido cítrico y lavado con agua conteniendo carbón activado. Este último se ha obtenido en el Instituto de Ingeniería Química (Martínez *et al.*, 2015) a partir de escobajo de uva, materia residual de la industria vitivinícola, formada por el esqueleto leñoso del racimo. El proceso de fabricación se realizó por carbonización del escobajo y posterior activación física con vapor de agua, caracterizándose posteriormente en lo que respecta a sus propiedades fisicoquímicas (área específica, distribución de volumen de poros, basicidad, etc.) arrojando resultados compatibles con un buen adsorbente.

El ácido cítrico, por otro lado, es un ácido orgánico tricarboxílico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. Su fórmula química es $C_6H_8O_7$ y su nombre según IUPAC es ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico. Es un buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado de muchos alimentos como las conservas de vegetales enlatadas. La acidez del ácido cítrico es debida a los tres grupos carboxilos -COOH que pueden perder un protón en las soluciones. Si sucede esto, se produce un ion citrato. Los citratos son unos buenos controladores del pH de soluciones ácidas. En este trabajo, se espera que dichas propiedades controladoras de pH generen un ambiente propicio para la remoción de OTA desde la superficie de la fruta desecada hacia la solución acuosa.

Se llevaron a cabo ensayos con diferentes concentraciones de ácido cítrico y distintas cantidades de carbón activado. Se utilizaron pasas con OTA fortificadas artificialmente y pasas contaminadas en forma natural. Las determinaciones de OTA se realizaron en el LAPRIQ, laboratorio del Instituto de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de

San Juan, acreditado bajo Norma IRAM 301-ISO/IEC 17025, con alcance en análisis de OTA en matriz pasa de uva por HPLC-FLD con columna de inmunoafinidad, método exigido por la normativa de los países importadores. Cabe aclarar que la normativa argentina no tiene restricciones en cuanto a la cantidad de micotoxinas permitidas en las pasas para consumo interno. Está reglamentado en el Protocolo de Calidad de Pajas de Uva, Resolución N° 146 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la República Argentina (2006) para acceder al sello Alimentos Argentinos.

2. Desarrollo experimental

2.1. Preparación de la muestra de pasas

Para llevar a cabo los ensayos se utilizó una muestra de pasas fortificadas con OTA. Se pesaron 300 g de pasas colocándose en un recipiente y cubriéndose con agua de red. Se agregó estándar de Ocratoxina R-Biopharm Rhone a la muestra, disuelta en una pequeña cantidad de agua. Se agitó manualmente en forma periódica por 48 horas para asegurar la distribución homogénea de la toxina entre las pasas. Se escurrió el agua con tamiz y se secó en estufa a 323 K, sometiéndose luego a análisis de OTA, previo muestreo, teniendo en cuenta que el método de análisis requiere una muestra de 25 g de pasas. Dicho método está validado por el LAPRIQ y se basa en extracción con metanol, *clean up* con columna de inmunoafinidad OCHRAPREP® y posterior elución con metanol. Para la medición se utilizó un equipo HPLC Perkin Elmer Serie 200 con detector por fluorescencia.

2.2. Preparación de carbón activado de escobajo de uva

El carbón activado usado en los ensayos, se preparó a partir de escobajo de uva. El método de activación ha sido desarrollado por el Instituto de Ingeniería Química (Deiana *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2009) y se detalla en trabajos previos (Martínez *et al.*, 2015). Se carbonizó el escobajo en retorta a 823 K por 4 h y se activó en horno vertical discontinuo a 1.153 K por 6 h. Se utilizó vapor de agua con un caudal de 1 ml de agua/g de carbón.min, utilizándose nitrógeno como *carrier* durante los procesos de calentamiento y enfriamiento. Se caracterizó posteriormente en lo que respecta a sus propiedades fisicoquímicas (área específica, distribución de volumen de poros,

basicidad, etc.), cuyos resultados, compatibles con un buen adsorbente, se reportan en Martínez *et al.* (2015).

2.3. Ensayos en blanco

Para constatar que la OTA no se eliminaba por contacto de las pasas con el agua de lavado, se realizó un ensayo blanco con 25 g de las pasas contaminadas, las cuales se colocaron en un erlenmeyer conteniendo 250 ml de agua de red, con agitación magnética por 30 minutos. Se determinó que un tiempo mayor produce el deterioro físico de la pasa. La relación sólido/líquido fue de 1/11 (g/g). Completado el tiempo de contacto, se escurrió el agua de cada muestra, colocándose en vidrio reloj. Se secaron al aire libre bajo campana por 48 horas y se sometieron a análisis de ocratoxina A.

Se realizó además, un ensayo para determinar si el ácido cítrico tiene alguna acción de destrucción sobre la molécula de OTA, generando compuestos de menor peso molecular. Para ello, se preparó 100 ml de una solución de ácido cítrico 0,1 M a la que se le agregó estándar de OTA suficiente para conseguir una concentración de 8 µg/l, analizándose luego de 10 min la concentración de OTA en la solución.

2.4. Ensayos de lavado

Con Carbón Activado. A partir de la muestra fortificada inicial, se tomaron tres alícuotas de 25 g cada una y se pusieron en erlenmeyers con 250 ml de agua de red. Se agregó en cada uno de ellos, 50, 100 y 150 mg de carbón activado de escobajo respectivamente, manteniéndose con agitación magnética por 30 minutos. Se volcó la mezcla en un colador, lavándose concienzudamente con agua de red para arrastrar el carbón activado. Se escurrió el agua y se dejó secar en vidrio reloj bajo campana por 48 h, analizándose luego por HPLC la cantidad remanente de OTA.

Con Ácido Cítrico. A partir de la muestra fortificada inicial, tres alícuotas de 25 g de pasas se pusieron en contacto con 250 ml de solución de ácido cítrico de 0,01; 0,1 y 0,5 M respectivamente, manteniendo en 30 minutos el tiempo de contacto. Al finalizar el ensayo se lavó la pasa con agua de red, se escurrió y se dejó secar bajo campana por 48 h en vidrio reloj, analizándose luego la cantidad de OTA remanente. Se realizaron además, ensayos con pasas de uva sin sembrar, contaminadas naturalmente.

Ensayos adicionales. Se probó con menor tiempo de contacto (15 minutos), menores concentraciones de ácido cítrico y con una relación sólido/líquido de 1/3 (g/g). Como se disponía de cantidad suficiente, se probó con alícuotas de 500 g de esta pasa, las cuales presentaron una concentración natural de OTA de 8,8 µg/kg. Se pusieron en contacto con 1 litro de solución de ácido cítrico al 0,01; 0,05 y 0,1 M. Las muestras se escurrieron, se lavaron, se dejaron secar y se sometieron a análisis de OTA, previo muestreo. El objetivo de este estudio fue comparar el abatimiento de la toxina en pasas contaminadas naturalmente respecto de las contaminadas de manera artificial, esto es, muestras fortificadas en el laboratorio.

3. Resultados y Discusión

En este trabajo, se presentan los resultados en función del porcentaje de abatimiento de OTA, calculado como:

$$\% \text{ de abatimiento} = \frac{(C_{i0} - C_i)}{C_{i0}} \times 100 \quad (1)$$

Donde C_{i0} es la concentración inicial de OTA en la muestra fortificada y C_i es la concentración de OTA medida durante un ensayo.

La concentración de OTA en la muestra fortificada fue de 22,5 µg/kg.

3.1. Carbón Activado

El carbón activado arrojó una superficie específica (BET) de 816 m²/g, con un alto contenido en microporos (0,42 cm³/g), un pH de 11,3 y elevada basicidad compatible con la presencia de estructuras tipo cromeno, quinona o γ-pirona y con electrones π deslocalizados en el plano basal de la superficie.

3.1. Ensayos en blanco

En el ensayo de lavado con agua sola, la concentración de 22,5 µg/kg de la muestra fortificada se mantuvo en el mismo valor, luego de 30 minutos de contacto y con agitación constante. Esto demuestra que la toxina no es eliminada durante el lavado con agua que se realiza en planta.

En el ensayo realizado con solución de cítrico y OTA sin la presencia de pasas de uva, la concentración de OTA se mantuvo en el valor inicial, demostrándose que la

presencia del ácido en el agua de lavado no actúa modificando la estructura química de la OTA. No obstante, se considera que este estudio requiere de un análisis más profundo debido a la posibilidad de reestructuración de la molécula al cambiar el pH en el proceso de análisis por HPLC.

3.2 Lavado con Carbón Activado

En las pruebas con carbón activado, se observa un aumento progresivo del porcentaje de abatimiento de OTA (ver Fig. 2). La máxima cantidad eliminada de OTA, obtenida con el uso de la mayor cantidad de carbón activado, es del 36% calculado según la Ec. (1). La curva se hace asintótica a ese valor, lo que sugiere que un aumento en la cantidad de carbón activado no mejorará la remoción de la toxina. Este hecho puede deberse probablemente a que el carbón solamente está en contacto con la superficie externa de la pasa, sin posibilidad de penetrar en los intersticios generados por su textura rugosa.

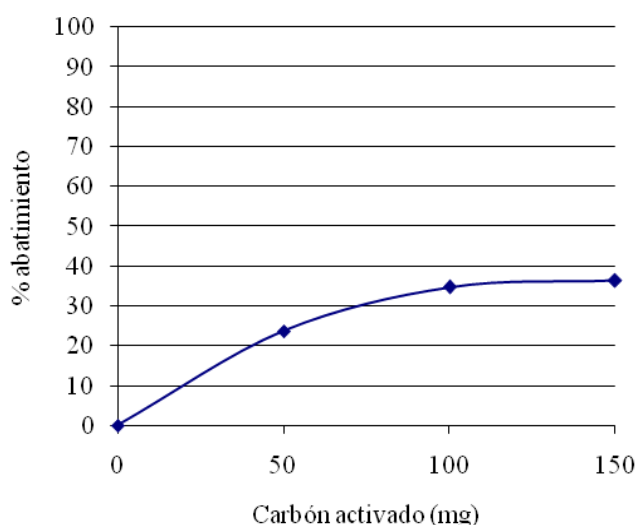


Fig. 2. Abatimiento de OTA por lavado con agua en presencia de carbón activado.

Si bien el resultado es positivo, se considera que los valores obtenidos son bajos, sobre todo teniendo en cuenta que, a escala industrial, las cantidades de carbón activado necesarias serían altas. El adsorbente tiene precios elevados y se debe pensar en un proceso de recuperación de agua por separación del carbón para hacer el proceso sustentable.

Debido a estos resultados, no se hicieron pruebas posteriores con este adsorbente para pasas de uva.

3.2 Lavado con Ácido Cítrico

Pasa de uva fortificada. Como se muestra en la Figura 3, en los ensayos de lavado con ácido cítrico realizados con pasa fortificada, donde la concentración de OTA fue de 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se consiguió una caída en la concentración del 67% para la máxima concentración de ácido. Con la mínima concentración ensayada, esto es 0,01 M, la cantidad abatida de OTA es similar a la obtenida con la máxima cantidad probada en los ensayos con carbón activado, aproximadamente un 35%. El ensayo utilizando solución 0,1 M arroja una disminución del 50%, muy interesante a la hora de disminuir valores de OTA por debajo del valor límite de los 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ exigidos por la legislación vigente.

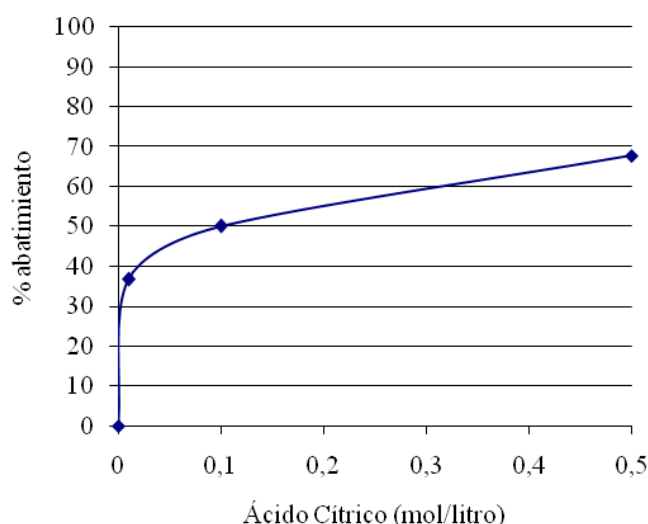


Fig. 3. Abatimiento de OTA por lavado con solución de ácido cítrico.

La forma de la curva sugiere que podría haber mayor remoción para valores mayores de concentración de ácido, aunque esto atenta contra la viabilidad económica del proceso. Evidentemente, la cantidad de ácido a usar dependerá de la cantidad de OTA a eliminar.

Pasa de uva contaminada naturalmente. En la Figura 4 se presenta el gráfico obtenido de abatimiento de OTA. Como se explicó anteriormente, la máxima concentración de ácido utilizada fue de 0,1 M. El tiempo de contacto fue menor a los ensayos con pasa sembrada (15 minutos), con el objetivo de probar tiempos de

residencia menores en vistas a su aplicación al proceso industrial. Otro motivo para realizar la prueba fue el hecho de tener dudas sobre la diferencia en la distribución de OTA sobre la superficie de la fruta cuando la contaminación es natural y cuando es artificial. Al respecto, puede verse que, a igual concentración de ácido se obtuvo una diferencia muy pequeña en el abatimiento conseguido. Para 0,1 M, la caída de concentración fue prácticamente la misma, esto es, aproximadamente un 50%. Otro resultado interesante, radica en el hecho de que el tiempo de contacto usado fue menor, lo que permite disminuir el tiempo de residencia en el equipo de lavado industrial.

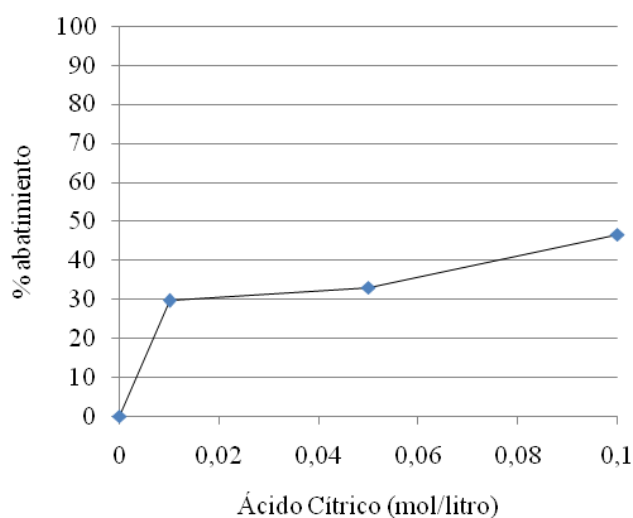


Fig. 4. Abatimiento de OTA en pasas contaminadas naturalmente.

La falta de continuidad en la curva obtenida y presentada en la Figura 4 se debe, seguramente, a la falta de homogeneidad de la distribución de OTA en las pasas contaminadas naturalmente, cosa que no ocurre con las pasas sembradas, las cuales presentaron mayor homogeneidad, con alícuotas que respondían al peso de pasas requeridos por el análisis por HPLC.

4. Conclusiones

La presencia de agua por sí sola, no modifica el nivel de contaminación con OTA de las pasas de uva.

El uso de carbón activado puede ser interesante para el abatimiento de OTA en pasas de uva, pero debido a los bajos valores de adsorción con cantidades importantes de carbón, no se considera, al menos a la vista de las pruebas realizadas, una alternativa

interesante con aplicación industrial, a menos que no se disponga de otra metodología más simple y económica.

El ácido cítrico aparece como una interesante opción para disminuir los valores de OTA en pasas provenientes de uvas contaminadas.

La presencia de ácido cítrico, en primera instancia, parece no modificar la estructura química de la OTA.

El abatimiento de OTA se puede realizar con concentraciones de ácido variables según el grado de descontaminación que se tenga en el producto y el valor final de concentración que se desee alcanzar, teniendo en cuenta los límites establecidos por la legislación vigente.

Se ha probado que tanto las muestras de pasas fortificadas como las contaminadas naturalmente, reaccionan del mismo modo ante la presencia de ácido cítrico en el agua de lavado.

Se puede disminuir el tiempo de contacto sin modificar el porcentaje de abatimiento de OTA por acción del ácido cítrico. Este hecho es muy interesante a la hora de disminuir los tiempos de residencia durante el lavado en la línea de producción, preservando la integridad física del producto y disminuyendo los costos de operación en lo que respecta a cantidad de agua utilizada, cantidad de reactivo y cantidad de energía requerida en el proceso.

Se continúa trabajando para establecer el mejor tiempo de contacto y relación pasa de uva/solución de ácido cítrico.

Agradecimientos

El equipo de trabajo agradece a la Universidad Nacional de San Juan por el soporte financiero para el desarrollo de este proyecto. Agradece además, al Instituto de Ingeniería Química por el soporte económico y humano para llevar a cabo, en el LAPRIQ, las determinaciones analíticas requeridas.

Referencias

Deiana, A.C., Petkovic, L.M., Silva, H.S., Aguilar, E.W., Sardella, M.F., Venturini, R.B. (2002). Residuos y subproductos para la obtención de briquetas de Carbón Activado. *VI Curso-Taller Iberoamericano de Adsorbentes y Catalizadores para la Protección Ambiental*, Redes Temáticas VC y VC – CYTED, 9, Venezuela.

- Espíndola, R., Alonso, F., Ferreyra, M., Battistella, M., Pugliese, F. (2013). *Secado de uva en parral; una innovación para el sector productor de pasas de San Juan*. Agencia de Extensión Rural Caucete, EEA San Juan, INTA, San Juan.
- INV. (2011). *INV, Las Pasas de Uva en el Mundo y en Argentina*, Departamento de Estadística y Estudios de Mercado, Subgerencia de Estadística y Asuntos Técnicos Internacionales, Mendoza.
- López de Cerain, A., Soriano, J. (2007). *Ocratoxina A*, Micotoxinas en alimentos, Ediciones Díaz de Santos, 201-218, España.
- Martínez, N.D., Venturini, R. B., Silva, H.S., González, J.E., Rodríguez, A.M. (2009). Copper on Activated Carbon for Catalytic Wet Air Oxidation, *Materials Research*, 12:1, 45-50.
- Martínez, N. D., Rodríguez, A. M., Gutiérrez, A. R., Granados, D.L. (2015). Abatement of Ochratoxin A from Contaminated Wine and Grape Juice by Activated Carbon Adsorption. *Latin American Applied Research*, 45:1.
- SAGPyA(2006). Resolución N° 146 – 2006, *Protocolo de Calidad para Pasas de Uva*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la República Argentina.