

Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*

Ana María González, Maximiliano Presa, María Gabriela Latorre, María Cristina Lurá

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. (3000) Santa Fe. Argentina

Resumen

El objetivo fue aplicar un ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* para la detección de metabolitos fúngicos tóxicos, obtenidos a partir de hongos contaminantes de hierbas medicinales y alimentos. Los extractos fúngicos fueron clasificados, según el porcentaje de mortalidad hallado, como: no tóxico (NT), levemente tóxico (LT), tóxico (T) y muy tóxico (MT). En los tipos T y MT se investigó la presencia de micotoxinas. Seis extractos resultaron de tipo T (8,5%). *Penicillium brevicompactum* Dierckx, aislado de un embutido, fue el único MT, debido principalmente a la presencia de ocratoxina A y de otros dos metabolitos no identificados.

Palabras clave

Metabolitos fúngicos, Capacidad toxicogénica, *Artemia salina*

Detection of fungal metabolites showing toxic activity through *Artemia salina* bioassay

Summary

The aim of this study was to detect toxic metabolites from fungi contaminating food and medicinal herbs by applying the toxicity assay to *Artemia salina*. According to toxicity percentages, the extracts were classified as nontoxic (NT), slightly toxic (ST), toxic (T) and highly toxic (HT). Those classified as T and HT were assayed for mycotoxins. Only 6 out of 71 strains were found to be T (8.5%) for *A. salina*. *Penicillium brevicompactum* Dierckx, isolated from sausages, was found to be HT, mainly due to the presence of ochratoxin A and two other unidentified metabolites.

Key words

Metabolites from fungi, Toxicogenic ability, *Artemia salina*

Los hongos, crecen sobre una gran variedad de sustratos, y algunos de ellos, bajo determinadas condiciones, producen micotoxinas [13].

La aplicación de sistemas de *screening* rápidos y sencillos, tales como los bioensayos, han demostrado ser herramientas valiosas para investigar la capacidad toxicogénica de los metabolitos fúngicos y descubrir nuevas micotoxinas [8,22].

Artemia salina es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas [14]. Michael y col. [15] y Vanhaecke y col. [21] propusieron su uso para pruebas de toxicidad. Fue empleado por Logrieco y col. [12] en la selección y caracterización de cepas de *Fusarium* productoras de fusaproliferina, ha sido aplicado al estudio de extractos de *Aspergillus* y *Penicillium* [2], y en la valoración de la toxicidad de hongos entomopatógenos [9]. Ha sido propuesto para la búsqueda de nuevos metabolitos tóxicos [8] y para la determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀) o del porcentaje de mortalidad que produce una sustancia, habiéndose determinado una muy buena correlación con las pruebas específicas de citotoxicidad [22].

El objetivo de este trabajo fue aplicar el ensayo de toxicidad a *Artemia salina* para la detección de metabolitos fúngicos tóxicos, obtenidos a partir de hongos contaminantes de hierbas medicinales y alimentos.

Se estudiaron muestras de malva (*Malva silvestri*), poleo (*Lippia turbinata*), estigma de maíz (*Zea mais*), boldo (*Pneumus boldo*), carqueja (*Baccharis articulata*), menta (*Mentha piperina*), yerba mate (*Ilex paraguayensis*), embutidos secos fermentados tipo salamin y semillas de soja (*Glycine max* L. Merr.).

Dirección para correspondencia:

Dra. Ana María González
Catamarca 3580
(3000) Santa Fe. Argentina
Tel.: + 54 342 4534372
E-mail: amgpodio@fbc.unl.edu.ar

Aceptado para publicación el 26 de diciembre de 2005

©2007 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

Tabla 1. Distribución de los géneros fúngicos en las muestras de hierbas medicinales, soja y embutidos analizadas.

Género	Fuente de aislamiento									
	Menta	Malva	Poleo	Estigma de Maíz	Boldo	Carqueja	Yerba mate	Soja	Ebutidos	Total
<i>Penicillium</i>	2	1	1	4	1	2	3	3	18	35
<i>Aspergillus</i>		3	1	3		1	1			9
<i>Fusarium</i>				1				3		4
<i>Alternaria</i>	1	1	1			1				4
<i>Cladosporium</i>		1		2					1	4
<i>Curvularia</i>			1							1
<i>Schizophyllum</i>	1									1
<i>Verticillium</i>	1									1
<i>Trichoderma</i>					4	3				7
Micelio estéril	3			1		1				5
Total	8	6	4	11	5	8	4	6	19	71

Para el aislamiento de los hongos se aplicaron las técnicas de Aziz et al [3], en las hierbas medicinales, Laich y col. [11] en los embutidos y plaqueo directo en las semillas de soja previamente desinfectadas con NaClO al 2% [17]. Se utilizó agar extracto de malta [17] para todas las cepas fúngicas, excepto con *Fusarium* spp., que se aisló sobre agar papa dextrosa [17].

Todos los aislamientos obtenidos se identificaron según claves taxonómicas clásicas [16,17,19].

Las cepas aisladas fueron inoculadas en medio de arroz [4] e incubadas a 25 ± 1 °C, durante 15 días, en oscuridad. Se extrajeron los metabolitos fúngicos y el medio sin inocular (utilizado como blanco) con cloroformo. [4] Los extractos fueron desecados y conservados a -20 °C.

Se aplicó el ensayo de toxicidad sobre *A. salina* por triplicado con cada uno de los extractos y el blanco [7]. Se determinó el porcentaje de mortalidad de las larvas y se calcularon los valores promedio para cada extracto y para el blanco. En el caso de obtener larvas muertas en el blanco, se corrigió del siguiente modo:

% Mortalidad corregido = % Sobrevivientes en blanco - % Sobrevivientes en el tratamiento [5].

Los extractos fúngicos se clasificaron según el porcentaje de mortalidad [8]: 0-9%, no tóxico (NT); 10-49 %, levemente tóxico (LT); 50-89 %, tóxico (T) y 90-100%, muy tóxico (MT).

Se investigó la presencia de micotoxinas en los extractos T y MT por cromatografía en capa delgada (TLC), utilizando placas de silicagel (Merck, código 1.05554), y las siguientes toxinas como testigos: aflatoxinas B₁ y B₂ (AFB_{1,2}) (Sigma, lote 36H4000), diacetoxiscirpenol (DAS) (Sigma, lote 114H4064), nivalenol (NIV) (Sigma, lote 123H4003), deoxinivalenol (DON) (Sigma, lote 45H4020), toxina T-2 (Sigma, lote 66H4057), citrinina (CIT) (Sigma, lote 76H4041), y zearalenona (ZEA) (Sigma, lote 81H4077). Se utilizaron también extractos de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium proliferatum*, buenos productores de ocratoxina A (OTA) y moniliformina (MON), respectivamente, como testigos de estas micotoxinas.

Las placas se desarrollaron en tolueno-etilacetato(90%)-ácido fórmico, en relación 6:3:1 [20]. Los cromatogramas se observaron a la luz visible y ultravioleta (254 y 365 nm), antes y después del asperjado con p-anisaldehído [20], Cl₃Al al 20 % y ácido sulfúrico al 20% [10], y se determinaron los R_F de las distintas bandas halladas [10,20].

Se aislaron 71 cepas fúngicas (Tabla 1). Coincidentemente con lo referido por otros autores, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* fueron los hongos más frecuentemente aislados a partir de las hierbas medicinales [3], y *Penicillium* en embutidos [18]. El bajo número de aisla-

mientos a partir de la soja podría atribuirse a la desinfección superficial de las semillas.

Sólo seis de los extractos resultaron de tipo T (8,5%) y uno MT (1,5%) (Tabla 2). El boldo fue la única hierba medicinal de la cual se aislaron hongos sin actividad tóxica. A pesar de que a partir de la menta y el estigma de maíz se aislaron un considerable número de hongos, sólo resultaron de tipo LT el 25% y 9% respectivamente, siendo el resto NT.

Harwig y Scott [8] analizaron 70 extractos de hongos y encontraron un número mayor de cepas tóxicas para *A. salina* (38%) que en este trabajo (10%). Esto podría deberse a que utilizaron diferentes condiciones de cultivo y de extracción de los metabolitos fúngicos y, además, a que algunas de las cepas provenían de trigo contaminado con OTA y de alimentos implicados en patologías animales.

Tabla 2. Origen de las especies fúngicas con actividad tóxica frente a *Artemia salina*.

Especie	Fuente	Toxicidad
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	Ebutido	98% (MT) ¹
<i>P. chrysogenum</i> Thom	Ebutido	75% (T) ²
<i>P. commune</i> Thom	Ebutido	74% (T)
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	Malva	65% (T)
<i>Fusarium chlamydosporum</i> Wollenw. & Reinking	Soja	72% (T)
<i>F. chlamydosporum</i> Wollenw. & Reinking	Soja	54% (T)
<i>Trichoderma</i> sp.	Carqueja	58% (T)

¹ MT: muy tóxico, ² T: tóxico

Tabla 3. Toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto total y de cada uno de los metabolitos obtenidos de *Penicillium brevicompactum* aislado de embutido.

Extracto total	Mortalidad (%) 98	Grado de toxicidad MT ³
Ori ¹	5,77	NT ⁶
A	0,00	NT
B	17,55	LT ⁵
C	76,24	T ⁴
D	0,00	NT
E	54,37	T
F	0,62	NT
G	59,35	T
Fr ²	0,00	NT

¹ Fracción correspondiente a la línea de siembra; ² fracción correspondiente al frente del solvente; ³ muy tóxico; ⁴ tóxico; ⁵ levemente tóxico; ⁶ no tóxico.

De las toxinas investigadas, sólo se identificó OTA en el extracto de *Penicillium brevicompactum* Dierckx. Este hallazgo ya ha sido publicado con anterioridad [1]. La producción de OTA por hongos contaminantes de embutidos constituye un riesgo por los efectos tóxicos que produce, especialmente a nivel renal. No obstante, no se conoce que el embutido sea un sustrato adecuado para la producción de micotoxinas [18].

Analizados los metabolitos de *P. brevicompactum*, muy tóxico, mediante una TLC preparativa, se obtuvieron 7 fracciones: A ($R_F = 0,04$), B ($R_F = 0,17$), C ($R_F = 0,23$), D ($R_F = 0,27$), E ($R_F = 0,30$), F ($R_F = 0,37$) y G ($R_F = 0,51$).

Sólo las fracciones C, E y G mostraron elevada toxicidad frente a *A. salina* (Tabla 3). La toxicidad de la fracción G, identificada como OTA, fue concordante con lo ya descrito para esta micotoxina (50 - 75%) [2].

Dado que *P. brevicompactum* Dierckx es productor de ácido micofenólico [6], se investigó su presencia utilizando como revelador cloruro férrico en medio ácido y en solución alcohólica [6]. En ambos casos, la reacción resultó negativa.

Se concluye que el 10% de las cepas estudiadas resultaron tóxicas (T y MT) para *A. salina*, habiendo sido recuperadas de embutidos, soja, carqueja y malva. El extracto de *P. brevicompactum* Dierckx aislado de un embutido, fue el único que resultó muy tóxico, debido principalmente a la presencia de OTA y de otros dos metabolitos no identificados.

Nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional del Litoral por haber subsidiado el trabajo (Subsidio CAID' 2000), y al Dr. Arturo Simonetta y a la Lic. Karen Russell-White (Facultad de Ingeniería Química, UNL) por el suministro de los testigos moniliformina y zearalenona.

Bibliografía

- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F, Cabañes FJ. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 63-68.
- Abdel-Mallek AY, El-Maraghy SSM, Hasan HAH. Mycotoxin-producing potential of some *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* isolates found on corn grains and sunflower seeds in Egypt. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 1993; 6: 189-192.
- Aziz NH, Youssef YA, El-Fouly MZ, Moussa LA. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Bot Bull Acad Sin* 1998; 39: 279-285.
- Basílico JC, Lurá MC, Parada JL. Actividad mutagénica de hongos aislados de sorgo y maíz. *Bol Micol* 1987; 3: 111-115.
- Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2002; 2: 17.
- Cole RJ, Cox RH. *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York, Academic Press, 1981.
- González AM, Presa MF, Lurá MC. Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: Puesta a punto y aplicación a micotoxinas. *Revista FABICIB* 2003; 7: 117-122.
- Harwig J, Scott PM. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol* 1971; 21: 1011-1016.
- Jonsson CM, Genthner FJ. Evaluation of the potential pathogenicity and toxicity of the fungal entomopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Orthezia* to two species of crustaceans. *Embrapa-CNPMA. Boletim de Pesquisa* 1997; 1: 1-27.
- Kamimura H, Nishijima M, Yasuda K, Saito K, Ibe A, Nagayama T, Ushiyama H, Naoi Y. Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs. *J Assoc Off Anal Chem* 1981; 64: 1067-1073.
- Laich F, Fierro F, Cardoza RE, Martin JF. Organization of the Gene Cluster for Biosynthesis of Penicillin in *Penicillium nalgiovense* and Antibiotic production in cured dry sausages. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1236-1240.
- Logrieco A, Moretti A, Fornelli F, Fogliano V, Ritieni A, Caiuffa MF, Randazzo G, Bottalico A, Macchia L. Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and IARC/LCL171 human B lymphocytes. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 3378-3384.
- Lurá MC, González AM, Basílico JC, Sarsotti Falcón PV, Gomez R, Freyre L. Introducción al estudio de la Micología. Santa Fe, Argentina, Centro de Publicaciones UNL, 1997.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 1982; 45: 31-34.
- Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. *Artemia salina* as test organisms for a bioassay. *Science* 1956; 123: 464.
- Piontelli LE, Toro MA. Introducción al estudio de los microhongos. Guía de identificación genérica parte I. Cátedra de Micología. Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso, 1989.
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food spoilage*. Maryland, Aspen Publishers Inc., 1999.
- Pose G, Ludemann V, Pollio MA, Segura J. Micoflora autóctona de la superficie de embutidos secos fermentados. *La Industria Cárnica Latinoamericana* 2003; 129: 28-31.
- Raper K, Fenell D. *The genus Aspergillus*. Baltimore, Williams and Wilkins Co, 1965.
- Scott PM, Lawrence JW, van Walbeek W. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: Application to screening of fungal extracts. *Appl Microbiol* 1970; 20: 839-842.
- Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 1981; 5: 382-387.
- Wijnands LM, van Leusden FM. An overview of adverse health effects caused by micotoxins and bioassays for their detection. Bilthoven, National Institute of Public Health and the Environment, 2000.