



Hongos toxicogénicos contaminantes de frutos de alpataco

Mónica Canafoglia, Ricardo Comerio, Virginia Fernández Pinto y Graciela Vaamonde

Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Química Orgánica- Área Bromatología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Resumen

Se estudió la presencia de hongos potencialmente toxicogénicos en frutos de alpataco (*Prosopis flexuosa* D.C. var. *depressa* Roig) recolectados en la provincia de La Pampa, Argentina. Las especies predominantes fueron *Alternaria alternata* y *Sphaeropsis sapinea*. En menor proporción se aislaron *Phoma* sp., *Nigrospora* sp., *Preussia minima*, *Cladosporium* sp., *Pithomyces chartarum*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus speluneus*. La capacidad para producir micotoxinas se determinó en 12 cepas de *Alternaria alternata*, única especie potencialmente toxicogénica aislada con relativa frecuencia. Dos cepas produjeron ácido tenuazónico (AT), alternariol (AOH) y alternariol-metil-éter (AME), seis produjeron AOH y AME, una produjo solamente AME y las tres restantes resultaron no toxicogénicas. Los resultados de este estudio preliminar indican un riesgo potencial de contaminación con toxinas de *Alternaria* en la harina de alpataco, de creciente uso en la alimentación humana y animal en ciertas áreas geográficas.

Palabras clave

Alpataco, *Prosopis*, Hongos, Micotoxinas, *Alternaria alternata*

Putative mycotoxin-producing fungi isolated from "alpataco" (*Prosopis flexuosa*) fruits

Summary

Fungi contaminant of "alpataco" (*Prosopis flexuosa*) fruits from "La Pampa province" (Argentina) were identified. *Alternaria alternata* and *Sphaeropsis sapinea* were the dominant species. *Phoma* sp., *Nigrospora* sp., *Preussia minima*, *Cladosporium* sp., *Pithomyces chartarum*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus speluneus* were also isolated but with less frequency. Twelve strains of *Alternaria alternata*, the toxigenic species with higher incidence, were screened for alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME) and tenuazonic acid (TA) production. Since one isolate was able to produce AME, six isolates produced AOH and AME and two isolates produced AOH, AME and TA, these results indicate a potential risk of contamination with *Alternaria* toxins in this substrate.

Key words

Prosopis, Fungi, Mycotoxins, *Alternaria alternata*

El alpataco (*Prosopis flexuosa* D.C. var. *depressa* Roig) es un arbusto americano típico de la provincia de La Pampa, Argentina. Junto con otras especies del género *Prosopis*, (algarrobo, caldén, itin, vinal, entre otros) constituye un componente importante de la vegetación de las zonas áridas y semiáridas. Son plantas xeromorfas que se desarrollan naturalmente en una gran extensión del centro y norte del país [4].

La mayoría de las especies de *Prosopis* constituyen un recurso importante para la vida del hombre, pues proporcionan leña, madera, sombra y alimento. Los frutos, en forma de chaucha (vaina), poseen un nivel de proteínas del 14%. Se destaca el alpataco cuya chaucha es la mejor de las leguminosas de este tipo al ser la que más azúcar contiene. De esta leguminosa se obtiene una harina («patay») que se utiliza en la elaboración de bizcochos, sopas, guisos y otras preparaciones culinarias, y bebidas alcohólicas como la «aloja». El alpataco también tiene valor como forraje, dado que su fruto se emplea como ceba para el ganado [4]. Recientemente se ha descubierto que la harina de alpataco no contiene gluten [7] y podría ser consumida por quienes sufren la enfermedad celíaca.

Argentina es el centro de diversidad del género *Prosopis*, un recurso de múltiples aplicaciones, considerado de interés para encarar la recuperación de zonas áridas y semiáridas. Existen estudios sobre diversos aspectos de su aprovechamiento, pero en la actualidad son escasos los estudios microbiológicos y toxicológicos, de gran relevancia en relación al uso potencial en la alimentación humana.

Dirección para correspondencia:

Dra. Graciela Vaamonde
Departamento de Química Orgánica. Área Bromatología
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires
Ciudad Universitaria, Pabellón 2, Piso 3
C1428EGA, Buenos Aires, Argentina
Tel./Fax: +54 11 45763346
E-mail: vaamonde@qo.fcen.uba.ar

Aceptado para publicación el 2 de diciembre de 2005

Los hongos juegan un rol importante como contaminantes, en particular aquellos capaces de producir metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas) [10]. En otras áreas desérticas del mundo, por ejemplo en el desierto de Sonora (Arizona), se ha determinado que estas leguminosas son frecuentemente contaminadas por *Aspergillus flavus*, productor de aflatoxinas [3]. Estas toxinas se han encontrado como contaminantes naturales en los frutos y exudados de *Prosopis* spp. Estos árboles, que crecen cerca de los campos cultivados con cereales, son considerados reservorios de hongos aflatoxigenicos y están expuestos naturalmente a las aflatoxinas en estos hábitats.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de los hongos contaminantes de los frutos de alpacato, con especial interés en aquellos potencialmente toxicogénicos, a fin de evaluar el riesgo potencial de contaminación con micotoxinas de las harinas y productos derivados.

Se recolectaron frutos maduros de alpacato (5 kg) en el departamento de Chalileo, provincia de La Pampa, Argentina. En el laboratorio se obtuvieron por cuarteo dos porciones de 250 g cada una (50 frutos) para su análisis en dos medios de cultivo (agar Dicloran-Cloranfenicol-Peptona (DCPA) y agar Dicloran -Glicerol 18% (DG18) [9]). Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante dos minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm de longitud. Los fragmentos de cada chaucha se depositaron asépticamente sobre la superficie de los medios de cultivo mencionados. Se sembraron 3-4 trozos en cada una de dos cajas de Petri conteniendo DCPA y DG18 respectivamente. La incubación se realizó a 25 °C durante dos semanas, aislándose todos los hongos que se desarrollaron sobre los frutos.

A fin de estimar el riesgo de contaminación del alpacato con toxinas de *Alternaria alternata*, se seleccionaron 12 aislamientos de esta especie y se determinó su capacidad toxicogénica. Dichos aislamientos se inocularon en arroz húmedo estéril (25 g de arroz con 45% de humedad, autoclavado durante 15 minutos a 120 °C) y se incubaron durante 7 días a 25 °C. La extracción de las toxinas se realizó según el método propuesto por Visconti et al. [11], con algunas modificaciones. Los hongos que se desarrollaron sobre el arroz fueron extraídos con 40 ml de metanol y, posteriormente, filtrados. A 20 ml del filtrado se agregaron 40 ml de sulfato de amonio acuoso al 20%, se agitó y se volvió a filtrar. El extracto acuoso fue tratado dos veces con 25 ml de cloroformo, y los extractos clorofórmicos combinados se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo fue disuelto en metanol para el posterior análisis de alternariol y alternariol-metil-éter por cromatografía en capa delgada.

Para la detección del ácido tenuazónico, la solución acuosa remanente de la extracción con cloroformo se acidificó a pH 2,0 con ácido clorhídrico 1 N, tratándose posteriormente con 25 ml de cloroformo en dos ocasiones. El ácido tenuazónico se extrajo de la fase orgánica con 15 ml de solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5%, se volvió a acidificar a pH 2,0 y se repitió la extracción con 15 ml de cloroformo. Los extractos combinados se deshidrataron y se disolvieron en metanol para su posterior análisis por TLC en placas de Sílica Gel 60 (0,25 mm). Como solventes de desarrollo se emplearon tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico en proporción 5:4:1 y cloroformo-acetona (90:10). El alternariol y el alternariol-metil-éter se detectaron por fluorescencia azul bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm), por comparación visual con soluciones patrón de ambas micotoxinas. El ácido tenuazónico fue revelado con cloruro férrico al 2% en metanol como una mancha marrón de igual Rf que el estándar. Las solu-

ciones patrón de micotoxinas fueron adquiridas en Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O. (EEUU).

En la tabla 1 se presentan los géneros y especies aislados en los dos medios de cultivo utilizados y su frecuencia de aislamiento. Se obtuvieron en total 83 aislamientos. La contaminación fúngica del sustrato estudiado es relativamente baja, aunque se debe tener en cuenta que se trata de la contaminación interna, ya que los frutos fueron desinfectados superficialmente. Es preciso destacar que esta flora contribuiría en mayor medida a la contaminación por micotoxinas si éstas pudieran producirse en el fruto.

En el medio DCPA se encontró mayor variedad de especies, siendo predominantes *A. alternata* y *Sphaeropsis sapinea*. En DG18, un medio mucho más restrictivo para el crecimiento debido a su menor actividad de agua, se obtuvo menor número de aislamientos; la mayoría de ellos correspondió a *S. sapinea* y, en menor proporción, se aisló *A. alternata*, *Phoma* sp., *Nigrospora* sp. Y *Cladosporium* sp. Es significativo que todos los hongos aislados de este sustrato están pigmentados, la mayoría de color negro, bien adaptados para resistir la intensa radiación solar de la zona en la cual se cosecharon los frutos. Es bien sabido que la presencia de melanina en la pared micelial y en las esporas de estos hongos oscuros protege dichas estructuras de las radiaciones ultravioleta y de otras condiciones ambientales adversas [9]. Esta es una característica reconocida en *Alternaria* [8] y también en *Aspergillus niger* [9], una de las dos únicas especies de *Aspergillus* encontradas.

Los géneros más frecuentemente relacionados con la producción de micotoxinas (*Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*) no parecen ser componentes habituales de la micota de los frutos de alpacato recolectados en la región, a diferencia de lo encontrado en las leguminosas del desierto de Sonora, donde *Aspergillus flavus* es muy común en el suelo, las plantas y los restos vegetales [3]. No se aislaron en los frutos pampeanos cepas capaces de producir aflatoxinas. *A. niger* es capaz de producir ocratoxina A [1] y *Pithomyces chartarum* puede producir esporidesmina [5], pero fueron aislados con muy baja frecuencia. La especie predominante en nuestro estudio fue *A. alternata*, de gran importancia, además, en la producción de micotoxinas.

El género *Alternaria* es también un contaminante muy frecuente de otros cultivos cosechados en la misma región. González et al. [6] encontraron que este género es el contaminante predominante en el trigo duro cultivado en la misma área geográfica, en tanto que Bresler et al. [2] describieron una alta frecuencia del género en muestras de amaranto provenientes de la provincia de La Pampa, Argentina.

Tabla 1. Taxones aislados de frutos de alpacato en diferentes medios de cultivo y su frecuencia de aislamiento.

Hongos aislados	Nº de aislamientos en DCPA	Nº de aislamientos en DG18	Frecuencia de aislamiento (%)
<i>Alternaria alternata</i>	22	6	34
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	11	17	34
<i>Phoma</i> sp.	6	3	11
<i>Nigrospora</i> sp.	3	3	7
<i>Preussia minima</i>	3	-	4
<i>Cladosporium</i> sp.	2	1	4
<i>Pithomyces chartarum</i>	2	-	2
<i>Epicoccum nigrum</i>	2	-	2
<i>Aspergillus niger</i>	1	-	1
<i>Aspergillus speluneus</i>	1	-	1

DCPA: agar Dicloran-Cloranfenicol-Peptona
DG18: agar Dicloran-Glicerol 18%

Tabla 2. Capacidad toxicogénica de *Alternaria alternata* aislada de frutos de alpataco.

CEPA N°	AT	AOH	AME
AA3	-	+	+
AA4	-	-	-
AA7	-	-	-
AA9	-	+	+
AA20	-	+	+
AA23	-	+	+
AA25	+	+	+
AA32	+	+	+
AA43	-	+	+
AA46	-	+	+
AA48	-	-	+
AA58	-	-	-

AT: ácido tenuazónico

AOH: alternariol

AME: alternariol-monometil-éter

A. alternata es capaz de producir varias micotoxinas [8,10] de las cuales el ácido tenuazónico (AT) es la más importante por su aguda y elevada toxicidad. Otros compuestos menos tóxicos, probablemente mutágenos, son el alternariol (AOH), alternariol-monometil-éter (AME), altemueno (AE), altertoxina I y altertoxina II. Se ha descrito la producción de una o más de estas toxinas en tomates, trigo, cebada, maíz, sorgo, girasol y olivas [9]. Algunos de estos metabolitos han sido relacionados con patologías que afectan al hombre y/o los animales. Por ejemplo, el ácido tenuazónico ha sido asociado al «onyalai», una enfermedad hematológica humana, propia de Namibia, aunque las evidencias no son concluyentes [8]. La toxicidad de esta micotoxina está bien documentada en aves, en las que produce síndromes hemorrágicos [9].

Se estudió el perfil de producción de metabolitos tóxicos de doce de las cepas de *A. alternata* aisladas de los frutos de alpataco. En la tabla 2 se puede observar que dos cepas produjeron AT, AOH y AME, seis produjeron AOH y AME, una produjo solamente AME y las tres restantes resultaron no toxicogénicas.

Los resultados de este estudio preliminar han demostrado la presencia de cepas toxicogénicas en la micota del fruto de alpataco cosechado en el área pampeana de nuestro país, lo que constituye un riesgo potencial de contaminación con toxinas de *Alternaria*. Teniendo en cuenta que *A. alternata* es un patógeno que coloniza los tejidos vegetales en la etapa precosecha, sería interesante el estudio de los factores que condicionan el desarrollo del hongo y la producción de las toxinas en el fruto, así como su persistencia en los procesos de elaboración de la harina y productos derivados.

Este trabajo ha sido subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) BID 1201/OC-AR, PICT 09-6691.

Los frutos de alpataco utilizados se obtuvieron con la colaboración de la profesora Sandra Gómez y sus alumnas Paula Jeanton, Daniela Figueroa y Leticia Godoy.

Bibliografía

- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ Microb* 1994; 60: 2650-2652.
- Bresler G, Brizzio SB, Vaamonde G. Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. *Int J Food Microbiol* 1995; 25: 101-108.
- Boyd ML, Cotty PJ. *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of leguminous trees of the Sonoran Desert in Arizona. *Phytopathology* 2001; 91: 913-919.
- Castro MA. *Prosopis*. Un recurso de múltiples aplicaciones. Exactamente (Revista de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires) 1994; 1: 19.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST) Task Force Report N° 139, Mycotoxins. Risks in plant, animal and human systems. Ames, Iowa, USA. 2003: 91.
- González HHL, Martínez EJ, Pacin A, Resnik SL. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. *Mycopathologia* 1999; 144: 97-102.
- Lauragaray G. Descubren una harina medicinal. *Diario Clarín*, Buenos Aires. 21 de diciembre, 1998: 77.
- López SE, Cabral D. *Alternaria*. En: Robinson RK, Batt CA, Patel PD (Eds). *Encyclopedia of food microbiology*. London, Academic Press, 1999: 42-49.
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*, 2nd Ed. London, Blackie Academic & Professional, 1997.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. *Introduction to food-and airborne fungi*, 6th Ed. Utrecht, The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.
- Visconti A, Logrieco A, Bottalico A. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives, their production and possible transfer into the oil. *Food Addit Contam* 1986; 3: 323-330.