

CARACTERIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DE HONGOS ALTERANTES DE ALIMENTOS UTILIZANDO *CAENORHABDITIS ELEGANS*



INTRODUCCIÓN

Los alimentos representan una rica fuente de nutrientes para hongos filamentosos que, en condiciones óptimas, tienen un rápido desarrollo. Sin embargo, también son capaces de crecer frente a condiciones no favorables e incluso adversas, tales como pre-tratamientos, condiciones de almacenamiento, incorporación de aditivos, como ocurre en el procesamiento de los alimentos (Stoev, 2016; Almudena & Lizaso, 2001).

Se ha descrito un gran número de géneros de hongos filamentosos que contaminan alimentos. Dentro de estos géneros, hay especies que tienen funciones beneficiosas en la elaboración de alimentos y otras que producen alteraciones cualitativas y cuantitativas y/o depositan sustancias tóxicas o micotoxinas (Alshannaq & Yu, 2017). Las especies toxigénicas se incluyen en los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* (Waskiewicz & Golinski, 2015). Sus micotoxinas pueden causar toxicidad aguda -con deterioro de órganos y pudiendo causar la muerte- o toxicidad crónica con efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos, por lo que representan el mayor riesgo de exposición para las poblaciones modernas (Alshannaq & Yu, 2017; Waskiewicz & Golinski, 2015).

Para evaluar la toxicidad se ha empleado una gran variedad de ensayos con animales (Hunt, 2016). Sin embargo, la toxicología moderna busca utilizar métodos alternativos al uso de animales (Romero

Trabajo ganador del Premio Publitec en el VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria organizado por la CAIA/IFP

Benito Nacir, M.J.*; Carranza, A.V.; Moran, Y.; Theumer, M.G.; Asis, R.
 Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI -
 Facultad de Ciencias Químicas -
 Universidad Nacional de Córdoba - CONICET.
 Córdoba, Argentina.
 *ramonasis@gmail.com

Fernández y col., 2016) para evitar el sufrimiento animal, reducir costos y lograr la predicción de los resultados en humanos. Una opción es utilizar un organismo modelo como el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Antoshechkin & Stenberg, 2007; Kamath y col., 2003), que se puede mantener y expandir en condiciones de laboratorio con procedimientos relativamente sencillos y proporcionan datos -a diferencia de los modelos celulares o microorganismos- de un animal entero con propiedades digestivas, reproductivas, endócrinas, sensoriales y neuromusculares intactas y metabólicamente activas (Hunt, 2016).

A pesar del gran número de géneros de hongos que contaminan alimentos y de su gran capacidad de sintetizar metabolitos secundarios, existe poca información de la toxicidad de aquellos hongos alterantes de alimentos que no clasifican en la categoría de hongos micotoxigénicos. Aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, algunas de estas sustancias pueden representar un riesgo potencial para la salud de la población, principalmente de aquellos países que no controlan estos contaminantes (Trigos y col., 2008; Ferratto y col., 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se empleó *C. elegans* como modelo predictivo para evaluar la potencial toxicidad de extractos de hongos alterantes de alimentos, aislados de productos de comercialización local tales como aceitunas negras y verdes, papaya, mandarina, tomate, pimienta, maíz, salame, pan, pan multicereal, chipá y pan criollo.

OBJETIVOS

Evaluar la toxicidad aguda y crónica de extractos de hongos alterantes de alimentos en un modelo experimental con *C. elegans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de extractos fúngicos

Para preparar los extractos fúngicos, hongos de diferentes alimentos visiblemente contaminados -comercializados en la ciudad de Córdoba- fueron aislados en placas de Petri con agar Sabouraud. La purificación fúngica se efectuó a partir de cultivos monospóricos en medios sólidos. Luego, los micelios se emplearon para la obtención de los extractos mediante el agregado de etanol absoluto, filtrado y posteriormente evaporados con corriente de nitrógeno. El extracto seco resultante fue disuelto en DMSO (a una concentración de 200 mg/mL), esterilizado mediante filtración (0,22 µm) y conservado a -80°C hasta su utilización.

Ensayos de exposición

Para el ensayo de toxicidad aguda se utilizó la cepa N2 var. Bristol de *C. elegans* en estadio larvario L4 (Figura 1). Los gusanos se incubaron en medios NGM con las

FIGURA 1 - Imagen de nematodos *C. elegans* en estadios L4 y huevos desarrollándose en medio sólido NGM y sobre una capa de bacteria *E. coli*.



distintas concentraciones de los extractos de hongos puros durante 24, 48 y 72 horas (teniendo en cuenta que la sobrevivencia media de *C. elegans* es de 25 días). Al finalizar cada tiempo, los gusanos fueron examinados bajo lupa estereoscópica para determinar el número de gusanos vivos y muertos. Los gusanos que no se movieron después de repetidos contactos con el ansa fueron considerados muertos. Con estos datos se

ALQUILER Y VENTA DE EQUIPOS INDUSTRIALES

INGENIERÍA EN FLUIDOS

Filtrado y tratamiento de aguas brutas y efluentes:

- Podemos filtrar agua desde 5 micrones en adelante sin límites de caudal.
- Filtros de malla y de anillas, automáticos y auto limpiantes:
 - Ocupan espacio reducido
 - Baja pérdida de presión en el circuito
 - Bajo caudal de limpieza
 - Programables según variables del usuario
 - Muy bajo costo de mantenimiento



También disponible en DLP
Also available in DLP



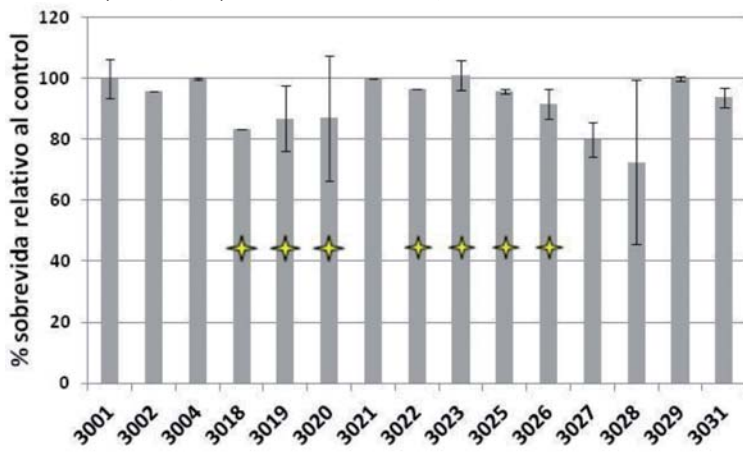
Filtros manuales para caudales desde 5 a 50 m³/h





Juan J. Paso 7410 (2000) Rosario - Tel.: (54 341) 525-3653 / (0341) 155068062 - contacto@ecoflowsrl.com.ar - www.ecoflowsrl.com.ar

FIGURA 2 - Sobrevida de nematodos expuesto a una única dosis (10 mg/mL) de extracto de hongos durante 72 horas



determinó el porcentaje de sobrevida en la población y se construyeron curvas dosis-respuesta a diferentes tiempos para calcular la DL50.

La toxicidad crónica se evaluó considerando el efecto sobre el desarrollo, crecimiento y reproducción, de gusanos expuestos a una concentración subletal de los extractos (10 mg/mL). Para el efecto en el desarrollo, huevos de *C. elegans* fueron expuestos al extracto durante 96 horas y posteriormente se cuantificó el porcentaje de huevos que eclosionaron y el porcentaje de gusanos que llegaron a adultos. Para estudiar el efecto

sobre crecimiento, gusanos adultos jóvenes (L3) fueron expuestos 24 horas al extracto y se cuantificó la longitud corporal por microscopía. Para evaluar el efecto sobre la reproducción, gusanos adultos jóvenes (L3) fueron expuestos individualmente al extracto durante 24 horas y con posterior cuantificación de postura de huevos. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y referidos al control expuesto a DMSO.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de ANOVA con el software estadístico INFOSTAT versión 2017p (Universidad Nacional de Córdoba). Las diferencias significativas fueron con un $p < 0.05$.

RESULTADOS

Previo a los ensayos de toxicidad aguda y crónica, se evaluó la toxicidad letal de 15 extractos (a una concentración de 10 mg/ml) correspondientes a aislamientos de hongos de diferentes fuentes alimentarias. De este estudio se detectaron siete extractos con capacidad de producir mortalidad en la población de *C. elegans* superior al control en un periodo de 72 h (Figura 2). La identificación de los hongos reveló que tres aislamientos pertenecían al género *Penicillium* (Pen-3018, Pen-3019 y Pen-3028), tres pertenecían al género *Aspergillus* (Asp-3020, Asp-3025 y Asp-3027), y uno de ellos correspondía al orden de los Mucorales (Muc-3026) (Figura 3).

En los ensayos de toxicidad aguda de 24 horas, solamente los extractos Asp-3027 y Asp-3025 presentaron toxicidad letal con una DL50 estimada de 2×10^4 mg/mL y 2×10^9 mg/mL, respectivamente (Figura 4a). El extracto Asp-2027 fue el que resultó más tóxico para los nematodos.

En los ensayos de toxicidad aguda de 72 horas (Figura 4b), todos los extractos presentaron toxicidad letal con excepción del extracto Muc-3026 y Pen-3019. Las dosis estimadas ordenados de mayor a menor toxicidad fueron Asp-3020 DL50: 1,77 mg/mL, Pen-3028 DL50: 2,30 mg/mL, Asp-3027 DL50: 4,07 mg/mL, Asp-3025 DL50: 15,49 mg/mL y Pen-3018 DL50: 109,65 mg/mL.

En los ensayos de toxicidad crónica, el desarrollo del nematodo se vio afectado por los extractos Asp-3020 y Pen-3028, que

FIGURA 3 - Características de las colonias fúngicas y microfotografía de los aislamientos fúngicos que presentaron toxicidad letal

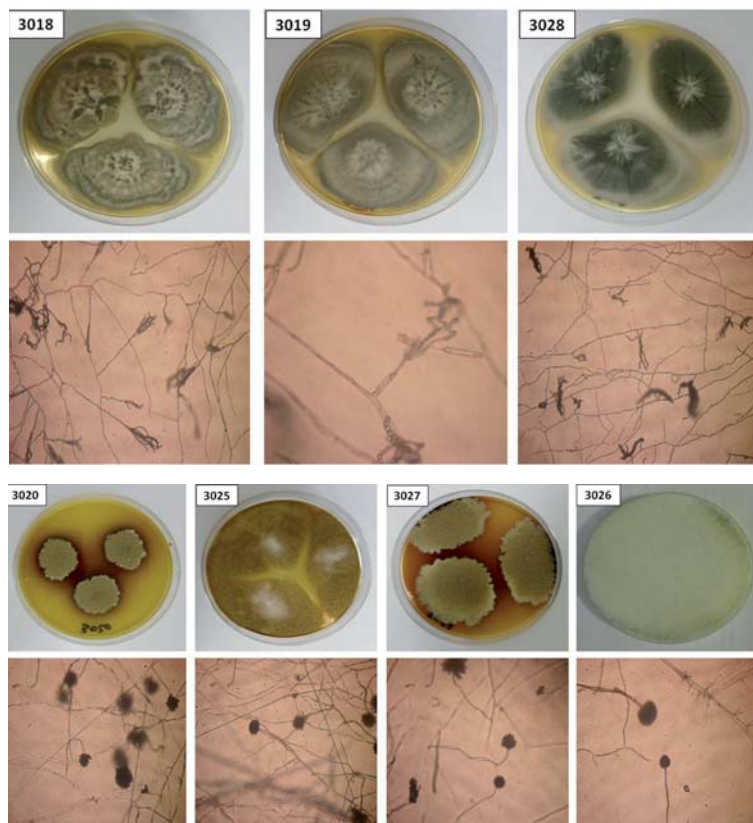


FIGURA 4a- Curva dosis respuesta de toxicidad letal de los extractos de hongos sobre *C. elegans* expuestos 24 horas

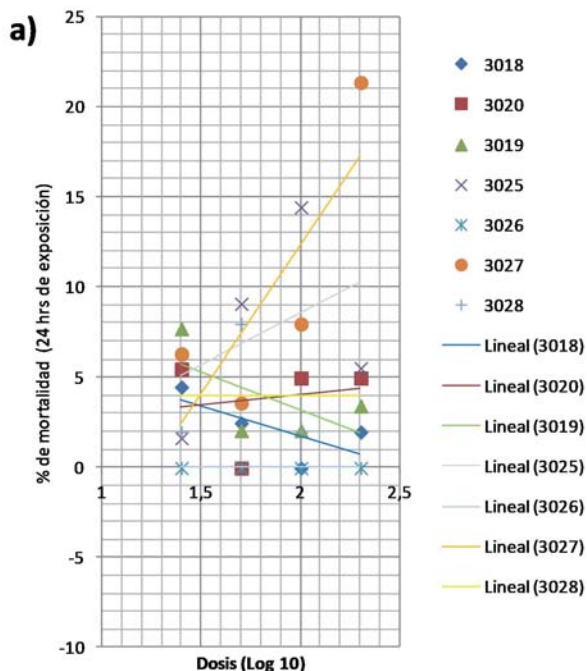
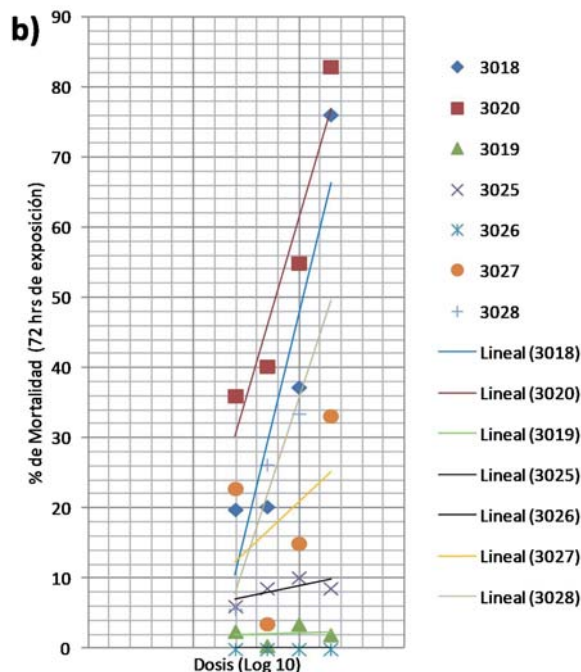


FIGURA 4b- Curva dosis respuesta de toxicidad letal de los extractos de hongos sobre *C. elegans* expuestos 72 horas.



CENTRO ENOLÓGICO RIVADAVIA S.A.

COMERCIALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN ARGENTINA Y LATINOAMÉRICA DE PRODUCTOS QUÍMICOS PARA LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

■ **MENDOZA**
Tels.: 54 (0261) 4932626 / 2666 / 2502 - mendoza@centro-enologico.com
Maza Norte 3237 Gutiérrez (5511) Maipú, Mendoza.

● CERSA atiende directamente las siguientes zonas en Argentina:
Neuquén, San Luis, San Juan, La Rioja, Salta, Tucumán, Catamarca y Jujuy.

DEXTROGUM Y LEVOGUM
GOMAS ARÁBIGAS

VINTAGE
• Bisulfito de Amonio
• Bisulfito de Potasio

ACIDIFICANTES
• Acido Cítrico
• Carbono Activado
• Carbonato e H. de Potasio
• Metabisulfito de Potasio
• Metabisulfito de Sodio
• Sorbato de Potasio

CALIDAD DE PRODUCTO, SERVICIO, SEGURIDAD Y EXPERIENCIA

WWW.CENTROENOLOGICO.COM.AR

FIGURA 5 - Efecto de los distintos extractos de hongos sobre la eclosión de huevos del *C. elegans*.

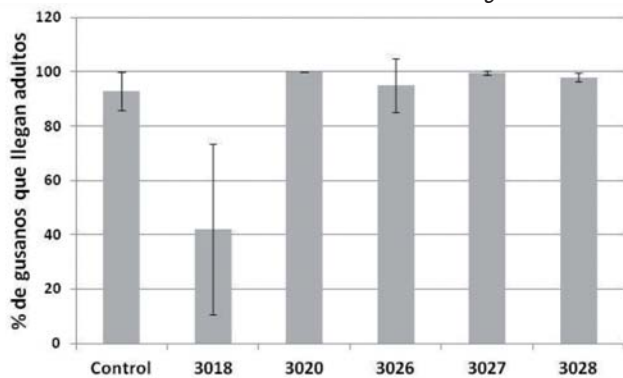
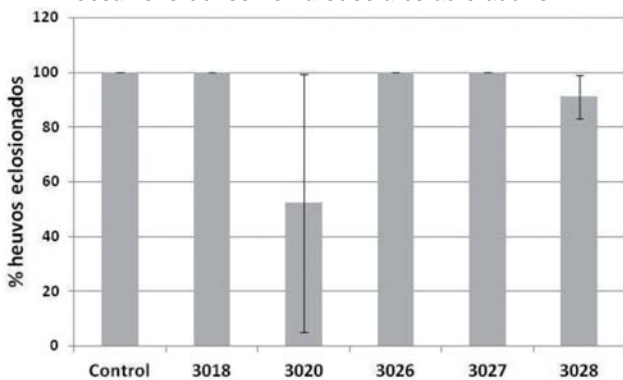


FIGURA 6 - Efecto de los extractos de hongos en el desarrollo de los nematodos a estadio adulto



mostraron una reducción significativa del 44% y del 8% en la eclosión de huevos con respecto al control (Figura 5). Del total de huevos eclosionados, sólo el extracto Pen-3018 presentó una inhibición significativa de 38% de gusanos que llegan a adultos (Figura 6). Los efectos sobre la reproducción fueron observados por una reducción significativa sobre la postura de huevos de un 69% en Asp-3020, 68% en Muc-3026 y 24% en Pen-3028 (Figura 7).

Los efectos sobre el crecimiento de los nematodos fueron evidenciados en una reducción significativa de 18% en la longitud del gusano adulto por los extractos Pen-3018 y del 13% por Muc-3026, respectivamente (Figura 8).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El modelo de *C. elegans* para estudiar la toxicidad de hongos contaminantes de alimentos permitió evidenciar efectos de toxicidad letal, sobre el desarrollo y reproducción de ese organismo. Los resultados obtenidos muestran que el 50% de los hongos aislados de los alimentos presentaron efectos tóxicos sobre *C. elegans*. Los hongos aislados pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y a un representante dentro de los Mucorales.



35 AÑOS DE CALIDAD

BIOTEC
Tecnología en alimentos



Lavalle 1125 (1048) Buenos Aires, Argentina Tel: +(5411) 4382-8332 biotec@biotecsca.com.ar www.biotecsca.com.ar

FIGURA 7 - Efecto de los extractos sobre la reproducción de los nematodos

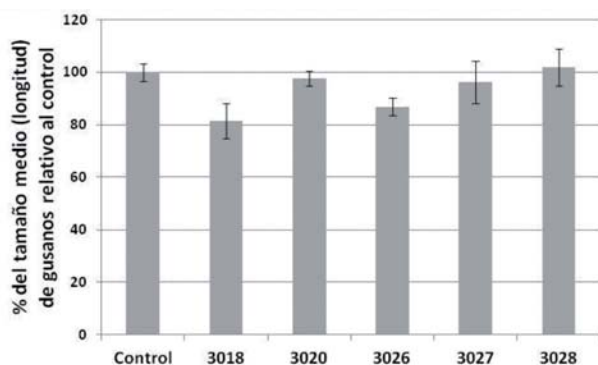
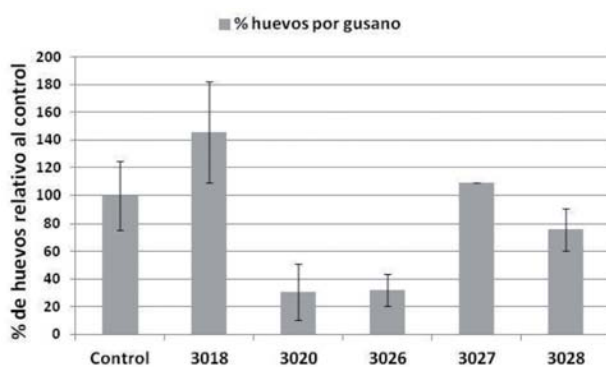


FIGURA 8 - Efecto de los extractos de hongos sobre el crecimiento de los nematodos



Los efectos de toxicidad aguda fueron observados en todos los aislamientos de *Aspergillus* y *Penicillium*, mientras que los efectos crónicos sólo en algunos de ellos.

Los efectos tóxicos observados en los aislamientos de estos géneros podrían relacionarse a la producción de micotoxinas que deberán comprobarse en un estudio posterior.

Se observaron efectos de toxicidad crónica por un extracto de un Mucoral. Este es un hallazgo novedoso debido a los escasos estudios de toxicidad sobre este grupo de hongos. Un trabajo previo reportó que algunas especies de Mucorales presentaron toxicidad sobre el crustáceo *Artemia* o las plántulas de arveja y tabaco (Reiss, 1993). Recientemente se ha puesto atención en la inocuidad de algunos Mucorales empleados en la elaboración de alimentos que albergan bacterias endosimbióticas, como *Burkholderia*, con capacidad patogénica y de producción de toxinas (Dolatabadi y col., 2016). Estos hallazgos junto a los resultados de este trabajo ponen en evidencia la necesidad de realizar un estudio más exhaustivo del potencial toxigénico de los hongos Mucorales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alshannaq, A., & Yu, J. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6): 1-20.
- Almudena, A. & Lizaso, J. (2001). *Hongos y Micotoxinas*. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid (pp. 1-3).
- Antoshechkin, I. & Stenberg P.W. (2007). The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat. Rev. Genet.* 8: 518 - 532.
- Dolatabadi, S., Scherlach, K., Figge, M., Hertweck, C., Dijksterhuis, J., Menken, S. B. J., & de Hoog, G. S. (2016). Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue? *Fungal Biology*, 120(3): 393-401.
- Ferratto, J; Firpo, I; Ortiz, M; Rotondo, R. & Beltran, C. (2012). Pérdidas poscosecha de hortalizas en negocios minoristas, con distintos sistemas de manejo, en Rosario, Santa Fe, Argentina. *Horticultura Argentina*, 31(75): 21-27.
- Hunt, P.R. (2016). The *C.elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37: 50-59.
- Kamath, R.S.; Fraser, A.G.; Dong, Y.; Poulin, G.; Durbin, R.; Gotta, M.; Kanapin, A.; Le Bot, N.; Moreno, S.; Sohrmann, M.; Welchmann, D.P.; Zipperlen, P. & Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421: 231-237.
- Reiss, J. (1993). Biotoxic activity in the mucorales. *Mycopathologia*, 121(2): 123-127.
- Romero Fernández, W.; Batista Castro, Z.; De Lucca, M.; Ruano, A.; García Barceló, M.; Rivera Cervantes, M.; García Rodríguez, J. & Sánchez Mateos, S. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(2): 288-299.
- Stoev, S. D. (2016). Food security and foodborne mycotoxins, risk assessment, preventive measures, and underestimated hazard of masked mycotoxins or joint mycotoxin interaction. *Food toxicology* (pp. 169-199).
- Trigos, A; Ramírez, K. y Salinas, A. (2008). Presencia de hongos filamentosos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*, 28: 125-129.
- Wa•kiewicz, A., & Golinski, P. (2015). Mycotoxins in cereals and cereal products: Occurrence, toxicity and prevention. *Mycotoxins: Occurrence, toxicology and management strategies* (pp.97-133).

CONTROL DE PLAGAS EN LA INDUSTRIA

Dir. Tec. Ing. Agr. Gustavo Iván Adamec

Manejo Integrado de Plagas (MIP)
para la Industria Alimenticia y/o Farmacéutica.

HABILITACIONES: Municipales, Provinciales y Nacionales

SERVICIOS AMBIENTALES BUENOS AIRES S.R.L.
La Roche 839 - Morón (1708) Buenos Aires.

Tel. 4627-1313
info@fumigadorasaba.com.ar

www.fumigadorasaba.com.ar