

Detección de la producción de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de yerba mate compuesta

María Lorena Castrillo

Gladis Jerke

Marta Aurelia Horianski

Laboratorio de Microbiología, Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN) Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Posadas (C.P.3300), Misiones, Argentina

Detection of ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from composed yerba mate

Abstract. Ochratoxin A (OTA) is an teratogenic, immunosuppressor, nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin produced by the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. Recent studies demonstrated that *Aspergillus* section *Nigri* are important producers of this toxin and are part of microbiota found in several foods. The objective of the present work were to investigate genus *Aspergillus* incidence in composed yerba mate and to determine ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains. Were isolated 2072 *Aspergillus* strains from 41 samples of composed yerba mate, of the total 1635 belonging to *Nigri* section. For detection ochratoxin A production, the strains were cultivated in Czapeck yeast extract agar, at 25 °C for 7 days and the toxin was detected by thin layer chromatography under UV light. From the 1635 strains we studied, to corresponded 40% to *A. japonicus* var. *japonicus*, 28% *A. japonicus* var. *aculeatus*, 16% *A. niger* var. *niger*, 12% *A. foetidus*, 2% *A. carbonarius* and 2% *A. niger* var. *awamori*. Less than 1% of the strains showed ochratoxin A production *in vitro*, being the specie unique OTA production *A. japonicus* var. *aculeatus*.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, filamentous fungi, moulds, mycotoxins

Resumen. Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica, inmunosupresora, teratogénica y potencialmente cancerígena producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Los miembros de *Aspergillus* sección *Nigri* son importantes productores de OTA y forman parte de la microbiota de diversos alimentos. El objetivo del presente trabajo fue investigar la incidencia del género *Aspergillus* en yerba mate compuesta y determinar la capacidad ocratoxigénica de especies de *Aspergillus* sección *Nigri*. Se aislaron 2072 cepas de *Aspergillus* a partir de 41 muestras de yerba mate compuesta, de las cuales 1635 pertenecieron a la sección *Nigri*. Para la detección de la capacidad ocratoxigénica, las cepas se cultivaron en agar Czapeck extracto de levadura a 25 °C por 7 días y la toxina se detectó mediante cromatografía en capa delgada, bajo luz UV. De las 1635 cepas estudiadas, 40% correspondieron a *A. japonicus* var. *japonicus*, 28% a *A. japonicus* var. *aculeatus*, 16% a *A. niger* var. *niger*, 12% a *A. foetidus*, 2% a *A. carbonarius* y 2% a *A. niger* var. *awamori*. Menos del 1% de las cepas mostraron capacidad ocratoxigenica *in vitro*, siendo *A. japonicus* var. *aculeatus* la única especie productora de OTA.

Palabras clave: *Ilex paraguariensis*, hongos filamentosos, mohos, micotoxinas.

Received 22 November 2012; accepted 1 December 2013.

Recibido 22 de noviembre 2012; aceptado 1 de diciembre de 2013.

*Autor para correspondencia: Ma. Lorena Castrillo
mlc_827@hotmail.com*

Introducción

La yerba mate, *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire, es una planta que crece en forma silvestre en el norte de Argentina y Paraguay, a partir de la cual se obtiene la yerba mate elaborada. Con este producto se prepara el mate, una bebida popular en América del Sur y ampliamente consumida en Europa y Estados Unidos (De Bernardi, 2001). Sus principios activos se encuentran en las hojas, por lo que se realiza una cosecha en forma de poda, que no perjudica al árbol. Sus propiedades terapéuticas y nutritivas no dependen de un solo principio activo, sino de todo un complejo, entre los que se destacan su contenido en polifenoles, catequinas, vitamina C, vitaminas del complejo B y minerales, entre otros. Investigaciones científicas señalan que la yerba mate posee propiedades antioxidantes, diuréticas y es considerado un laxante natural. En la yerba mate, el contenido de cafeína actúa como un estimulante que favorece el trabajo intelectual y disminuye la fatiga mental y física (Parra, 2005).

El consumo de yerba mate forma parte de la cultura popular de países del Mercosur, siendo ingerida diariamente por la población adulta e infantil en sus variadas formas: mate caliente, mate cocido o mate frío (tereré). También se emplea en la elaboración de cosméticos, por sus propiedades antioxidantes (De Paula y Chociai, 2000), o como ingrediente en bebidas energizantes (Schmalko, 2005).

En los últimos años, los empresarios e industriales del sector han comenzado a ofrecer diversas presentaciones comerciales de la yerba mate, como son: la yerba mate elaborada, yerba mate compuesta, yerba mate soluble, yerba mate en saquitos y yerba mate saborizada, con la finalidad de brindar productos con mayor variedad de sabores y amplios beneficios para la salud (Parra, 2006). La yerba mate compuesta (YMC) es un producto derivado de la yerba mate elaborada, con el agregado de hierbas sápidas-aromáticas, entre un 2 y 40%, que le confieren un sabor diferente al mate

tradicional (CAA, 2000).

Actualmente se observa un incremento en el consumo de YMC debido a que puede contener hierbas con propiedades organolépticas (saborizantes y aromatizantes), medicinales (digestivas, tranquilizantes y diuréticas) y estéticas (adelgazantes).

Las principales fuentes de contaminación de la yerba mate y de las hierbas agregadas son el suelo y el aire. La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de estos productos (Jay, 1994). Los alimentos deshidratados o secados como yerba mate, no suelen ser estériles; sin embargo, debido a su baja actividad de agua, pueden permanecer estables microbiológicamente durante mucho tiempo y sólo cuando se humedecen puede comenzar la alteración (Frazier y Westhoff, 1993).

El proceso de elaboración industrial de yerba mate es estrictamente controlado, con el fin de generar un producto adecuado para el consumo, con baja carga microbiana. Sin embargo, los intervalos de humedad, temperatura e higiene pueden variar, generando condiciones favorables para la proliferación de hongos y bacterias contaminantes; los cuales pueden modificar su calidad bromatológica, microbiológica y comercial. Así mismo, las hierbas empleadas en la preparación de YMC, no pueden ser expuestas a tratamientos térmicos o químicos drásticos, porque perderían sus propiedades medicinales, organolépticas y aromáticas por las que son empleadas; por lo que podrían presentar una alta carga microbiana (Jerke *et al.*, 2006).

Las micotoxinas son productos del metabolismo secundario de algunas especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*; que pueden causar a los animales, incluyendo el hombre, alteraciones biológicas perjudiciales para la salud. Estos metabolitos son químicamente diversos y pueden estar contenidos en el micelio, en el interior de las esporas o ser liberados en el alimento (Edwards *et al.*, 2002; Mantle, 2002). Estos

metabolitos secundarios son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones subóptimas o de estrés (Swanson, 1987). Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de los parámetros nutricionales y ambientales, sino también de la historia del desarrollo del moho. La formación de micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica (Adams y Moss, 1991). En la Tabla 1 se presentan los principales géneros de hongos micotoxigénicos y las micotoxinas que producen (Patel, 2004).

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica, inmunosupresora, teratogénica y potencialmente cancerígena producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Ha sido clasificada por la Association for Research in Cancer (IARC, 2006) como un posible carcinógeno humano (grupo 2B), debido a la suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales, si bien los datos en el hombre no son concluyentes. En su estructura posee una molécula de cloro, responsable del carácter tóxico. Además es termoestable y soluble en agua, razón por la que podría ser ingerida con el mate o tereré, que son las formas habituales de consumo de la YMC. La enfermedad producida por OTA, se presenta luego de una ingesta crónica de alimentos o bebidas conteniendo concentraciones muy

pequeñas de la misma.

Desde su descubrimiento en 1965, la producción de esta micotoxina se asociaba clásicamente a *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum* (Hesseltine *et al.*, 1972). No obstante, la incidencia y distribución habitual de estas especies no permitían explicar la elevada presencia de OTA en una gran variedad de alimentos destinados al consumo humano y animal, por lo que se pensó que otras especies fúngicas podían estar también implicadas. Estudios recientes demostraron que *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri* son importantes productores de dicha toxina y forman parte de la micota de diversos alimentos (Franco, 2005).

En estudios previos se ha encontrado que los hongos contaminantes más frecuentes de yerba mate elaborada pertenecen a *Aspergillus* sección *Nigri* (Jerke *et al.*, 2006; Jerke *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que los *Aspergillus* negros se consideran fuente de OTA en climas tropicales y subtropicales y que se han encontrado residuos de OTA en el suero de numerosos individuos sin poder precisar el origen (Kuiper-Goodman y Scott, 1989; Creppy, 1999; Peraica *et al.*, 1999; Petzinger y Weidenbach, 2002), actualmente estamos enfocados en la búsqueda de mohos con capacidad de producción de ocratoxina A *in vitro* en muestras de YMC.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue investigar la incidencia del género *Aspergillus* en yerba mate compuesta y determinar la capacidad ocratoxigénica de especies de *Aspergillus* sección *Nigri*.

Tabla 1. Principales géneros fúngicos y las micotoxinas que producen

Género	Micotoxinas
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina B ₁ B ₂ G ₁ G ₂ ; Ocratoxina A; Patulina; Ácido ciclopiazónico.
<i>Fusarium</i>	Toxina T ₂ ; Deoxynivalenol, DON; Zearalenona; Fumonisinina B ₁
<i>Penicillium</i>	Ocratoxina A, Citrinina Ácido ciclopiazónico.

Fuente: Patel (2004).

Materiales y métodos

Se evaluaron 41 muestras de yerba mate compuesta (YMC) obtenidas de comercios céntricos y periféricos de la ciudad de Posadas, Provincia de Misiones, Argentina. Para su estudio, las muestras se clasificaron en dos grupos teniendo en cuenta el porcentaje de hierbas adicionales, teniendo como límite

15%. De las 41 muestras, 20 contenían un porcentaje inferior al 15% de hierbas adicionadas (<15%), y 21 un porcentaje mayor a 15% (>15%). Las muestras fueron sembradas en medio de cultivo hongos y levaduras con cloranfenicol, registrándose el total de mohos contaminantes presentes y seleccionándose las cepas con características macro y micromorfológicas correspondientes al género *Aspergillus*.

Las cepas se clasificaron empleando la clave de Klich (2002), que se basa principalmente en características morfológicas, tales como forma y ornamentaciones conidiales, tamaño de los conidios, estructura de los conidióforos, coloración de las colonias, entre otras. Cada cepa fue sembrada en tres medios de cultivos diferentes: agar Czapeck extracto de levadura, CYA; agar extracto de malta, MEA y agar Czapeck extracto de levadura con 20% de sucrosa, CY20S. Se determinó el porcentaje de incidencia del género *Aspergillus* sobre el total de muestras analizadas (PIGA = N° de muestras contaminadas con el género *Aspergillus* / N° total de muestras analizadas) y el porcentaje de incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri*, (PIGAN = N° de muestras contaminadas con *Aspergillus* sección *Nigri* / N° total de muestras analizadas). Del total de cepas aisladas se determinó la incidencia relativa porcentual del género *Aspergillus* (IRPA = N° de cepas del género *Aspergillus* / N° total de cepas contaminantes) y la incidencia relativa porcentual de *Aspergillus* sección *Nigri* (IRPAN = N° de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* / N° total de cepas contaminantes).

Para la detección de la producción de OTA *in vitro*, cada cepa se cultivó en CYA y se incubó en oscuridad a 25°C por 7 días. Se efectuó la extracción de todo el medio de cultivo con cloroformo con agitación a 250 rpm durante 90 min. El extracto se filtró, se evaporó en estufa a 50°C y se resuspendió en 1 mL de cloroformo:eter:ácido acético (17:3:1). Se sembró en una placa cromatográfica de sílica gel 60 con: a) 10 µL del extracto de cada cepa analizada, b) 10 µL de la cepa patrón y c) 2, 4 y 6 µL del estándar de ocratoxina A, (SIGMA 01877 –

Img, Ochratoxin A from *Aspergillus ochraceus*). Se utilizó como solvente de corrida cloroformo:eter:ácido acético (17:3:1). La OTA fue identificada bajo luz UV a 366 nm como una mancha fluorescente verde azulada con la misma movilidad del estándar de OTA. Como confirmación, las manchas se expusieron a vapores de amoníaco, ya que en presencia de OTA la fluorescencia verde azulada vira a azul brillante.

Resultados

En las muestras con un contenido <15% de hierbas adicionadas la incidencia del género *Aspergillus*, PIGA, fue del 81% y la incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri*, PIGAN, del 71%. En las muestras con un adicionado >15% de hierbas, se obtuvieron valores de PIGA de 90% y de PIGAN de 80%.

De las 41 muestras de yerba mate compuesta analizadas, se aislaron un total de 5237 cepas de mohos contaminantes, de las cuales 2072 cepas pertenecieron al género *Aspergillus*. Las muestras con un contenido <15% de hierbas adicionadas, presentaron un IRPA de 42% aislándose un total de 907 cepas pertenecientes al género, de las cuales 78.5% correspondieron a *Aspergillus* sección *Nigri* (valor IRPAN), 11.3% fueron cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* y 10.2% otras especies como *A. fumigatus*, *A. ustus*, *A. niveus*, entre otras. En las muestras con un contenido >15% de hierbas adicionadas, se observó un IRPA de 37.85% y se aislaron un total de 1165 cepas pertenecientes al género *Aspergillus*, de las cuales 79.35% correspondieron a *Aspergillus* sección *Nigri* (valor IRPAN), 15.65% fueron cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, y 5% otras especies como *A. fumigatus*, *A. ustus*, *A. niveus*, entre otras.

En ambos grupos se observó una representatividad del género *Aspergillus* sección *Nigri*, aislándose un total de 1635 cepas: 711 provenientes de las muestras con un contenido de hierbas (<15%) y 924 de yerba mate compuesta

con un porcentaje de hierbas adicionadas (>15%). Los cultivos fueron identificados a nivel de especie, obteniéndose 654 cepas de *A. japonicus* var. *japonicus* (40%), 458 de *A. japonicus* var. *aculeatus* (28%), 261 de *A. niger* var. *niger* (16%), 198 de *A. foetidus* (12%), 32 de *A. carbonarius* (2%) y 32 correspondientes a *A. niger* var. *awamori* (2%).

Para la detección de la capacidad de producción de OTA *in vitro*, se trabajó con todas las cepas aisladas de *Aspergillus* sección *Nigri*, y una cepa patrón con conocida capacidad de producción de OTA (*A. carbonarius* JFPE 1546). De las 1635 cultivos estudiados, sólo 12 cepas de *A. japonicus* var. *aculeatus*, aisladas de una muestra de YMC con un contenido de hierbas >15%, mostraron positiva capacidad ocratoxigénica, bajo el límite de detección del método empleado. Estos resultados arrojan una incidencia de cepas ocratoxigénicas del 2.5% considerando solamente los *A. japonicus* var. *aculeatus*, y del 0.75% si se considera el total de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* analizadas.

Discusión

En estudios micológicos previos en yerba mate elaborada (Jerke *et al.*, 2007), y en sustratos similares como té negro (Jerke, 2010), se ha observado una gran incidencia de organismos micotoxigénicos, como los mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que contaminan estos sustratos y han mostrado capacidad de biosintetizar aflatoxinas *in vitro* (Jerke *et al.*, 2006). Los resultados del presente estudio confirman la presencia en YMC de uno de los principales géneros micotoxigénicos, *Aspergillus*, con varias especies representadas y un importante porcentaje de cepas pertenecientes a la sección *Nigri*. En estudios previos, los hongos integrantes de esta sección han sido considerados los principales responsables del deterioro de alimentos, ya que pueden crecer en diferentes ambientes, siendo especialmente abundantes en zonas tropicales y subtropicales, y además

poseen la capacidad de crecer en una gran variedad de sustratos como semillas, granos, forrajes, verduras, frutas, piensos, entre otros (Domsch *et al.*, 1980; Pitt y Hocking, 1997).

Las cepas ocratoxigénicas fueron aisladas de una sola muestra de YMC con un contenido >15% de hierbas adicionadas. Debido a que en estudios realizados en yerba mate elaborada y yerba mate canchada no se ha detectado ninguna cepa productora de OTA *in vitro* (Castrillo, 2010), posiblemente en YMC las cepas ocratoxigénicas provengan de las hierbas agregadas.

El hallazgo de hongos toxigénicos en un sustrato no implica necesariamente la presencia de micotoxinas en ellos. La producción de una micotoxina depende no sólo del genotipo de la cepa, sino también de toda una serie de factores ambientales que van a ejercer su influencia en el crecimiento y metabolismo de la cepa. Pero, indudablemente, su presencia en el sustrato debe ser motivo de alerta de un peligro potencial. Por tanto, es muy importante conocer la distribución de los hongos capaces de producirlas y las circunstancias que inciden en su capacidad toxigénica (Abarca *et al.*, 2001; Franco, 2005).

Hasta el presente, no se tiene reglamentado en Argentina los límites microbiológicos para la yerba mate compuesta. Los resultados obtenidos resaltan la importancia de realizar controles microbiológicos de rutina en la yerba mate compuesta, así como de revisar las normas argentinas existentes, para proponer valores de referencias microbiológicos para esta infusión. Además, es necesario evaluar procesos que reduzcan la población microbiana en las hierbas sápidas aromáticas empleadas en la elaboración de YMC.

Literatura citada

- Abarca, M.L., F. Accensi, M.R. Bragulat, F.J. Cabañes, 2001. Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* sp. *Journal of Food Protection* 64:903-906.
- Adams, M.R., M.O. Moss, 1997. *Microbiología de los alimentos*. T.R.S.O. Chemistry, Acribia S.A., Zaragoza.
- CAA, 2000. Código Alimentario Argentino. Art. 1194-1198. La Rocca, Buenos Aires.
- Castrillo, M.L., 2010. Caracterización morfológica y confirmación molecular de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de yerba mate (*Ilex paraguarensis*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, Posadas.
- Creppy, E.E., 1999. Human ochratoxicosis. *Journal of Toxicology-Toxin Review* 18:277-293.
- Domsch, K.H., W. Gams, T.H. Anderson, 1980. *Compendium of soil fungi*. Academic Press, Londres.
- De Bernardi, L.A., 2001. Cadena alimentaria de la yerba mate: diagnóstico de la región yerbatera. <http://www.biomanantial.com/yerba-mate-argentina-a-905-es.html>
- De Paula, M.L., J.G. Chociai, 2000. Uso e aplicacao industrial da Erva-Mate em cosméticos. Productos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da Erva-Mate. Proyecto plataforma tecnológica da Erva-Mate do Paraná, Curitiba.
- Edwards, S.G., J. O. Callaghan, A.D.W. Dobson, 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106:1005-1025.
- Esteban, F., 2005. *Aspergillus* sección *Nigri*, estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxigénicas. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Frazier, W.C., D.C. Westhoff, 1993. Principios generales en los que se basa la alteración de los alimentos: modificaciones químicas provocadas por microorganismos. *Microbiología de los Alimentos*, Acribia S.A., Zaragoza.
- Hesseltine, C.W., E.E. Vandegrift, D.I. Fennell, M.I. Smith, O.L. Shotwell, 1972. *Aspergillus* as ochratoxin producer. *Mycologia* 64:539-550.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 2006. <http://www.iarc.fr>
- Jay, J.M., 1994. Incidencia y tipos de microorganismos presentes en los alimentos. *Microbiología Moderna de los Alimentos*, Acribia S.A., Zaragoza.
- Jerke, G., M.A. Horianski, S. Bargardi, 2006. Evaluación micológica de yerba mate compuesta. 4º Congreso Sudamericano de la Yerba Mate, 4º reunión Técnica de la Yerba Mate y 2º exposición de Agronegocios de la Yerba Mate, Posadas, Misiones, Argentina.
- Jerke, G., 2010. Impacto de buenas prácticas de manufactura en la calidad microbiológica del té negro. Tesis Doctoral, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, Santa Clara.
- Jerke, G., M.L. Martínez, M.A. Horianski, S. Bargardi, 2007. Caracterización de *Aspergillus* sp. en yerba mate tradicional. VI Jornadas científico Tecnológicas Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Posadas, Misiones, Septiembre 22-25, p. 35-38.
- Jerke, G., M.A. Horianski, K.A. Salvatierra, 2010. Evaluación de géneros micotoxigénicos en yerba mate elaborada. *Revista de Ciencia y Tecnología* 11:12-18.
- Klich, M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht.
- Kuiper-Goodman, T., P.M. Scott, 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences* 2:179-248.
- Mantle, P.G., 2002. Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration e Biodegradation* 50:143-146.
- Parra, P., 2006. Cadena alimentaria de la Yerba Mate. Diagnóstico de la región yerbatera. En <http://agris.fao.org/agris/search/search/display.do?f=2007%2FAR%2FAR0601.xml%3BAR2006000052>.
- Patel, P., 2004. Mycotoxins analysis: current and emerging Technologies. *Mycotoxins in food: Detection and control*, Editorial Woodhead Publishing Limited.
- Pitt, J.I., A.D. Hocking, 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, Londres.
- Peraica, M., B. Radie, A. Lucie, M. Pavlovic, 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *World Health Organization* 77:754-766.
- Petzinger, E., A. Weidenbach, 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Sciences* 76:245-250.
- Schmalko, M.E., 2005. Estudio y Modelado del procesamiento primario de la yerba mate. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Swanson, B.G., 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae* 207:49-61.