

FRECUENCIA DE HONGOS ANEMÓFILOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS EN ALGUNOS MERCADOS DE LIMA. DETECCIÓN DE PATULINA EN MANZANAS EN DESCOMPOSICIÓN

Soriano, Marcela; Bejar, Vilma; Bonilla, Pablo

- Departamento de Micología. Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "J. DG". Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Agradecimiento: A la doctora Bertha Pareja por su apoyo y consejos.

SUMMARY

In the present investigation we have studied some fungae which produce Mycotoxins. The samples were obtained from markets in the city of Lima during the summer, autumn and spring of 1999. The method used was the exposition of the samples in agar-potatoe-dextrose and cloranfenicol media. We were able to isolate eleven varieties of fungae which produce mycotoxins such as *Penicillium*, *Aspergillus Fusarium*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Paecylomices*, *Phytomices*, *Stachybotris*, *Trichoderma*, *Trichotecium* (Fig. 1, 2, 3). The most frequent ones were the ones of *Penicillium* gender, which were observed in the following markets: Huamantanga, Puente de Piedra, Comas, La Victoria y San Luis (Mercado de fruta) In these we got 36 rotten apples in each one of them. The mycotoxin Patulin was identified qualitatively by thin layer chromatography. Besides, we analyzed six samples of apple juice in two of which we observed a positive reaction to the investigation of Patulin. For these assays we used as standard Patulin from Sigma laboratory.

Key Words: Mycotoxin, Penicillium, Patulin.

RESUMEN

Se ha investigado la frecuencia de hongos productores de micotoxinas en diecisiete mercados de Lima el estudio fue realizado durante el Verano, el Otoño y la Primavera de 1999. El método empleado fue de exposiciones al medio ambiente en placas con Agar Papa y Dextrosa con Cloranfenicol. Se aislaron once géneros de hongos productores de micotoxinas: *Penicillium*, *Aspergillus Fusarium*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Paecylomices*, *Phytomices*, *Stachybotris*, *Trichoderma*, *Trichotecium* (Fig. 1, 2, 3). La mayor frecuencia del género *Penicillium* fue observada en los mercados de Huamantanga - Puente Piedra, Mercadillo de Comas, Mercado Municipal de la Victoria y el Mercado de Frutas de San Luis. En estos mercados se adquirieron en cada uno treinta y seis manzanas en descomposición las que fueron analizadas cualitativamente por cromatografía en capa fina para la detección de micotoxina Patulina, los resultados mostraron tres muestras francamente positivas a Patulina y otros con trazas de Patulina. Además, se analizaron seis muestras de jugo de manzana industrializado encontrándose dos con trazas de Patulina y cuatro muestras negativas a Patulina. Se empleó como patrón la Patulina de los laboratorios Sigma.

Palabras claves: Mycotoxin, Penicillium, Patulina

INTRODUCCIÓN

La manzana es una de las frutas de mayor consumo en nuestro país, sus propiedades nutritivas son bien conocidas, su composición ha sido ampliamente estudiada y se la recomienda por su alto contenido de Fe, P, Ac. Ascórbico, sales minerales y elementos trazas que les dan características nutritivas muy especiales. Entre las variedades de producción nacional se encuentran la Pachacamac, Delicious, Pero manzano, San Antonio, Winter y otras, además se consumen manzanas importadas de Chile, Argentina y los Estados Unidos.

Por lo general, los huertos se encuentran distribuidos en la costa y la sierra (típicas quebradas). El principal productor en el ámbito nacional se encuentra en el departamento de Lima seguido por Arequipa, Ica, Ancash, Tacna, Piura, Lambayeque, Ayacucho, Callao, Junín, Amazonas.

Entre las variedades introducidas hace 40 años, especialmente procedentes de Estados Unidos y Chile, se pueden mencionar las denominadas "Winter Banana", "Hoover", "Red Delicious", "Roja Española", "Granny Smith" etc que gozan en nuestro medio de gran preferencia y popularidad por sus especiales características organolépticas.

Después de la recolección en los huertos, las manzanas son almacenadas permitiendo así, asegurar una conservación relativamente prolongada. Esto se realiza al medio ambiente en ambientes a temperatura de 15 a 25°C con una humedad relativa 85% en cámaras de refrigeración a una temperatura de -1 a 4°C y humedad relativa 85 a 90%. En el primero de los casos, la fruta alcanza una sobre madurez acelerada, tornándose arenosa. En el segundo caso, se prolonga la vida

pero está sujeto a ciertos riesgos que pueden ser causados por un inadecuado control de la temperatura y la humedad relativa presentando magulladuras.

Cuando son llevadas a los mercados las manzanas, ya sean estas nacionales o importadas, sino reciben un almacenamiento correcto, pueden sufrir cambios en su estado físico, presentando magulladuras las cuales son propicias para iniciar un proceso infeccioso donde participa los hongos de almacén *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, sin embargo es de especial importancia la presencia del género *Penicillium* (Fig 5), el cual mediante la colonización de esporas en la manzana, origina la micotoxina Patulina.

GENERALIDADES

HONGOS ANEMÓFILOS:

Los hongos Anemófilos llamados también hongos atmosféricos, contaminan el medio ambiente bajo la forma de esporas, que son estructuras que les permiten reproducirse.

METABOLISMO

METABOLISMO PRIMARIO

Producción de energía.- Los azúcares o sus derivados se degradan inicialmente por una de las tres vías que en conjunto se denominan glucólisis y vía de Embden-Myerhof-Parnas (EMP), hexosa monofosfato (HMF), Etner-Doudoroff (ED).

METABOLISMO SECUNDARIO

Los intermediarios de las vías metabólicas primarias que no se utilizan para el crecimiento, se desvían hacia vías poco comunes, "Metabolismo de derivación" actualmente llamado "Metabolismo secundario". La mayoría de metabolitos secundarios son

derivados: acetil Co. A y ácidos grasos, ácido mevalónico, aminoácidos, azúcar, aminoácidos aromáticos, intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico, el producto de varios metabolitos.

MICOTOXINAS: Constituye un producto del metabolismo secundario, es una toxina producida por hongos que crecen sobre diferentes alimentos.

PATULINA:

Esta micotoxina se encuentra en los cereales utilizados en la alimentación animal y en diversas frutas, pero mayormente en **Manzanas** donde es más susceptible a la producción de dicha micotoxina ya que contiene azúcares: fructosa, glucosa, sacarosa constituyentes principales de la fuente de carbono necesaria para el desenvolvimiento del hongo así como

ácido málico importante para el aumento y estabilidad química de la Patulina. Esta micotoxina puede afectar a distintas variedades de manzana siempre y cuando encuentre la temperatura y humedad adecuada

Patulina es una micotoxina producida por varias especies de hongos del género *Penicillium* puede crecer en el rango de 12 a 55 °C y *Penicillium expansum* de 0 °C y producir Patulina 0 a 24 °C de esta manera contaminar a diversos alimentos. Entre otras especies tenemos: *Penicillium claviforme*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium divergens*, *Penicillium equinum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium lapidosum*, *Penicillium leucopus*, *Penicillium melinii*, *Penicillium novae-zelandiae*, *Penicillium patulum*, *Penicillium urticae*.

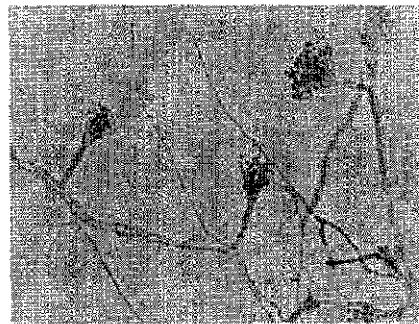
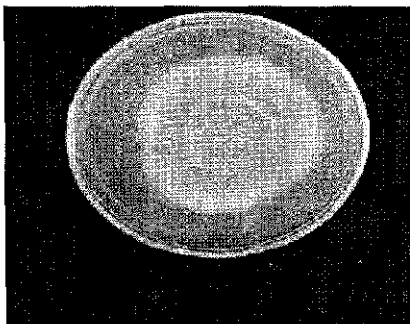


Fig. 1 *Aspergillus*

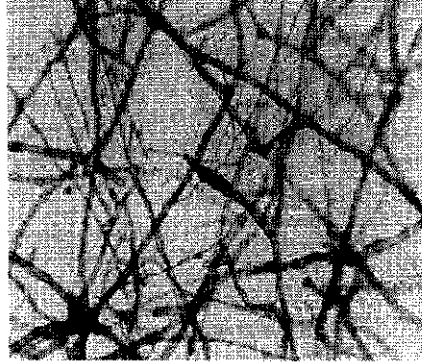
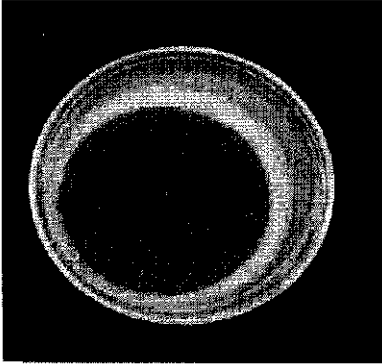


Fig. 2 *Alternaria*

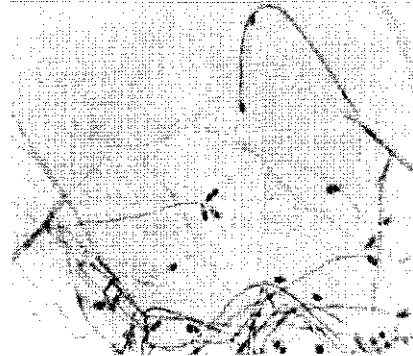
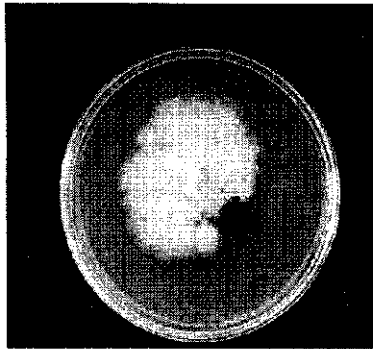


Fig. 3 *Trichotecium*

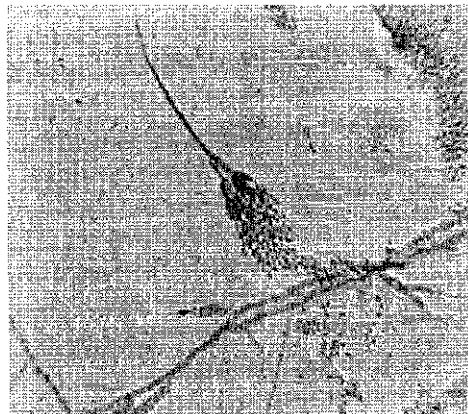
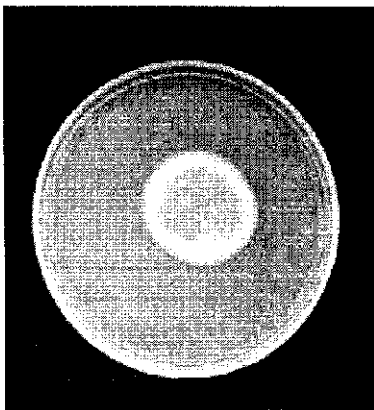


Fig. 5 *Penicillium*

Norstadt y Mcalla, señalan que se produce Patulina a una temperatura de 15-20 °C y 30-35 °C, otros autores como Bullerman Stott y Roland Beuchat indicaron que la temperatura ideal para su desarrollo es 20-25 °C.

Ciegler afirma que la Patulina no se encuentra en alimentos con alto contenido de proteínas como: el queso, la carne, la harina y la naranja, porque este mecanismo de reacción es complejo y comprende la adición del grupo sulfídrico al doble enlace del grupo lactona modificando su estructura química y poseyendo poca actividad biológica.

Los efectos ocasionados por la micotoxina Patulina pueden ser: Edema cerebral, Edema pulmonar con procesos hemorrágicos y daños capilares en el hígado.

Su posible actividad carcinogénica es debida: al doble enlace en la posición 4 de la molécula de lactona, este compuesto altera la síntesis de RNA, DNA y proteínas debido a la inhibición de la enzima: farnesil-proteína transferasa, lactato deshidrogenasa, RNA polimerasa y aldolasa muscular. Patulina inhibe la respiración aeróbica, afecta la permeabilidad de las membranas y reduce la actividad de la adenosina trifosfatasa.

Los límites tolerables de Patulina según la FDA son de 50 $\mu\text{g/L}$ en productos como jugos de fruta, Europa permite 25 $\mu\text{g/L}$, Reino Unido establece un límite de 50 ppb de Patulina, y la OMS/FAO establecen un consumo semanal tolerable de 7 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, FDA lo que permite una tolerancia de 0,4 $\mu\text{g/kg/día}$ de manera tentativa cuando es diariamente consumida, aunque no todos los autores están de acuerdo con estos límites.

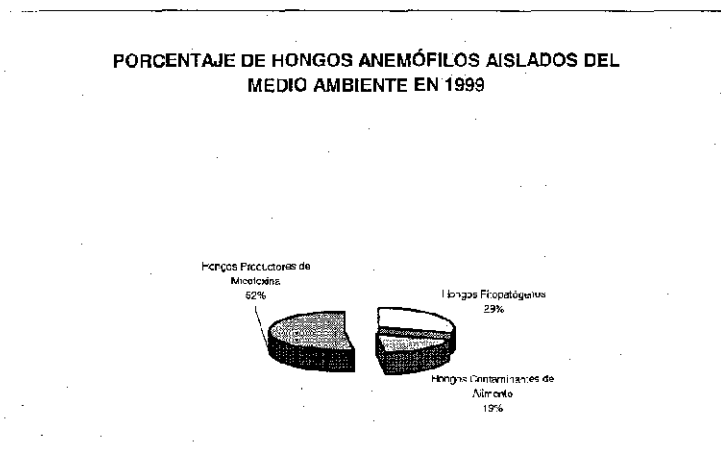


Fig. 6

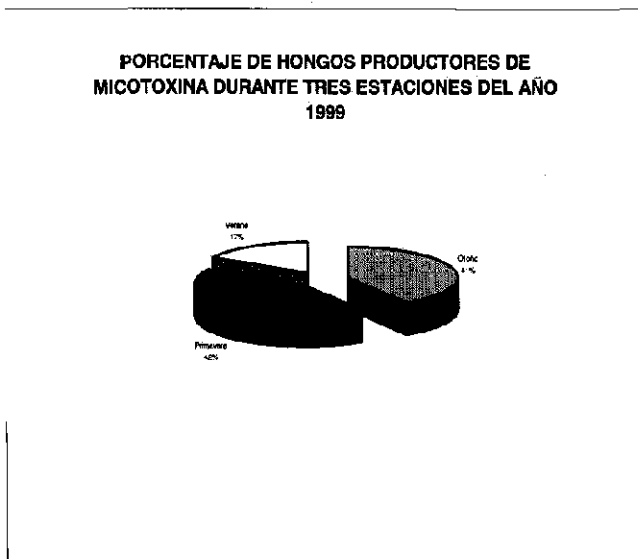


Fig. 7

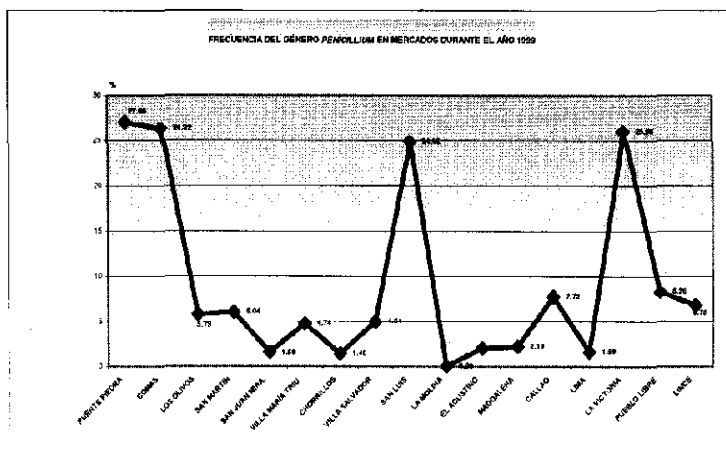


Fig. 8

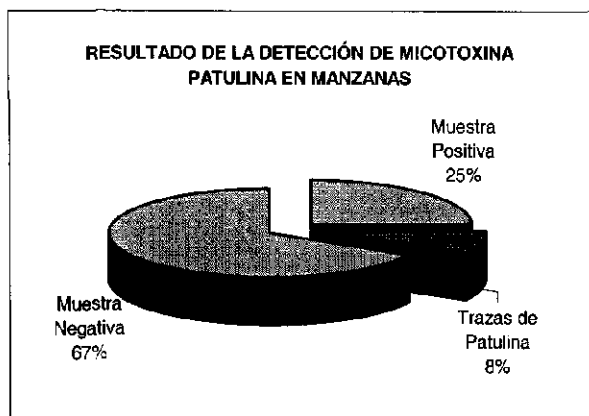


Fig. 9



Fig. 10

PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDIO MICOLÓGICO

MATERIAL Y MÉTODOS

Se eligieron 17 mercados en diferentes distritos, agrupados por zonas geográficas:

Para la recolección de los hongos del medio ambiente de los mercados se siguió la técnica de sedimentación en placa Petri. Se realizó un estudio macroscópico según las características físicas que presentaron así como: lisa, rugosa, celebriforme, algodonoso, y luego un estudio microscópico con Azul de lactofenol observándose con lentes de 10 \times y 40 \times de objetivo. Luego se realizó el aislamiento de hongos en tubos de ensayo estériles para realizar la identificación final por microcultivo.

ESTUDIO QUÍMICO

Reactivos: Acetato de etilo, acetona, Ácido acético, Benceno, Cloroformo, Metanol, Silica gel, Sulfato de sodio, Patulina std (Laboratorio Sigma), Revelador- 3 Methyl - 2 benzothiazoline hydrazone HCl (Laboratorio Sigma), Luz UV.

METODOLOGÍA:

Se adquirieron las manzanas en aquellos mercados que presentaron mayor

incidencia del género *Penicillium* (productor de micotoxina Patulina). Los mercados elegidos fueron: Mercadillo - Comas, Mercado de Huamantanga - Puente piedra, Mercado Municipal - La Victoria y Mercado de Frutas - San Luis.

La extracción se realizó utilizando acetato de etilo, agregándose Na₂ SO₄ a la extracción final, se filtró y concentró disolviéndose en cloroformo. Se realizó la identificación utilizando Cromatografía de capa fina preliminar siendo el sistema de solvente utilizado: Cloroformo y Metanol (9+1) y empleando como patrón el Std. Paulina (laboratorio Sigma) para la comprobación del resultado, luego las muestras fueron reveladas con 3 Cetil - 2 benzothiazoline hydrazone HCl (Laboratorio Sigma) y llevadas a la luz UV, observándose la presencia de Patulina como una mancha amarillo marrón en la muestra, al mismo nivel del standard, con un Rf: 0.5. Luego se realizó una Cromatografía preparativa y la muestra fue eluida con cloroformo + acetona. Para confirmar, se realiza una Cromatografía confirmatoria utilizando sistema de solventes: benceno, ácido acético y Metanol (18+1+1) se obtuvo un Rf: 0.35 al ser revelada.

RESULTADOS EXPOSICIONES AMBIENTALES EN MERCADOS

Se identificaron 52 géneros de hongos anemófilos, los cuales fueron divididos en tres grupos (Cuadro 1):

Hongos Productores de Micotoxinas	11 géneros
Hongos Contaminantes de Alimentos	11 géneros.
Hongos Fitopatógenos	30 géneros.

HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINA	HONGOS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS	HONGOS FITOPATÓGENOS	
<i>Alternaria.</i>	<i>Aurebasidium.</i>	<i>Cordana.</i>	<i>Oidiodendrom.</i>
<i>Aspergillus.</i>	<i>Candida.</i>	<i>Cylindrocladium.</i>	<i>Oedocephalum</i>
<i>Cephalosporium.</i>	<i>Circinella.</i>	<i>Crysosporium</i>	<i>Phoma.</i>
<i>Cladosporium.</i>	<i>Curvularia.</i>	<i>Drechslera.</i>	<i>Papulospora.</i>
<i>Fusarium.</i>	<i>Epiccocum.</i>	<i>Diheterospora.</i>	<i>Rhinocladiella</i>
<i>Paecilomyces.</i>	<i>Geotrichum.</i>	<i>Diplodia.</i>	<i>Sepedonium.</i>
<i>Penicillium.</i>	<i>Helminthosporium.</i>	<i>Gillmaniella</i>	<i>Scolebasidium.</i>
<i>Phomyces.</i>	<i>Mucor.</i>	<i>Gliomastix</i>	<i>Scopuratiopsis.</i>
<i>Trichotecium.</i>	<i>Nigrospora.</i>	<i>Gonatobotrium</i>	<i>Stemphylium.</i>
<i>Trichoderma.</i>	<i>Rhizopus.</i>	<i>Graphium</i>	<i>Torula.</i>
<i>Stachybotris.</i>	<i>Rhodotorula.</i>	<i>Hormodendrum</i>	<i>Torulomyces.</i>
		<i>Humicola.</i>	<i>Trichurus.</i>
		<i>Isaria.</i>	<i>Ulocladium.</i>
		<i>Mycelia steril</i>	<i>Verticillium.</i>
		<i>Papularia.</i>	<i>Volutella.</i>

DISCUSIÓN

El aislamiento de Hongos Anemófilos fue realizado durante el Verano, Otoño y Primavera, realizándose en tres horarios 7 am. 12 am. 5 pm. Debido a las variaciones climatológicas producidas durante el día como por las corrientes de aire, la lluvia, la variación de la iluminación y oscuridad, así también las

turbulencias, los cuales afectan a la dispersión de los hongos.

- El total de 3798 UFC de hongos anemófilos encontrados se dividieron en tres grupos, destacándose los siguientes por orden de frecuencia: la mayor cantidad encontrada: hongos productores de micotoxinas 1959 UFC(52%) seguido por hongos fitopatógenos 1097 UFC (29%) y

por los hongos contaminantes de alimentos 742 UFC (19%) (Fig.6).

- ◆ Los datos observados en las tres estaciones señalan mayor frecuencia de hongos productores de micotoxina durante la estación de Primavera 829 UFC (42%), cuando la intensidad del viento fue mayor y la vegetación fue más abundante; seguida por el Otoño 1483 UFC (41%), como se demuestra hay una mínima diferencia entre estas dos estaciones, en donde el viento estuvo presente, así también la lluvia favoreció para incrementar la dispersión de hongos. Por el contrario en Verano 337 UFC (17%), se observó menor presencia, debido a que las radiaciones ultravioleta y temperaturas suelen ser altas como para provocar la desecación de las esporas (Fig. 7).
- La mayor incidencia de *Penicillium* durante las tres estaciones se observó en los mercados de: Huamantanga - Puente Piedra (27.05%), Comas(26.32%), Mercado Municipal de la Victoria (25.96%), Mercado de Frutas - San Luis (24.86%) siendo los mercados que presentaron mayor humedad (Fig. 8). Como el *Penicillium* es el productor de la **Micotoxina Patulina** se adquirieron manzanas en esos mercados un mayor número de muestras.
- Para la investigación, no fue necesario un examen microbiológico de las manzanas, porque ello, solo determinaría la presencia del hongo más no de la micotoxina de ahí que se utilizó un método químico.
- El análisis de las manzanas no solo se realizó en las partes dañadas si no en toda la manzana por que según Lovett y Thompson la difusión de la

micotoxina es facilitada por la hidrosolubilidad de la fruta. La cantidad de manzanas fue de treinta y seis entre las Variedades Nacionales : manzana Pachacamac, manzana Delicious ente las Importadas: manzana Chilcna. De un total de doce análisis realizados resultaron tres francamente positivas 25% en manzanas Pachacamac y Delicia adquiridas en Mercado de Fruta - San Luis y en la variedad Delicia en Mercadillo de Huamantanga - Puente Piedra. Trazas de Patulina 8% en manzanas Pachacamac, Mercado Municipal de la Victoria y ocho dieron negativas (67%) (Fig. 9).

- Como Patulina no se reduce por pasteurización ni por el uso de conservadores por ello se analizaron seis jugos industrializados encontrándose trazas de Patulina en dos de ellos (33%), y cuatro restantes fueron negativos a Patulina (67%) (Fig. 10). Para evitar la presencia de la Patulina en la producción de jugos de frutas lo recomendable es no utilizar aquellas visualmente dañadas para la producción de jugos, realizar un buen almacenamiento de las frutas y analizarlas antes y después del procesado.

CONCLUSIONES

- En diecisiete mercados se identificaron 11 géneros de Hongos productores de micotoxinas: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cephaloporium* *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pithomyces*, *Stachybotris*, *Trichoderma* y *Trichotecium*.
- Los mercados con mayor incidencia del género *Penicillium* fueron:

[Mercado de Huamantanga – Puente Piedra (27.05%), Mercadillo de Comas (26.32%), Mercado Municipal de la Victoria (25.96%), Mercado de Frutas de San Luis (24.86%).

- En manzanas en mal estado así también en jugos de manzana industrializados fue detectada la presencia de Patulina.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón Valdez P. y Albores Bernal B. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos anemófilos, en la ciudad de Toluca, estado de México en las estaciones del año. (Tesis Bachiller). Facultad de Química: Universidad Autónoma del Estado de México. 1985:56p.

Ciegler, Beckwith y Jackson K. Teratogenicity of Patulin and Patulin Adducts formed with cysteine. *Apl. Environ. Microbiol.* 1976;31:664-666.

Damoglou, A.; Campbell, D. y Buttom, J. Some factors governing the production of Patulin in apples. *Food Microbiol.* 1985;2(1):3-10.

Gaucher M. Mycotoxins their biosynthesis in fungi Patulin and related carcinogenic lactones. *J of food Protec.* 1979;42(10):810-814.

J. A. M. y V. de Andrés. Método rápido de cromatografía en capa fina de alta eficacia para la determinación de patulina y ácido penicilico en granos. *Invest Agr Prod Prot Veg.* 1987;2(3): 225 – 233.

Lindroth S y Niskanen A. Comparison of potential Patulin hazard in home – made and commercial apple products. *J of food science.* 1978;43:446-448. Lovett, Thomson y Boutin. Patulin production in apples stored in a controlled atmosphere. *J of the AOAC.* 1975:58(5):912-914

López Martínez R y García Maynez C. Aislamiento de hongos productores de alergias en mercados de la ciudad de México. *Ibero de Alerg* 1985 Jul;30(3):103-108.

Lovett, Thomson y Boutin. Patulin production in apples stored in a controlled atmosphere. *J of the AOAC.* 1975:58(5):912-914.

Machinsky M. y Midio A. Patulina en alimentos – aspectos toxicológicos e analíticos. *Bioquím Univ S. Paulo* 1995 jun;31(1): 1-19.

Pohland y Allen . Stability studies with Patulin. *J of the AOAC.* 1970;53(4):688-690.

Sánchez Regueiro O., Jiménez A., García Pérez A. Determinación de Patulina en frutas frescas y en conserva. *Rev cubana aliment nutrición.* 1991 Julio – Dic;5 (2):73 – 81.

Scott y Somers. Stability of Patulin and Penicillic Acid in fruit juices and flour. *J of the AOAC.* 1970;16(3):483-485.

Zulueta Torres, D. Micotoxinas: un problema sanitario. *Rev Cubana Hig. Epidemiol.* 1987;25(4):341-356.