



## REVISTA IMPACTO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Artículo de investigación original

### Eficacia *in vitro* de ácidos orgánicos para el control de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *Fusarium verticillioides*

Marco Maidana-Ojeda<sup>1,4</sup>, María Graciela Cabrera<sup>2</sup>, Marcelo Esteban Medina-Aquino<sup>3,4</sup>, Guillermo Andrés Enciso-Maldonado<sup>4</sup> y Jazmín Yerutí Mongelós-Franco<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.

<sup>2</sup>Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

<sup>3</sup>Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción. Tomás Romero Pereira, Paraguay.

<sup>4</sup>Centro de Desarrollo e Innovación Tecnológica. Hohenau, Paraguay.

\*Autor de correspondencia: Jazmín Yerutí Mongelós-Franco; yeruti91@gmail.com

**Recibido:** 09/05/2022 **Aceptado:** 17/10/2022

#### Resumen

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos durante la descomposición de material vegetal. A corto plazo pueden ser tóxicas para plantas y/o animales, pero el consumo prolongado en bajas concentraciones tiene efecto inmunosupresor, carcinogénico, mutagénico y teratogénico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia biológica *in vitro* del inhibidor conformado por la mezcla de ácido ascórbico 67 %, ácido cítrico 16,5 % y ácido láctico 16,5 %, sobre los hongos micotoxigénicos *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *Fusarium verticillioides*. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar para evaluar la actividad antifúngica del inhibidor utilizando concentraciones crecientes de 0 (control), 1, 10, 100 y 1.000 ppm en medio de cultivo papa-dextrosa-agar. Se registró un 100 % de inhibición del crecimiento fúngico para las tres especies a 1.000 ppm. La inhibición fue significativamente menor a 100 ppm, y se observó un efecto estimulador del crecimiento en las concentraciones de 1 y 10 ppm en *A. flavus* y *F. verticillioides*, demostrando que el inhibidor conformado por la mezcla de ácido ascórbico al 67 %, ácido cítrico al 16,5 % y ácido láctico al 16,5 % fue altamente eficaz para la inhibición del crecimiento de los hongos estudiados a concentración de 1.000 ppm.

**Palabras clave:** micotoxinas, hongos micotoxigénicos, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico.



## Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi during the decomposition of vegetal materia. In the short term they can be toxic to plants and/or animals, but prolonged consumption in low concentrations has an immunosuppressive, carcinogenic, mutagenic and teratogenic effect. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* biological efficacy of the inhibitor made up of the mixture of ascorbic acid 67%, citric acid 16.5% and lactic acid 16.5%, on the mycotoxigenic fungi *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* and *Fusarium verticillioides*. A completely randomized experimental design was applied to evaluate the antifungal activity of the inhibitor using increasing concentrations of 0 (control), 1, 10, 100 and 1,000 ppm in potato-dextrose-agar culture medium. There was 100% inhibition of fungal growth for all three species at 1,000 ppm. The inhibition was significantly lower at 100 ppm, and a growth-promoting effect was shown at concentrations of 1 and 10 ppm on *A. flavus* and *F. verticillioides*, demonstrating that the inhibitor made of a mixture of 67% ascorbic acid, 16.5% citric acid and 16.5% lactic acid was highly effective in the growth inhibition of the fungi studied at a concentration of 1,000 ppm.

**Keywords:** mycotoxins, mycotoxigenic fungi, ascorbic acid, citric acid, lactic acid.

## 1. Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por diversas especies de hongos, generalmente saprófitos o parásitos débiles, que pueden sobrevivir sobre materia orgánica en el campo o en productos de almacenamiento. La síntesis de estos compuestos y su liberación al medio ambiente inhiben el desarrollo de otros microorganismos para favorecer la proliferación de hongos micotoxigénicos (1, 2, 3). Las micotoxinas se sintetizan principalmente durante las fases estacionaria y final del desarrollo del hongo, etapas asociadas a la diferenciación de estructuras reproductivas y esporulación (4). Actualmente, se han caracterizado alrededor de 300 micotoxinas diferentes (5, 6). Las intoxicaciones producidas por micotoxinas se denominan micotoxicosis, y pueden constituirse en un problema de salud animal y humana por la exposición aguda o crónica a alimentos contaminados (7). Principalmente en intoxicaciones crónicas, las micotoxinas poseen efecto inmunosupresor, carcinogénico, mutagénico y teratogénico (8). En la producción de micotoxinas se destacan tres géneros fúngicos, que pueden estar asociados con micotoxinas específicas. El género *Aspergillus* comúnmente produce aflatoxinas del tipo B1, M1 y G1, sterigmatocistina y ocratoxina A. Por otra parte, hongos del género *Fusarium* son importantes productores de



fumonisin, zearalenonas, tricotecenos como deoxynivalenol, toxina T2 y DAS, fusarina y moniliformina. El género *Penicillium* está asociado a la síntesis de patulina, citrina y ocratoxina (9, 10). En Paraguay, recientemente se detectó la ocurrencia de cuatro especies del complejo *F. graminearum*, correspondientes a *F. graminearum sensu stricto*, *F. asiaticum*, *F. meridionale* y *F. cortaderiae*, identificadas mediante un análisis filogenético de 28 aislados provenientes de zonas productoras de trigo. El análisis de los quimiotipos reveló que los aislados de *F. graminearum*, *F. asiaticum* y *F. meridionale* son productores de tricotecenos, predominantemente deoxinivalenol en su forma acetilada 15-ADON, y nivalenol (11). Las aflatoxinas inducen efectos mutagénicos asociados al desarrollo de carcinomas hepáticos, encefalopatías y deterioro visceral. Se ha demostrado que la ocratoxina es causante de tumores epiteliales, y la fumonisin B1 se relaciona con cáncer de estómago y múltiples afecciones. La aflatoxina B1 es considerada como el carcinógeno natural más peligroso conocido (12). La presencia de ocratoxina A fue recientemente reportada en un vino, así como también deoxinivalenol en cervezas de varias marcas comercializadas en Paraguay (13). Las micotoxinas que llegan hasta el consumidor final constituyen un problema que comienza durante la producción de alimentos, y la prevención del crecimiento fúngico es la solución más factible para controlar la presencia de micotoxinas en los productos finales (14). El uso de inhibidores fúngicos no influye en el contenido de micotoxinas en los productos agrícolas, sin embargo, reduce el crecimiento de hongos que las producen (7), y podría ser un método eficaz para garantizar la producción de alimentos inocuos. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia biológica *in vitro* del inhibidor conformado por la mezcla de ácido ascórbico 67 %, ácido cítrico 16,5 % y ácido láctico 16,5 % en concentraciones crecientes, sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *Fusarium verticillioides*, bajo la premisa de que, a mayor concentración de inhibidores, mayor es la inhibición del crecimiento fúngico.

## 2. Materiales y Métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicado en el km 38,5 de la carretera México- Texcoco, Chapingo, Texcoco, Estado de México. El periodo de ejecución del estudio estuvo comprendido entre los meses de mayo y setiembre de 2015. Las unidades experimentales estuvieron constituidas por placas Petri de 90 mL con 20 mL de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), dispuestas en un diseño experimental completamente al azar, con 4 repeticiones para cada especie de hongo en estudio. El experimento fue realizado en duplicado. Los tratamientos consistieron en concentraciones crecientes de 0 (control), 1, 10, 100 y 1000 ppm del inhibidor



conformado por la mezcla de los siguientes ácidos orgánicos: ácido ascórbico al 67%, ácido cítrico al 16,5% y ácido láctico al 16,5%, el cual fue aplicado agregando las diluciones en las concentraciones correspondientes para cada tratamiento en el medio de cultivo PDA (15), que se dejó solidificar durante 24 horas. Posteriormente, las placas se inocularon colocando en el centro un disco de 4 mm de micelio en crecimiento activo de cada hongo en estudio. Las especies de hongos micotoxigénicos *A. flavus*, *A. fumigatus* y *F. verticillioides* fueron analizadas en experimentos independientes. Las variables evaluadas fueron el crecimiento micelial radial (CR) en  $\text{cm día}^{-1}$ , para lo cual se trazó una línea diametral por el centro de la colonia y se midió el radio de crecimiento micelial cada 48 horas durante 6 días en sentido de la línea, utilizando un Vernier (precisión = 0,1 mm), y el porcentaje de inhibición de crecimiento (IC) calculado en base a la reducción del radio de crecimiento de las colonias en cada tratamiento de acuerdo con el control (Ecuación 1).

$$IC (\%) = 100 - \left( 100 \times \frac{CR \text{ colonia tratada}}{CR \text{ colonia control}} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de Tukey ( $p > 0,05$ ) para comparar las medias. Debido a que los resultados de las dos réplicas del experimento en un primer análisis resultaron similares estadísticamente, se promediaron los resultados de ambos experimentos para el análisis de varianza final. Se utilizó el software de análisis estadístico SAS versión 9.3.

### 3. Resultados y Discusión

Los resultados del crecimiento radial y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos micotoxigénicos *A. flavus*, *A. fumigatus* y *F. verticillioides* sometidos a concentraciones crecientes del inhibidor se presentan en la Tabla 1. El ANAVA indicó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.



**Tabla 1.** Crecimiento radial (CR) del micelio y porcentaje de inhibición del crecimiento (IC) de hongos micotoxigénicos sometidos a concentraciones crecientes del inhibidor mezcla de ácido ascórbico 67 %, ácido cítrico 16,5 % y ácido láctico 16,5 %.

Concentración inhibidor (ppm)	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>F. verticillioides</i>	
	CR (cm día <sup>-1</sup> )*	IC (%)*	CR (cm día <sup>-1</sup> )	IC (%)	CR (cm día <sup>-1</sup> )	IC (%)
0	0,49 a	0,00 a	1,41 a	0,00 a	0,88 a	0,00 bc
1	0,54 a	-10,2 a	1,39 a	0,01 a	1,19 b	-35,2 a
10	0,50 a	-2,04 a	1,28 ab	9,21 a	1,02 ab	-15,9 ab
100	0,14 b	71,4 b	1,04 b	26,2 b	0,70 c	20,4 c
1.000	0,00 b	100 b	0,00 c	100 c	0,00 d	100 d
<b>CV (%)**</b>	<b>20,9</b>	<b>54,55</b>	<b>10,88</b>	<b>22,5</b>	<b>10,45</b>	<b>81,8</b>

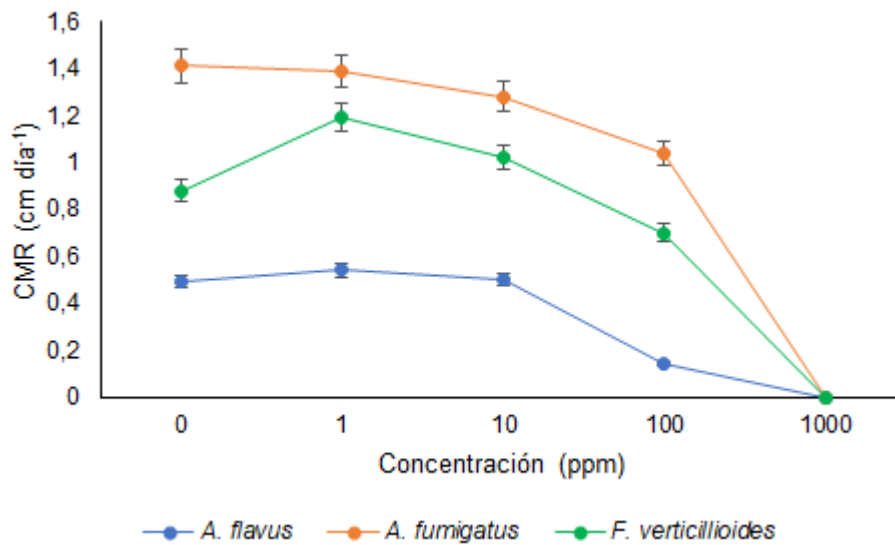
\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes por la prueba de Tukey ( $p > 0,05$ )

\*\*Coeficiente de variación de los datos, en porcentaje

*A. flavus* no presentó crecimiento micelial a 1.000 ppm del inhibidor (Figura 1), lo que se tradujo en un 100 % de inhibición del crecimiento a esta concentración, y un 71,4 % de inhibición a 100 ppm; estas dos concentraciones se diferenciaron significativamente de los demás tratamientos con menor concentración, los cuales no causaron inhibición del crecimiento y resultaron estadísticamente similares al control (Tabla 1). Cuando los ácidos lácticos y cítricos son aplicados por separado, la inhibición del crecimiento de *A. flavus* no llega al 50 % en concentraciones de hasta 50.000 ppm (15, 16), sin embargo, la mezcla de ácido ascórbico 67 %, ácido cítrico 16,5 % y ácido láctico 16,5 % fue eficaz en concentraciones de 1000 ppm y demostró el efecto sinérgico entre estos componentes, concordando con lo reportado por León-Peláez et al. (18), quienes evaluaron distintas combinaciones de ácido láctico y ácido cítrico sobre varias cepas de *A. flavus* y registraron resultados similares.

El inhibidor fúngico conformado por la mezcla de ácidos a una concentración de 1000 ppm no permitió el crecimiento *in vitro* de *A. fumigatus* (Figura 1), en el cual se registró una inhibición del 100 %. La inhibición de crecimiento fue del 26,2 % en la concentración de 100 ppm, y 9,2% a 10 ppm, valores estadísticamente similares a los obtenidos con la concentración de 1 ppm y el control (Tabla 1). El ácido ascórbico resultó eficiente en concentraciones bajas para controlar ambas especies de *Aspergillus*, inclusive en concentraciones más bajas de las permitidas para la conservación de productos alimenticios, que es de 10.000 a 60.000 ppm (19). El efecto sinérgico de la mezcla de ácidos también fue observado en la inhibición del crecimiento de *A. fumigatus*.





**Figura 1.** Crecimiento micelial radial (CMR) en  $\text{cm día}^{-1}$  de hongos micotoxigénicos sometidos a concentraciones crecientes del inhibidor mezcla de ácido ascórbico 67 %, ácido cítrico 16,5 % y ácido láctico 16,5 %.

Como se ha registrado para *A. flavus* y *A. fumigatus*, *F. verticillioides* tampoco presentó crecimiento micelial en la concentración de 1000 ppm del inhibidor (Figura 1). En el tratamiento con 100 ppm de la mezcla de ácidos, la inhibición del crecimiento fue solamente del 20,4 %, y se observó una clara estimulación del crecimiento micelial a concentraciones menores, con valores más altos que los registrados en el control (Tabla 1). También en *F. verticillioides* se observó el efecto sinérgico de los ácidos orgánicos en estudio, los cuales, aplicados por separado, requieren de altas concentraciones para inhibir el desarrollo de los hongos (20).

#### 4. Conclusiones

El inhibidor conformado por la mezcla de ácido ascórbico al 67 %, ácido cítrico al 16,5 % y ácido láctico al 16,5 % fue altamente eficaz para la inhibición del crecimiento de *A. flavus*, *A. fumigatus* y *F. verticillioides* a concentración de 1.000 ppm. Se sugiere realizar más estudios que incluyan más concentraciones de la mezcla de ácidos orgánicos utilizados en este trabajo, así como también con otros inhibidores, y posteriormente verificar la viabilidad de uso *in vivo*.

**Contribución de los autores:** Todos los autores contribuyeron activamente en el desarrollo del presente trabajo. Maidana-Ojeda y Cabrera conceptualizaron el trabajo, diseñaron el



marco metodológico y aplicaron los instrumentos. Medina-Aquino realizó los análisis estadísticos. Mongelós-Franco y Enciso-Maldonado redactaron el manuscrito.

**Conflicto de interés:** Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés con respecto a la publicación de este artículo.

**Agradecimientos:** A la Universidad Autónoma de Chapingo (México), a la Universidad Nacional del Nordeste (Argentina), a la Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción (Paraguay), y al Centro de Desarrollo e Innovación Tecnológica (Paraguay).

### Bibliografía

1. Swanson, B.G. 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae*. 207: 49-61.
2. Bennett, J.W., and M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology. Review* 16: 497-516.
3. Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. 128 p. Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina.
4. Soriano del Castillo, J.M. 2007. Micotoxinas en alimentos. 396 p. Ediciones Díaz de Santos (ed.). Madrid, España.
5. Binder, E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*. 133:149-166.
6. Arroyo-Manzanares N., J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, y M. García-Campaña. 2014. Control de micotoxinas en alimentos. *Revista Boletín GRASEQA*. 7: 16-31.
7. Hussein H.S., and J.M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167: 101-134.
8. Cabañes, F. 2000. Micotoxinas emergentes. Introducción. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: 61-62.
9. Munkvold, G.P. 2003. Epidemiology of Fusarium Diseases and their Mycotoxins in Maize Ears. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 705–713.
10. Araújo Santana, M.C. 2012. Principais tipos de micotoxinas encontradas nos alimentos de animais domésticos. *REDVET* 13(7): 1-18.
11. Arrua Alvarenga, AA; Iehisa Ouchi, JCM; Casal Martínez, CC; Moura Mendes, J; Colmán, AA; Fernández Ríos, D; Arrúa, PD; Barboza Guerreño, CA; Kohli, MM; Ramírez, ML; Acuña Ruíz, A; Sarmiento, MM; Ortiz, MC; Núñez, A; López Nicora, HD. 2022. Trichothecene genotype profiling of wheat *Fusarium graminearum* species complex in Paraguay. *Toxins*. 14(257).
12. Widstrom, N.W. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. *Advances in Agronomy*. 56: 219-280.



13. Arrúa, AA; Moura Méndez, J; Arrúa, P; Ferreira, FP; Caballero, G; Cazal, C, Kholi, MM; Peralta, I; Ulke, G; Fernández Ríos, D. 2019. Occurrence of deoxynivalenol and ochratoxin A in beers and wines commercialized in Paraguay. *Toxins*. 11(308).
14. Tefera, T. 2012. Post-harvest losses in African maize in the face of increasing food shortage. *Food Security*. 4: 267-277.
15. Guerrero-Rodríguez E., S. Solís-Gaona, F.D. Hernández-Castillo, A. Flores-Olivas, V. Sandoval-López, y D. Jasso-Cantú. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(1): 48-53.
16. Conková E., L. Para, and A. Kocisová. 1993. Inhibition of growth of microscopic fungi with organic acids. *Vet. Med. (Praha)*. 38(12): 723-7.
17. Hassan R., S. El-Kadi, and M. Sand. 2015. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. *International Journal of Advances in Biology*. 2(1): 1-11.
18. León Peláez A., C. Serna Cataño, E. Quintero Yepes, R. Gamba Villarroel, G. De Antoni, and L. Giannuzzi. 2012. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control*. 24(1-2): 177-183.
19. Ribotta P.D., and C.C. Tadini. 2009. Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados. 1 ed. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 327 p.
20. Higgins C., and F. Brinkhaus. 1999. Efficacy of several organic acids against molds. *The Journal of Applied Poultry Research*. 8(4): 480-487.