

## Determinación de deoxinivalenol (DON) en trigo, cebada y maíz y su relación con los niveles de mohos totales, *Fusarium* spp., porcentaje de colonización y actividad de agua

Marelllys del Carmen Moreno Contreras, Amaury José Martínez Yopez y Rosa Raybaudi Martínez

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

**RESUMEN.** Cincuenta muestras de cereales incluyendo 30 de trigo (10 de trigo duro rojo de primavera, 10 de trigo suave rojo de invierno y 10 de trigo durum ámbar), 10 de cebada y 10 de maíz (5 de maíz blanco y 5 de maíz amarillo) fueron analizadas para determinar mediante TLC los niveles de deoxinivalenol (DON), metabolito secundario tóxico producido por especies de *Fusarium*. El  $a_w$  de las muestras, la micoflora externa e interna y los niveles de *Fusarium* spp., fueron también investigados. Los resultados reflejaron que el mayor grado de infección (12-80%) y el mayor conteo de mohos totales (3,9 Log UFC/g) fueron detectados en trigo, mientras que los mayores niveles de *Fusarium* spp. (2,3 Log UFC/g) fueron detectados en maíz blanco. Deoxinivalenol fue detectado en trigo y cebada, pero no en maíz. Las muestras de trigo suave rojo de invierno presentaron los mayores niveles de DON (3,2 ug/g), estando este valor por encima de los límites permitidos por la FDA. No se encontró correlación entre los conteos de mohos totales, *Fusarium* spp., grado de infestación,  $a_w$  y niveles de DON. Estos resultados sugieren que hay que extremar las medidas de control a fin de evitar la importación de cereales contaminados.

**Palabras clave:** Cereales, deoxinivalenol, vomitoxina.

**SUMMARY.** Determination of deoxynivalenol (DON) in wheat, barley and corn and its relationship with the levels of total molds, *Fusarium* spp., infestation percentage, and water activity. Fifty samples of cereals including 30 of wheat (10 of wheat hard red spring), 10 of wheat soft red winter and 10 of wheat durum amber), 10 of barley and 10 of corn (5 of white corn and 5 of yellow corn) were analyzed to detect and determine by the TLC method, the quantity of deoxynivalenol levels, which is a toxic secondary metabolite produced by *Fusarium* species. The  $a_w$  of samples and the internal and external microflora and *Fusarium* spp. levels were also investigated. Results showed that the highest grade of infection (12-80%), and the highest count of total molds (3,9 Log UFC/g) were detected in wheat samples, while the highest levels of *Fusarium* spp. (2,3 Log UFC/g) were detected in white corn. Deoxynivalenol was found in the wheat and barley samples but not in corn. The wheat red winter soft samples showed the highest levels of deoxynivalenol (3,2 ug/g) which is over the limit levels accepted by the FDA. Correlation was not found among count of total molds, *Fusarium* spp., infestation grade,  $a_w$ , and deoxynivalenol levels. These results suggest that it is necessary to exert measures to avoid and to control the importation of contaminated cereals with DON levels higher to those allowed.

**Key words:** Cereals, deoxynivalenol, vomitoxin.

### INTRODUCCION

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por mohos, los cuales causan enfermedades en animales o humanos. La contaminación fúngica y la acumulación de micotoxinas pueden ocurrir antes o durante la cosecha así como también durante el almacenamiento (1).

Los tricotecenos son un grupo de metabolitos producidos por hongos estructuralmente similares, producidos por varias especies de *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium* y otros hongos. Esos compuestos han sido implicados en casos de intoxicación en animales y humanos. Los síntomas incluyen manifestaciones gastrointestinales y a veces neurológicas. Ejemplos de esos compuestos son deoxinivalenol (DON), más comunmente conocida como vomitoxina, toxina T-

2, toxina HT-2, nivalenol y scirpenol (2).

DON es uno de los 12-13 epoxitricotecenos tóxicos producido por varias especies de *Fusarium*, particularmente *F. graminearum*; y es además el tricoteceno hallado con más frecuencia en las cosechas de la mayoría de los países del mundo. Trigo, maíz y cebada son particularmente afectados (3). Trucksess y col., (4) analizaron muestras de trigo y cebada y señalaron que los niveles de DON en las 147 muestras de cebada variaron entre < 0,5 y 26 Ug/g mientras que los de las 483 muestras de trigo variaron entre < 0,5 y 18 Ug/g. Mossoba y col., (5) reportan la presencia de DON en cebada, maíz dulce y mezclas de alimentos para animales. Por otra parte Torres y col., (6) reportaron que el 10% de las muestras de trigo analizadas presentó DON en niveles que variaron entre 0,8 y 4,0 Ug/g.

El propósito de este trabajo fue determinar la relación entre los niveles de mohos totales, niveles de *Fusarium* spp., el grado de colonización, la actividad de agua y niveles de DON en granos de producción nacional como el maíz y granos importados como la cebada y el trigo a fin de conocer a través de esta pequeña inspección, si los niveles de esta micotoxina en este tipo de productos cumplen o no con los límites permitidos. Este estudio preliminar serviría como base para la realización de un estudio más amplio en nuestro país donde es escasa la información en este campo y se considera de gran importancia, ya que la presencia de esta micotoxina en los cereales, en niveles mayores a los límites permitidos, representa un riesgo para la salud de animales y humanos.

## MATERIALES Y METODOS

**Muestreo:** Un total de 50 muestras de cereales que incluyeron 30 muestras de trigo importado (10 de trigo duro rojo de primavera (panadero), 10 de trigo suave rojo de invierno (galletero) y 10 de trigo durum ámbar (pastero) ) fueron recolectadas empleando un calador de granos en los silos de almacenamiento de una empresa procesadora de trigo ubicada en Caracas (el tiempo de almacenamiento del trigo en los silos fue de 11 días para el trigo panadero, 2 a 3 meses para el galletero y 1 a 2 meses para el pastero); 10 muestras de maíz (5 de maíz blanco y 5 de maíz amarillo) y 10 muestras de cebada, adquiridos estos últimos dos tipos de cereales a nivel de mercado libre en Caracas, fueron analizadas preliminarmente en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela.

**Determinación de la micoflora externa y niveles de *Fusarium* spp.:** La determinación de la flora fúngica externa y los niveles de *Fusarium* spp. se realizó tomando 11 g de muestra y colocándolos en 99 ml de agua peptonada (0,1%), se realizaron diluciones seriadas a partir de esta primera dilución y se sembró en placas con agar Dicloran Cloranfenicol Peptona Agar (DCPA) desarrollado por Andrews y Pitt, (7). Las placas fueron incubadas durante 7 a 10 días a temperatura ambiente (25°C aprox.) y los datos son reportados como Log UFC/g de muestra.

**Determinación de la micoflora interna:** A fin de evaluar el grado de colonización se procedió a la desinfección de los granos con una solución de NaOCl (3%) durante 3 minutos y su posterior lavado dos veces con agua destilada estéril. Luego de eliminar la flora externa se colocaron 50 granos de muestra en placas de agar DCPA (10 granos por placa) incubándose posteriormente durante 7 a 10 días, a temperatura ambiente (25°C aprox.). Se contaron los granos colonizados y los resultados son reportados como porcentaje de colonización.

**Identificación de mohos:** Se aislaron tres colonias (a partir de las placas de cultivo) por muestra de cereal y se

guardaron en cuñas de agar extracto de malta, se procedió a su purificación para su posterior identificación mediante observación microscópica y macroscópica siguiendo la clave taxonómica propuesta por Samson y col., (8). En el caso de colonias sospechosas de *Fusarium* se realizó una inoculación mediante una punción en placas de agar extracto de malta, mientras que en el caso de los otros mohos se realizaron tres punciones por placa. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 7 a 10 días. Para la identificación se tomó una pequeña muestra del micelio del moho con parte del agar y se colocó sobre un portaobjetos donde se habían colocado previamente dos gotas de azul de algodón, luego se añadió una gota de alcohol (70%) y se colocó un cubreobjetos para finalmente observar al microscopio, donde se identificaron las diferentes estructuras.

### Determinación y cuantificación de deoxinivalenol

**Extracción y participación:** La metodología seguida para la extracción y purificación de la toxina fue la metodología indicada por Trucksess y col., (9) modificada por Fernández y col., (10). La muestra (molida) se sometió a un proceso de extracción con una mezcla acetónitrilo-agua (84+16), se mezcló, se filtró y se pasó por una columna de cromatografía previamente preparada (se colocó lana de vidrio y luego una mezcla de carbón, alumina y celite). En el caso del maíz, el filtrado fue desgrasado con hexano previamente antes de pasar por la columna de cromatografía. Se añadieron 5 ml de la mezcla acetónitrilo-agua (84+16), se aplicó vacío a la columna, se recolectaron en un beaker los eluatos y se evaporó el solvente hasta 1,5 ml, se transfirió a un vial y se evaporó a sequedad en una estufa a 50°C.

**Cromatografía en capa fina (TLC):** Se resuspendió el contenido del vial con metanol, alícuotas de las muestras y del estándar de vomitoxina fueron colocadas en placas de TLC. se desarrolló la placa con una mezcla de cloroformo-acetona-2 propanol (8 +1+1), se dejó secar al aire por 10 minutos, rociándola seguidamente con un spray de tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) y colocándola en una estufa a 120°C por 7 minutos. Finalmente la placa fue observada bajo luz ultravioleta.

**Determinación de la actividad de agua (a<sub>w</sub>):** La actividad de agua de las muestras se determinó por medio del Decagon CX-2, instrumento psicométrico que usa la técnica de enfriamiento de un espejo por efecto peltier. En el punto de rocío, la temperatura del espejo y de la muestra son registradas, repitiéndose el ciclo hasta que la a<sub>w</sub> está cerca de 0,001 del valor previo.

**Análisis estadístico:** Los resultados fueron analizados utilizando el programa STATGRAPHICS 6.0 para determinar la existencia o no de una correlación entre los niveles de mohos totales, niveles de *Fusarium* spp., porcentaje de colonización, niveles de DON y la actividad de agua.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Determinación e identificación de la flora fungica:** Los niveles de mohos totales de las muestras analizadas variaron entre < 2,00 a 3,90 Log UFC/g encontrándose los mayores niveles en trigo específicamente trigo pastero (2,00 a 3,90 Log UFC/g) y los menores niveles en maíz amarillo (< 2,00 Log UFC/g). En relación a la incidencia de *Fusarium* spp. los mayores contajes se encontraron en maíz blanco (2,30 Log UFC/g) y los menores en cebada y maíz amarillo (< 2,00 Log UFC/g). Estos resultados difieren de los señalados por Martínez y Alvarado, (11) quienes reportaron que en los sustratos evaluados (granos, semillas y harinas) encontraron que el 83,3% de las muestras de maíz y 57,1% del maíz descorticado presentaban niveles de mohos mayores a 10<sup>4</sup> UFC/g, siendo este nivel mayor que los niveles encontrados por nosotros. Por otra parte al determinar el grado de colonización o la micoflora interna de las diferentes muestras se encontró que el mayor porcentaje de colonización lo presen-

taron las muestras de trigo (12-80%) siendo mayor el grado de colonización en trigo panadero que en el trigo pastero y galletero. En cebada y maíz los valores máximos de colonización fueron 4% y 8% respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Las principales especies de mohos identificadas en trigo, cebada y maíz se muestran en la Tabla 2. No se halló *Fusarium* spp. en las muestras de cebada, mientras que en las muestras de trigo y maíz se hallaron diferentes especies de *Fusarium*, sin embargo *F. graminearum* no fue hallado en ningún tipo de muestra. Estos resultados coinciden con los reportados por Torres y col., (6) quienes hallaron *Fusarium poae* y otras especies de *Fusarium* en muestras de trigo e indican una escasa contaminación de las muestras con *F. graminearum*. Asimismo coinciden con los reportados por Ramírez y col., (12) quienes señalan la presencia de diferentes especies de *Fusarium* en maíz, indicando que las principales especies halladas fueron *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. nygamai*.

TABLA 1  
Niveles de mohos, grado de infestación y niveles de DON en muestras de trigo, cebada y maíz

Tipo de muestra	Mohos totales (Log UFC/g)	<i>Fusarium</i> spp. (Log UFC/g)	Porcentaje de Colonización	Niveles de DON(ug/g)	Niveles de DON (ug/g) en muestras positivas (%)	a <sub>w</sub>
Trigo panadero	< 2,00a - 2,30	< 2,00	42 - 80	< 0,04b - 1,6	Trazas - 1,6 (40 %)	0,641- 0,697
Trigo pastero	2,00 - 3,90	< 2,00	52 - 68	< 0,04 - 1,6	Trazas - 1,6 (20 %)	0,601- 0,648
Trigo galletero	< 2,00 - 2,60	< 2,00	12 - 36	< 0,04 - 3,2	0,4 - 3,2 (80 %)	0,625- 0,650
Cebada	< 2,00 - 2,30	< 2,00	0 - 4	< 0,04 - 1,6	1,0 - 1,6 (20 %)	0,622- 0,663
Maíz blanco	2,00 - 2,47	< 2,00 - 2,30	0 - 8	< 0,1c	-	0,620- 0,669
Maíz amarillo	< 2,00 - 2,00	< 2,00	0 - 4	< 0,1	-	0,640- 0,644

a = < 2,00 Log UFC/g Nivel inferior al mínimo detectable por el método de siembra en superficie

b = < 0,04 ug/g Nivel inferior al mínimo detectable para trigo y cebada por el método utilizado

c = < 0,1 ug/g Nivel inferior al mínimo detectable para maíz por el método utilizado

Trigo panadero: trigo duro rojo de primavera

Trigo galletero: trigo suave rojo de invierno

Trigo pastero: trigo durum ámbar

En las muestras de cebada, la a<sub>w</sub> varió entre 0,622 y 0,663, en maíz blanco entre 0,620 y 0,669 y los de maíz amarillo entre 0,640 y 0,644 respectivamente. No se encontró correlación (p > 0,05) entre los niveles de a<sub>w</sub>, contenido de mohos totales, niveles de *Fusarium* spp. y el porcentaje de colonización, en ninguno de los tipos de muestras analizadas (trigo, cebada y maíz).

En todas las muestras analizadas los valores de actividad de agua eran lo suficientemente bajos como para no permitir el desarrollo de mohos toxinogénicos durante el almacenamiento. Esto nos lleva a concluir que los niveles de DON encontrados en las muestras son debido a una contaminación a nivel de campo o en alguna de las fases del proceso antes de ser almacenados.

## CONCLUSIONES

Los niveles de DON encontrados en las diferentes muestras son debidos a una contaminación a nivel de campo más que a nivel de almacenamiento ya que no hubo correlación entre los diferentes parámetros evaluados y nos confirman que el hecho de que no esté presente el hongo micotoxinogénico no indica que la micotoxina no esté presente y viceversa. Asimismo estos resultados nos conducen a pensar que se deben extremar las medidas de control a fin de evitar la entrada a nuestro país de cereales contaminados con DON en niveles superiores a los permitidos por la FDA.

Los bajos niveles de mohos encontrados en las diferentes muestras analizadas nos sugieren que gran parte de ellos son

TABLA 2  
Principales especies de mohos aisladas de trigo,  
cebada y maíz

TRIGO	<i>Fusarium poae</i> (7,8%) <i>F. sporothrichioides</i> (7,8%) <i>F. avenaceum</i> (7,8%) <i>F. acuminatum</i> (7,8%) <i>F. tricinctum</i> (5,2%) <i>F. solani</i> (5,2%) <i>Alternaria alternata</i> (5,2%) <i>Penicillium griseofulvum</i> (5,2%) <i>P. corylophilum</i> (2,6%) <i>P. glabrum</i> (2,6%) <i>P. chrysogenum</i> (2,6%) <i>P. funiculosum</i> (2,6%) <i>P. citrinum</i> (2,6%) <i>Mucor racemosus</i> (2,6%) <i>Aspergillus niger</i> (5,2%) <i>A. candidum</i> (2,6%) <i>A. flavus</i> (10,5%) <i>A. wentii</i> (2,6%) <i>Cladosporium macrocarpum</i> (5,2%) <i>C. sphaerospermum</i> (2,6%) <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (2,6%)
CEBADA	<i>Penicillium corylophilum</i> (25%) <i>Geotrichum</i> sp. (25%) <i>Aurobasidium pullulans</i> (25%) <i>Alternaria alternata</i> (25%)
MAIZ BLANCO	<i>A. flavus</i> (25%) <i>A. terreus</i> (12,5%) <i>P. citrinum</i> (12,5%) <i>P. corylophilum</i> (12,5%) <i>P. funiculosum</i> (12,5%) <i>F. sporothrichioides</i> (12,5%) <i>Fusarium</i> . sp. (12,5%)
MAIZ AMARILLO	<i>A. flavus</i> (25%) <i>A. penicillioides</i> (25%) <i>F. sambucinum</i> (25%) <i>F. subglutinans</i> (25%)

eliminados antes del almacenamiento, sin embargo las micotoxinas ya formadas pueden permanecer en los granos como fue comprobado en este estudio. Por otra parte los altos niveles de DON encontrados nos indican que no hubo control a nivel de campo donde sospechamos que ocurrió la formación de la micotoxina.

#### AGRADECIMIENTOS

A la profesora Rosa V. Díaz de Tablante por su colaboración en la realización de los análisis estadísticos.

Al señor Rafael Alvarado por su amplia colaboración durante la realización de este trabajo.

#### REFERENCIAS

- Martínez AJ, Trucksess MW and Park DL. Analysis of Venezuelan corn for aflatoxin and *Aspergillus flavus* or *Aspergillus parasiticus* Contamination. En: Biodeterioration Research 1. Gerald C. Llewellyn and Charles E. O'Rear (Ed.). Plenum Publishing Corporation. 1987, p. 111-118.
- Childress WL, Krull IS and Selavka CM. Determination of Deoxynivalenol DON, Vomitoxin in Wheat by High-Performance Liquid Chromatography with Photolysis and Electrochemical Detection (HPLC-hv-EC). *J Chromatogr Sci.* 1990;28:76-82..
- Trucksess MW, Ready DWE, Pender MK, Ligmond CA, Wood GE and Page SW. Determination and Survey of Deoxynivalenol in White Flour, Whole Wheat Flour, and Bran. *J Assoc Off Anal Chem.* 1996;79 (4): 883-887.
- Trucksess MW, Thomas F, Young K, Stack ME, Fulgueras WJ and Page SW. Survey of Deoxynivalenol in U. S. 1993 Wheat and Barley Crops by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Assoc Off Anal Chem.* 1995;78 (3):631-636.
- Mossoba MM, Adams S and Roach JAG. Analysis of Trichothecene Mycotoxins in Contaminated Grains by Gas Chromatography/Matrix Isolation/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J Assoc Off Anal Chem.* 1996;79 (5):1116-1123.
- Torres A, Ramírez ML, Reynoso M, Combina M, Dalcero A y Chulze S. Incidencia de Deoxinivalenol y *Fusarium graminearum* en trigo. Segundo Congreso Latinoamericano de Micotoxicología (libro de resúmenes, R 78), 1997.
- Andrews S and Pitt JI. Selective Medium for Isolation of *Fusarium* Species and Dematiaceous Hyphomycetes from Cereals. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51(6):1235-1238.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC and Filtenborg O. «Introduction to food-borne fungi». Published and Distributed by Centraalbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands. Fourth edition. 1995.
- Trucksess MW, Nesheim S and Eppley RM. «Thin layer chromatographic determination of Deoxynivalenol in Wheat and Corn». *J Assoc Off Anal Chem.* 1984;67 (1):40-43.
- Fernández C, Stack ME and Musser SM. Determination of Deoxynivalenol in 1991 U. S. Winter and Spring Wheat by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J Assoc Off Anal Chem.* 1994;77 (3): 628-630.
- Martínez AJ and Alvarado RA. An Evaluation of four Mycological Media for Enumeration of Mold and Yeast in Grains and Seeds. En: Biodeterioration Research 1. Gerald C. Llewellyn and Charles E. O'Rear (Ed.). Plenum Publishing Corporation. 1987, p.165-174.
- Ramírez ML, Torres A, Reynoso M y Chulze S. «Incidencia de especies de *Fusarium* (sección *Liseola*) y fumonisina en maíz cultivado en el sur de la provincia de Córdoba, Argentina». Segundo Congreso Latinoamericano de Micotoxicología (libro de resúmenes, R 104), 1997.

Recibido:09-01-1999  
Aceptado:03-05-2000