

Artículo original

Detección de hongos toxigénicos en harinas de maíz precocidas distribuidas en el estado Aragua, Venezuela

Marleny Coromoto Chavarri^{a,*}, Claudio Bruno Mazzani Cardinalis^a, Odalís Luzón^b, Mario José Garrido^a

^aFacultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. ^bEmpresa Regional, Venezuela.

Recibido 9 de abril de 2012; aceptado 10 de septiembre de 2012

Resumen: Con el fin de detectar la presencia de hongos y aflatoxinas, en harina de maíz precocida distribuida en el estado Aragua, Venezuela, se muestrearon cuatro presentaciones comerciales durante cinco semanas. La cuantificación de hongos se realizó por el método de conteo por incorporación en placa, utilizando agar extracto de malta e incubación durante ocho días a 27 ± 2 °C. La determinación de las aflatoxinas se realizó por la prueba de ELISA. El ensayo fue conducido bajo un diseño completamente aleatorio y todos los resultados fueron sometidos a la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y a pruebas de medias no paramétricas. Los conteos de hongos oscilaron entre $1,79$ a $4,7 \times 10$ UFC de hongos/g de muestra, encontrándose por debajo del nivel establecido por la Norma Covenin 1337-90 de 10^4 UFC/g de harina. Las especies fúngicas identificadas fueron: *Aspergillus* spp., *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *Penicillium* spp. Los contenidos de aflatoxinas cumplieron con el nivel de tolerancia permitido para el maíz (20 ng/g).

Palabras clave: hongos, harina de maíz, micotoxinas, aflatoxinas.

Detection of toxigenic fungi in pre-cooked corn flour distributed at Aragua State, Venezuela

Abstract: With the purpose of detecting presence of fungi and aflatoxins in pre-cooked corn flour in Aragua State, Venezuela, we sampled four commercial presentations during five weeks. Quantification of fungi was done by the plate incorporation counting method, using malt extract agar and incubation during 8 days at 27 ± 3 °C. Aflatoxin determination was done by the ELISA test. The assay was conducted under a completely random design and all results were submitted to the Kruskal-Wallis non parametric statistical test, as well as to non parametric means tests. Fungi counts varied between 1.79 and 4.7×10 CFU of fungi/g of sample, indicating that they were under the level established by the COVENIN Guideline 1337-90 of 10^4 CFU/g of flour. The fungal species identified were *Aspergillus* spp., *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, and *Penicillium* spp. The aflatoxin content complied with the tolerance level allowed for corn (20 ng/g).

Keywords: fungi, corn flour, mycotoxins, aflatoxins.

* Correspondencia:

E-mail: marlenycoromoto@gmail.com

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es considerado uno de los principales cereales en el ámbito nacional y mundial, por la importancia que tiene en la alimentación humana y animal. Además, es una materia prima básica de la industria para su transformación en harina, aceite, proteína, almidón, hojuelas de maíz y bebidas alcohólicas, entre otros [1].

El maíz es afectado por numerosas enfermedades causadas por hongos, virus y bacterias. Entre las de tipo fúngico se destacan las podredumbres del tallo y la mazorca [2,3], las cuales tienen un efecto directo sobre la disminución del

rendimiento y enormes implicaciones tanto en la calidad del grano como en la salud pública y animal, debido a la producción de metabolitos tóxicos secundarios llamados micotoxinas [4].

Se estima que el 25% de los cultivos alimenticios del mundo son afectados por las micotoxinas, durante el crecimiento y almacenamiento, debido a los productos del metabolismo del crecimiento fúngico [5]. Dentro de las micotoxinas, que pueden estar presentes en granos de maíz, se destacan las aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos, toxinas T2, deoxynivalenol (DON), ochratoxinas, citrinina, esterigmatocistina, patulina y zearalenona [6,7].

Las aflatoxinas son producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*; son unas de las toxinas más peligrosas, habiéndose demostrado que el consumo repetido de dosis bajas tiene efecto mutagénico, teratogénico y cancerígeno en animales, además de ser letales a dosis altas. El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas ha sido correlacionado con cáncer hepático de algunas poblaciones humanas de África y Asia [8-12]. El impacto de las micotoxinas es muy difícil de determinar, por falta de información referente al número de enfermos y muertes, medios y niveles de contaminación, así como la existencia o ausencia de reglamentación por parte de las diferentes naciones [13-16].

En Venezuela, desde la época colonial, el maíz ha sido el cultivo anual más ampliamente extendido, por ser la base de la alimentación en la mayor parte de la población y por su fácil adaptación a diversas condiciones agroecológicas, llegando a constituir la principal actividad agrícola de numerosas familias. Por esta razón, se considera de suma importancia conocer la incidencia de hongos y micotoxinas en sus granos y subproductos, ya que pueden ocasionar efectos dañinos sobre la salud humana y animal; además, las condiciones imperantes en nuestro país, propias de áreas tropicales, son favorables para la proliferación de este tipo de microorganismos y la síntesis de sus toxinas. Por otra parte, en el ámbito nacional e internacional hay mucha información sobre la detección de hongos y micotoxinas en granos de maíz, pero no en harina precocida, la cual forma parte importante de la dieta del venezolano. Por ello, se consideró de interés realizar esta investigación con el objetivo de detectar los hongos toxigénicos y cuantificar las aflatoxinas en harina de maíz precocida distribuida en el estado Aragua, Venezuela.

Materiales y métodos

Cuantificación y aislamiento de hongos: Se analizaron muestras de cuatro marcas comerciales de harina de maíz precocida de diversas empresas del país, distribuidas en el estado Aragua, Venezuela, durante 5 semanas. Las marcas 1, 3 y 4 fueron de harina no integral y la 2 de harina integral. Para la detección de los hongos se analizaron paquetes de 1 Kg y se utilizó el método de conteo por incorporación en placa [17], tomando 10 g de muestra por paquete de harina de maíz precocida. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de las muestras, transfiriendo los 10 g de éstas a una botella de dilución con 90 mL de agua peptonada al 0,1% estéril, se licuaron por cinco minutos y se obtuvieron las diluciones a 10^{-1} . De cada una de estas diluciones se tomó 1 mL con una pipeta estéril y se incorporaron en tubos de ensayo con 9 mL del diluyente, obteniéndose la dilución 10^{-2} . El mismo procedimiento se repitió para obtener las restantes diluciones (hasta 10^{-4}). Seguidamente, se transfirió 1 mL de cada dilución por duplicado en placas estériles y se le agregó el medio de cultivo agar extracto de malta a pH 5,8 licuado y enfriado a 45 °C (15 mL para cada placa). Se dejaron solidificar las placas y finalmente

se incubaron herméticamente dentro de bolsas plásticas estériles a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) por un periodo alterno de luz (día) y oscuridad (noche) durante ocho días. Transcurrido el proceso de incubación se contaron las colonias de hongos presentes, tomando como criterio de conteo (placa contable) entre 15 y 150 UFC de hongos/g de muestra (Norma COVENIN 1337-90) [17]. El requisito establecido por la norma COVENIN 2135-96 [18] es de un máximo de 1×10^4 UFC de hongos/g de harina.

Conservación e identificación de los aislamientos fúngicos: Los hongos aislados se conservaron en tubos de ensayos con agar papa dextrosa (PDA) en cuña a pH 5,8, incubados a 27 ± 2 °C durante 8 días. Después del tiempo de incubación, todos los aislamientos fúngicos se preservaron a baja temperatura (8-10 °C) para su posterior identificación.

Los hongos conservados en tubos de PDA, se sembraron en placas de Petri contentivas de agar Czapeck a pH 5,8, para hacer observaciones de sus características macro y microscópicas. Se observó el color en el anverso y reverso de las placas, micelio aéreo y profundo, presencia de exudados y se determinó el diámetro de la colonia, entre otras características. Posteriormente se realizaron preparaciones microscópicas para identificar las estructuras con valor taxonómico y compararlas con la literatura especializada [19,20].

Detección de aflatoxinas totales (B1+B2): La detección de aflatoxinas se realizó por la prueba de ELISA [21], la cual consistió en un ELISA directo competitivo, que determinó concentraciones exactas de la toxina en partes por billón (ng/g). La toxina libre en la muestra y el control compiten con la toxina enlazada con la enzima (conjugado) por los sitios de enlace con el anticuerpo. Luego de un lavado, el sustrato reacciona con la enzima enlazada al conjugado para producir un color azul. Se utiliza un espectrofotómetro para la lectura y posteriormente se promedian las densidades ópticas obtenidas y se grafican en una curva para calcular la concentración exacta de la toxina.

Extracción: Consistió en pesar y moler 25 g de la muestra, mezclarla con 125 mL de metanol al 70% y agitar por un periodo de 3 minutos, con el fin de lograr separar la toxina de la muestra a analizar. Posteriormente se filtró la muestra a través de papel Whatman N°1.

Prueba de inmunoafinidad: Para ello se utilizaron tiras de pozos de plástico o pozos de mezclado. Se empleó una tira de 5 pozos, correspondientes a la muestra y cuatro controles de 0 ng/g, 5 ng/g, 15 ng/g y 50 ng/g y otra tira de 5 pozos con anticuerpos. El pozo inicial correspondió al número 1. Con una micropipeta se tomaron 100 μ L del reactivo conjugado (reactivo color azul) y se colocaron en cada uno de los pozos de mezclado. Posteriormente se agregaron 100 μ L del patrón 0 ng/g en el pozo marcado con 1, y así sucesivamente hasta el patrón 50 ng/g. Seguidamente se colocaron 100 μ L de cada una de las muestras a analizar, se mezcló 4 veces mediante el uso de una pipeta multicanal y luego se transfirieron 100 μ L de esta mezcla a los pozos de

anticuerpos; posteriormente se mezclaron los pozos con un movimiento oscilatorio sobre la mesa de trabajo por 10 a 20 seg y se incubaron por 2 min a temperatura ambiente.

Lavado: Luego de incubada la muestra se desechó el líquido de los pozos de anticuerpos y se lavaron con agua destilada, repitiendo el proceso 5 veces; luego se desechó toda el agua de los pozos hasta su eliminación completa. Después se colocaron 100 µL del sustrato (reactivo de color verde) en cada pozo de anticuerpos, se mezcló nuevamente con un movimiento oscilatorio por 10 a 20 segundos y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 100 µL del reactivo que detiene la reacción (reactivo de color rojo) a cada uno de los pozos y se agitaron suavemente.

Determinación: Los pozos se colocaron en un espectrofotómetro (Veratox Stat Fax) y se procedió a determinar la lectura de los valores de aflatoxinas en ng/g.

Análisis estadístico: El ensayo fue conducido bajo un diseño completamente aleatorio y todos los resultados fueron sometidos a la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y a pruebas de medias no paramétricas.

Resultados y discusión

Hongos en harina de maíz precocida: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las marcas de las harinas analizadas para la incidencia de hongos totales y por especie, y diferencias no significativas en el contenido de aflatoxinas (Tabla 1). Los contajes de hongos oscilaron entre 1,79 a 4,7 x 10⁴ UFC de hongos/g de muestra, cumpliendo con el requisito establecido por la norma COVENIN 2135-96 [18] de un máximo de hongos de 1x10⁴ UFC/g de harina (Tabla 1). La marca de harina integral (2) presentó la mayor incidencia de hongos; éstos resultados coincidieron con los reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 1993 para harina de maíz precocida integral [22], ya que las harinas con mayor proporción de germen y concha (integrales) se caracterizan por presentar alta contaminación fúngica.

Los géneros y especies detectados fueron: *Aspergillus* spp., *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *Penicillium* spp. Los hongos

A. flavus y *A. terreus* presentaron la mayor frecuencia e incidencia en las muestras de harinas analizadas, aún cuando la incidencia fue baja (Tabla 1). Sin embargo, la presencia de *A. flavus* en todas las muestras de harinas es relevante, ya que esta especie es capaz de producir aflatoxinas y representa un riesgo para la salud pública y animal [23,24]. *A. flavus* se ha detectado en harinas de maíz no integral [25,26], coincidiendo estos resultados con los de la presente investigación. Otros hongos como *Fusarium verticillioides* y *P. aurantiogriseum*, también han sido detectados como contaminantes en harinas de maíz [25].

En investigaciones previas realizadas en Venezuela, se han aislado de la harina de maíz no integral los hongos *Cladosporium cladosporoides*, *Curvularia lunata* y *Eurotium* spp. [27] y de la integral *A. flavus*, *A. terreus*, *Rhizopus stolonifer*, *P. citrinum*, así como los tres hongos nombrados anteriormente [28]. En otras investigaciones realizadas en Venezuela pero en granos de maíz se han detectado *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. terreus*, *F. verticillioides*, *P. citrinum*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. [29-34].

Las especies toxigénicas *A. flavus* y *F. verticillioides* han sido las de mayor frecuencia e incidencia detectadas en las muestras de granos de maíz provenientes de varios estados de Venezuela. Esto ha sido una constante en investigaciones previas realizadas durante los últimos quince años en las áreas productoras de maíz más importantes de nuestro país, en las cuales se incluyeron ensayos experimentales, explotaciones comerciales y días de campo; situación similar se ha observado en otras áreas maiceras de América Latina [3,15,33-35].

Detección de las aflatoxinas: Los contenidos de aflatoxinas fueron bajos en todas las muestras analizadas con promedios desde 0,6 en la marca 4 (harina no integral) hasta 2,72 ng/g en la marca 2 (harina integral), la cual también presentó la mayor incidencia de *A. flavus*. Todos los valores de aflatoxinas estuvieron por debajo de 20 ng/g, que es el nivel máximo permitido para el maíz (Tabla 1). Los contenidos de aflatoxinas encontrados en esta investigación son similares a los detectados en harina de maíz no integral en Kenya [25], pero más bajos que los detectados en harina de maíz integral en otra investigación nacional [28]. En trabajos

Tabla 1. Incidencia promedio de hongos y contenido de aflatoxinas en harina de maíz precocida en el estado Aragua, Venezuela.

Marca de la harina	Incidencia de hongos (% de la media)						Aflatoxinas (ng/g)
	Total de hongos	<i>A. flavus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	
1	5,0x10a	1,02x10a	1,79x10a	1,12x10a	1,02x10ab	1,08x10ab	0,68
2	1,6x10a	1,74x10a	6,30b	1,28x10a	1,34x10a	1,23x10a	2,72
3	6,3ab	5,90b	9,90ab	9,0b	1,08x10ab	8,50b	1,82
4	4,7b	8,50ab	7,9b	9,0b	7,6b	1,04x10ab	0,6

a,b: los valores de las medias seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de comparación medias no paramétricas ($\alpha=0,05$); las letras diferentes indican valores estadísticamente significativos al compararlos entre sí.

previos realizados en granos de maíz en Venezuela, se han encontrado niveles de aflatoxinas por encima de 20 ng/g, presentes en muestras de campo y de almacén [14,30,31]. En base a las diversas investigaciones relacionadas con el riesgo del consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas a nivel mundial [36], es indispensable el monitoreo riguroso y continuo de ésta micotoxina en los granos de maíz y sus derivados, como la harina de maíz precocida, a pesar que la concentración sea baja, ya que es un cereal de consumo masivo.

Conclusiones

Los géneros de hongos predominantes en harinas de maíz precocida fueron *Aspergillus* y *Penicillium*. Las especies fúngicas encontradas con mayor frecuencia contaminando harina de maíz precocida fueron *A. flavus* y *A. terreus*.

El conteo de hongos en harina de maíz precocida está por debajo de lo permitido por la norma COVENIN 2135-96.

Los contenidos de aflatoxinas están por debajo del valor permitido para el maíz de consumo, que es 20ng/g.

Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) por el financiamiento de esta investigación (Proyecto de Grupo N° 7202).

Referencias

- Mazzani C, Borges O, Luzón O, Barrientos V, Quijada P. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatol Venez*. 1999; 12:9-13.
- Payne GA. Aflatoxin accumulation in inoculated ears of field-grown maize. *Plant Dis*. 1998; 72:422-4.
- Ellis W, Smith J, Simpson B. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1999; 30:403-39.
- Bean GA, Echandi R. Maize mycotoxins in Latin America. *Plant Dis*. 1989; 73:597-600.
- Grain Fungal Diseases & Mycotoxin. United States Department of Agriculture (USDA). Grain inspection, packers and stockyards administration; 2006. Disponible en: <http://archive.gipsa.usda.gov/pubs/mycobook.pdf>. Acceso 2 de marzo 2012.
- Norred WP, Voss KA. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J Food Protect*. 1994; 57:522-7.
- Yang CS. Research on esophageal cancer in China: a review. *Cancer Res*. 1980; 40:2633-44.
- Marasas WFO, Wehner FC, Van Rensburg SJ, Van Schalkwyk DJ. Microflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, South Africa. *Phytopathology*. 1981; 71:792-6.
- Wu F. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxin in animal feeds. *Anim Feed Sci Technol*. 2007; 137:363-74.
- Plasencia J. Aflatoxins in maize: a Mexican perspective. *J Toxicol*. 2004; 23:155-77.
- Dowling TS. Fumonisin and its toxic effects. *Cer Foods World* 1997; 42:13-5.
- Cabañas F. Micotoxinas emergentes. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 98:21-7.
- Mazzani C, Borges O, Luzón O, Barrientos V, Quijada P. *Fusarium moniliforme*, *fumonisin* y *Aspergillus flavus* en granos híbridos de maíz en el estado Guárico, Venezuela. *Rev Fac Agron (LUZ)*. 2000; 17:185-95.
- Fernandez M. Incidencia de *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en granos de maíz (*Zea mays* L.) cosechado en pequeñas explotaciones de algunos estados centro-occidentales de Venezuela. Trabajo de Grado. Universidad central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 2006.
- Mazzani C, Luzón O, Chavarri M, Fernández M, Hernández N. *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en maíz cosechado en pequeñas explotaciones y conucos de algunos estados de Venezuela. *Fitopatol Venez*. 2008; 21:18-22.
- Carvajal M, Diaz M, Aristi G, Espinosa J, García A, Mendez I. Presence of free and adducted aflatoxins and hidroxlilated metabolites in human hepatocarcinomas in Mexico. *Proceedings of the VI Latin American Congress of Mycotoxicology and II International Symposium on Algal and Fungal Toxins for Industry*. Merida, Yucatan, Mexico; 2010. pp 30-31.
- Norma Venezolana COVENIN 1337-90. Alimentos. Método para recuento de hongos y levaduras. Comisión Venezolana de Normas Industriales; 1990.
- Norma Venezolana COVENIN 2135-96. Harina de maíz precocida. Comisión Venezolana de Normas Industriales; 1996.
- Samson R, Hoekstra E, Frisvad J, Filteborg O. *Introduction to food borne fungi*. 4th Ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1995.
- Singh K, Frisvad J, Thrane V, Matheur S. *An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergillus, Fusaria and Penicillium and their Mycotoxins*. 1st Ed. Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries; 1991.
- Yong R, Cousin M. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. *Int J Food Microbiol*. 2001; 65:27-38.
- El maíz en la nutrición humana. *Viale Terme di Caracalla, Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*; 1993.
- Astoviza M, Socarras M. Micotoxinas y cáncer. *Rev Cub Invest Biomed*. 2005; 24:54-9.
- Palacio T. Hongos y micotoxinas, contaminantes naturales de gran riesgo para la salud. *Aleph Zero*. 2004; 33:1-9.
- Muriuki GK. Maize flour contaminated with toxigenic and mycotoxins in Kenya. *Af J Health Sci*. 1995; 2:236-41.
- Allotey J, Smpaya MF, Mpuchane S. Insect and mycoflora interactions in maize flour. *Af J Food Agricult Nutr Sci*. 2001; 1: 3-8.
- Flores Y. *Micobiota asociada a la harina de maíz precocida*. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía; 2007.
- García R. *Cuantificación de hongos y micotoxinas en harina de maíz integral*. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía; 2009.
- Chavarri M, Mazzani C, Luzón O, González C, Alezones J, Garrido M. *Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de*

- grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol Venez.* 2009; 22:2-7.
30. Luzón O, Chavarrí M, Mazzani C, Barrientos V, Alezones J. Principales mohos y micotoxinas asociadas a granos de maíz en campos de los estados Guárico, Portuguesa y Yaracuy, Venezuela. *Fitopatol Venez.* 2007; 20:25-30.
 31. Chavarrí M. Evaluation of corn hybrids yellow to *Fusarium verticillioides* in experimental fields of three localities in the Portuguesa State, Venezuela. Proceedings of the VI Latin American Congress of Mycotoxicology and II International Symposium on Algal and Fungal Toxins for Industry. Merida, Yucatan. México; 2010. pp:226-7.
 32. Mazzani C, Luzón O, Beomont P, Chavarrí M. Micobiota asociada a granos de maíz en Venezuela y capacidad aflatoxigénica *in vitro* de los aislados de *Aspergillus flavus*. *Fitopatol Venez.* 2004; 19:10-4.
 33. Raybaudi R, Martínez A. Incidencia e identificación de la micobiota en granos de maíz y comparación de medios de cultivo para la determinación de mohos toxigénicos. *Fitopatol Venez.* 2000; 13:15-8.
 34. Raybaudi R, Mazzani C, Benítez I, Martínez A, Luzón O, González C. Relación entre las concentraciones de hierro, cobre y zinc y la incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en maíz. *Fitopatol Venez.* 2005; 18:15-9.
 35. Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology.* 2004; 94:938-45.
 36. Binder L, Tan L, Chin L, Anld J, Richard J. Worldwide occurrence of micotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; 137:256-82.