

AFLATOXINAS EN MAÍZ: REPORTE DE CASO EN LA COSTA ATLÁNTICA COLOMBIANA

Acuña CA¹, Díaz GJ² y Espitia ME³

Laboratorio de Micología
Centro de Investigaciones Microbiológicas
Universidad de los Andes

Laboratorio de Toxicología
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

Las aflatoxinas son compuestos hepatotóxicos producidos por algunas cepas de hongos del género *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*, que generalmente contaminan granos almacenados. Hasta ahora, la incidencia de aflatoxinas en Colombia se había reportado como moderada (10-30%), con niveles promedio alrededor de los 20 µg/kg. En septiembre del año 2001 se encontró una incidencia muy elevada (100%) y altos niveles de AFBI (>100 µg/kg) en la costa atlántica colombiana, principalmente en el municipio de Cereté (Córdoba), no registrados previamente. El problema afectó 50.000 hectáreas de maíz (*Zea mays*) variedades blanco y amarillo. Un alto porcentaje involucró el híbrido DK 4004 y se presentó una disminución en la producción cercana al 35%. Al analizar la micoflora presente en muestras de lotes de maíz de esta cosecha se encontró una gran diversidad de especies que incluyeron *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamarii*, *A. fumigatus*, *Fusarium moliniforme*, *Rhizopus spp.*, y *Penicillium spp.* Las muestras fueron analizadas para la determinación de aflatoxinas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), dando como resultado elevados contenidos de aflatoxinas. Adicionalmente se comprobó la toxigenicidad de las especies aisladas empleando sustratos y condiciones adecuadas para la producción de aflatoxinas, ocratoxina A y fumonisinas. Los resultados de este estudio demuestran la presencia de hongos micotoxigénicos, presencia asociada a la formación de aflatoxinas en campo.

Palabras claves: maíz, aflatoxinas, contaminación, micotoxinas, *Aspergillus spp.*

AFLATOXINS IN CORN: CASE REPORT IN THE COLOMBIAN ATLANTIC COAST.

ABSTRACT

Aflatoxins are hepatotoxic compounds produced by some fungal strains from the genus *Aspergillus*, and mainly *A. fumigatus* and *A. parasiticus* the commonly contaminate stored grains. Until today, incidence of aflatoxins in Colombia was reported to be moderate (10-30%), with levels ranging 20 µg/kg. In september 2001, a 100% incidence was found in

¹ Universidad de los Andes.

² Universidad Nacional. gjdiazg@unal.edu.co

³ Universidad Nacional.

the Colombian North Atlantic Coast with high levels of AFBI (>100 µg/kg), particularly in Cereté, Córdoba, which were not registered previously. The problem affected 50.000 Ha of corn (*Zea mays*) and a high percentage included the DK4004 variety that registered a reduction in production close to 35%. Analysis of the crop revealed several fungal species including *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamaritii*, *A. fumigatus*, *Fusarium moliniforme*, *Rhizopus spp.*, y *Penicillium spp.* Samples were also taken to detect aflatoxins by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC), which showed high levels of these toxins. The toxigenicity of these aflatoxins was confirmed by culturing the isolated species and establishing appropriate culture conditions to produce Aflatoxins, Ochratoxin A and fumonisin. The results of this study confirm the presence of mycotoxigenic fungi associated with mycotoxin production in the field.

Keywords: corn, aflatoxins, contamination, mycotoxins, *Aspergillus spp.*

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas (AF) son un grupo de metabolitos heterocíclicos sintetizados por los hongos *Aspergillus flavus* (Link), *Aspergillus parasiticus* (Speare) y *Aspergillus nomius*. Estos hongos son constituyentes normales de la micoflora del suelo en áreas tropicales, subtropicales y templadas y sus esporas pueden ser transportadas a través del aire. Entre sus cepas existe una amplia variación en cuanto a su habilidad para producir toxinas. En algunos casos no se detecta la producción de éstas, lo que indica que el crecimiento del hongo no implica necesariamente la formación de aflatoxinas (Díaz, 1996a).

La infestación por hongos y la formación de toxinas se presenta en una gran diversidad de productos agrícolas, tanto a nivel de campo como en áreas de almacenamiento, plantas de procesamiento y distribución. La contaminación de los granos puede ocurrir pre o postcosecha, por condiciones de estrés de la planta o daños producidos por insectos, que permiten la entrada de esporas de hongos y dan lugar a la producción de aflatoxinas (Smith and Moss, 1985; Díaz, 1996a; Sweeney, 1998).

Los hongos producen cuatro aflatoxinas: B₁, B₂, G₁ y G₂. La más común y más tóxica de todas es la AFB₁. En humanos se le atribuye cáncer hepático y en animales puede ocasionar hepatotoxicosis, mutagénesis, cáncer y efectos adversos sobre los parámetros de producción. Recientemente se reportó en Venezuela la muerte de más de 500 mascotas (perros y gatos) por el consumo de alimentos concentrados contaminados con aflatoxinas. La incidencia reportada de aflatoxinas en Colombia oscila normalmente entre el 9 y el 30%, con niveles promedio cercanos a 20 µg/kg y niveles máximos alrededor de 100 µg/kg en muestras aisladas (Céspedes y Díaz, 1997; Díaz *et al.*, 2001). Los niveles máximos de aflatoxinas totales (B₁+B₂+G₁+G₂) permisibles en Colombia en alimentos humanos y animales oscilan entre 10 y 50 µg/kg, dependiendo del sustrato específico (Díaz, 1995).

En septiembre del año 2001 se presentó una incidencia inusualmente elevada de aflatoxinas en la cosecha de maíz del municipio de Cereté, departamento de Córdoba (Colombia). Todas las muestras analizadas provenientes de esta cosecha

se hallaron contaminadas con aflatoxinas, y los niveles de contaminación resultaron muy elevados (cerca de 300 µg/kg). El objetivo del presente estudio fue reportar los niveles de contaminación encontrados, analizar la micoflora presente en las muestras tomadas y determinar el potencial micotoxigénico de esta micoflora. Adicionalmente se buscó identificar algunos factores determinantes de la alta incidencia de aflatoxinas en este brote.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Un total de 11 muestras de maíz cosechado fueron remitidas al Laboratorio de Toxicología de la Facultad Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), según la norma técnica ICONTEC NTC 1232. Se procesaron también una muestra de maíz y una de mazorca con crecimiento fúngico visible. El análisis de la micoflora se hizo mediante el aislamiento y determinación de especies de *Fusarium* y *Aspergillus*. Las muestras, que se homogenizaron y submuestrearon según recomendaciones del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la secretaria de Salud Pública de Bogotá (2001), se sembraron por triplicado en agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de malta (AM) y se incubaron a 25°C de 5 a 7 días. Al cabo de este tiempo se observó el tipo de crecimiento microbiano, se identificaron microscópicamente los géneros de interés, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y se efectuó el aislamiento de cada uno de los géneros. Cuando se obtuvo crecimiento puro de *Fusarium* y *Aspergillus*, se hizo cultivo monospórico en Komada y Agar Czapek (CZ). Una vez obtenido el hongo monospó-

rico se procedió a hacer la identificación de la especie, según los siguientes criterios:

Fusarium: de acuerdo al manual para la identificación de especies de Nelson, Toussoun y Marasas (1983) se observó el crecimiento en PDA y agar hojas de clavel (CLA) y, junto con la correlación de estas observaciones, se determinó la especie.

Aspergillus: según la clave para identificación de especies de Samson y Van Reenen-Hoeskstra (1988) se observó el crecimiento en CZ, AM y, con la correlación de observaciones realizadas y reconocidas, se determinó la especie. Se observó además la producción de un pigmento naranja característico para especies del grupo *A. flavus-parasiticus* en el “agar diferencial *Aspergillus flavus-parasiticus*” AFPA (Pitt, 1983), la producción de AF mediante fluorescencia azul en el medio de coco (Davis, 1987) y la producción de ácido kojico en el medio de Kinoshita (Ramírez, 1994).

Evaluación de la toxigenicidad de las cepas aisladas: en sustratos adecuados se procedió a evaluar la toxigenicidad de las cepas inoculando maíz, sorgo y arroz con 10⁵ conidias (suspensión hecha en agua destilada estéril con Tween 20 al 0,05%) de cada hongo aislado. Luego se adicionó agua destilada estéril hasta obtener la humedad relativa necesaria para cada una y se estandarizaron el tiempo y la temperatura de incubación.

Detección y determinación de micotoxinas: se procedió a realizar la extracción y determinación cuantitativa de las micotoxinas de acuerdo con las técnicas del Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia (Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia) utilizando cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos luego de analizar las muestras provenientes del municipio de Cereté, departamento de Córdoba, durante el mes de septiembre de 2001 se muestran en la figura 1.

Al analizar la microflora presente en las muestras se encontraron los resultados que se presentan en la tabla 1. Se determinó la diversidad fúngica presente y se realizó un conteo de UFC de colonias típicas de *Fusarium spp.* y *Aspergillus spp.*

Tabla 1. Diversidad fúngica en unidades formadoras de colonias (UFC)/g.

Muestra	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>
Maíz	Incontables	Incontables
Mazorca	14x10 ³	22x10 ³

Al identificar a nivel de especie los géneros aislados se encontraron las especies que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Especies halladas en las muestras de maíz provenientes del municipio de Cereté, departamento de Córdoba (Colombia).

Muestra	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>
Maíz	<i>F. moniliforme</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. niger</i>
Mazorca	<i>F. moniliforme</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. tamarii</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. fumigatus</i>

Al realizar las pruebas de toxigenicidad (potencial producción de micotoxinas por las cepas aisladas) se encontró un gran potencial micotoxigénico en las especies aisladas reportadas previamente como toxigénicas. No se evaluó la toxigenicidad de las cepas de *A. niger* y *A. tamarii* aisladas, dado que estas especies no han sido reportadas como toxigénicas. Estos resultados se resumen en la tabla 3.

Figura 1. Concentración de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en muestras de maíz de la cosecha de septiembre de 2001 del municipio de Cereté, departamento de Córdoba (Colombia).

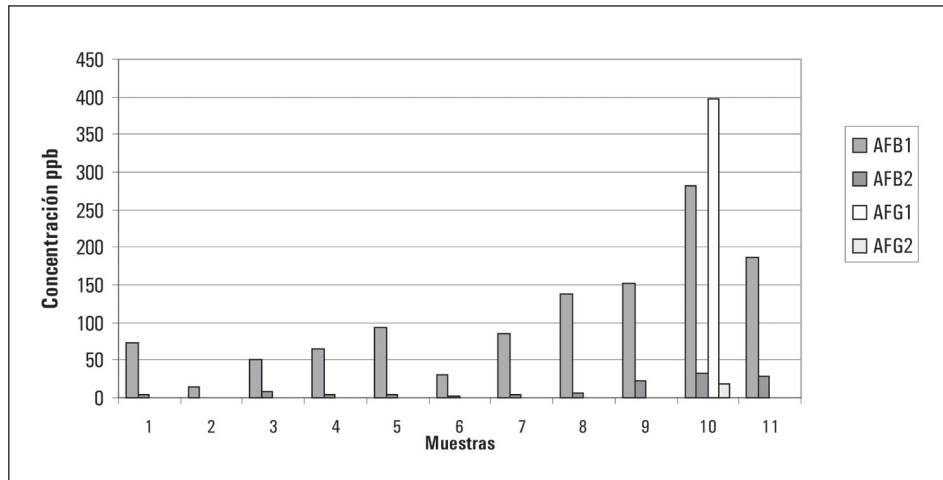


Tabla 3. Potencial micotoxigénico de las especies aisladas.

Micotoxina	Especie	Cantidad producida (mg/kg)
Fumonisinias B ₁ y B ₂	<i>F. moniliforme</i>	FB ₁ 712,5 FB ₂ 186,8
Aflatoxina B ₁ y B ₂	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ 142,0 AFB ₂ 8,0
Acido oxálico	<i>A. niger</i>	Productora (sin cuantificar)
Ocratoxina A	<i>A. ochraceus</i>	No toxigénica
	<i>A. tamarii</i>	No evaluada
	<i>A. fumigatus</i>	No evaluada

DISCUSIÓN

Los resultados analíticos (figura 1) demostraron una incidencia del 100% de contaminación y niveles de aflatoxina B₁ entre 15,2 y 282,6 µg/kg. Estos resultados contrastan con los obtenidos para AFB₁ y AFB₂ en diferentes sustratos, entre los meses de septiembre de 2000 y septiembre de 2001, en el Laboratorio de Toxicología, período en el que en ningún caso el nivel de aflatoxina B₁ sobrepasó los 80 µg/kg y la incidencia global de muestras positivas fue inferior al 30%. Estudios previos realizados en Colombia (Céspedes y Díaz, 1997) no habían registrado concentraciones superiores a 110 µg/kg de AFB₁ y el nivel de positividad en muestras analizadas no sobrepasaba el 30%. Luego de analizar las posibles causas de esta inusual concentración de aflatoxinas presentada en el municipio de Cereté se determinó que los siguientes factores pudieron resultar determinantes:

- **Factores ambientales.** Durante el mes de septiembre de 2001 se presentaron precipitaciones de 378,3 mm, cuando los promedios oscilaban entre 27,2 y 165,9 mm durante los meses anteriores. Es importante anotar que las especies de *Aspergillus* viven en el ambiente y sus esporas son diseminadas por los vientos y las lluvias.

- **Fenotipo de híbridos utilizados.** Presentaban pocas hojas de cobertura que no confluyeron normalmente en el vértice de la mazorca y dejaron una parte expuesta al medio ambiente y a los patógenos. Adicionalmente, el fruto no se inclinó como fisiológicamente sucede en su maduración (6-8°), lo que permitió la entrada de agua lluvia.
- Plagas como el “gusano bellotero” o “cogollero del maíz” (*Spodoptera frugiperda*), que es endémico en la zona, generaron condiciones favorables para el establecimiento del hongo, ya que destruyen los granos, permiten la entrada de esporas de hongos y aumentan la humedad por presencia de larvas.
- Con respecto a la micoflora presente en los dos tipos de muestras evaluadas se encontró la misma especie de *Fusarium*, pero diversas especies de *Aspergillus*. Adicionalmente, se hallaron colonias de *Rhizopus spp.* y *Penicillium spp.* También se encontró que en las muestras de maíz coexistían especies de *F. moliniforme*, *A. flavus* y *A. niger*. Este hecho ratifica lo propuesto por Marín *et al.* (1998), que describen este tipo de interacción y señalan que el *F. moliniforme* es más competitivo en presencia de *A. flavus* y *A. Niger*, pero que también cohabitan, como se muestra en la tabla 2.
- Los ensayos de toxigenicidad realizados a las cepas aisladas demostraron su potencial toxigénico. En los dos tipos de muestras se aisló la misma especie de *F. moliniforme*, que produjo fumonisinias B₁ y B₂. Este hallazgo llevó a analizar una muestra inicial de donde se aisló el hongo y se encontró que estaba contaminada con fumonisina B₁. La cepa de *A. flavus* aislada produjo grandes cantidades de aflatoxinas (más de 1 g de AFB₁ por kg de sustrato) y una cepa de *A. niger* produjo ácido oxálico, compuesto potencialmente nefrotóxico.

CONCLUSIONES

El presente reporte demuestra la ocurrencia natural de aflatoxinas en el campo, hecho inusual en este tipo de micotoxinas, que preferencialmente se forman durante el almacenamiento.

Los principales factores que condujeron a este brote parecen ser una conjunción de hechos que incluyen la elevada pluviosidad, la presencia de plagas y un fenotipo de maíz que se vio afectado por estos dos factores.

El análisis micológico permitió aislar diferentes especies altamente micotoxigénicas acompañadas de otras comunidades fúngicas. Este hecho indica que se debe tener especial cuidado en el control de los factores que pueden desencadenar contaminación fúngica en campo, debido a la presencia normal de hongos potencialmente toxigénicos en la zona.

RECOMENDACIONES

- Es primordial el secado del maíz antes de almacenarlo. Entre las técnicas de secado se encuentran: el secado en capas, secadores portátiles por tandas, secadores de flujo continuo.

- La protección del maíz frente a los hongos y las micotoxinas debe estar encaminada a inhibir el crecimiento y la propagación de *A. flavus* y *A. parasiticus* y a controlar las aflatoxinas después de producidas. Esto último se puede llevar a cabo mediante la adición de adsorbentes especiales.

- Para evitar la propagación de esporas es importante realizar controles con fungicidas adecuados. El uso de inhibidores de crecimiento de hongos, como ácidos orgánicos, es indispensable en granos almacenados.

- Para evitar los efectos tóxicos de las aflatoxinas formadas sobre los animales pueden ser utilizados adsorbentes, como el carbón activado, o algunos tipos de aluminosilicatos (Leeson *et. al.*, 1995).

- Es indispensable realizar monitoreos permanentes para aflatoxinas, con el fin de detectar niveles potencialmente peligrosos y tomar medidas preventivas.

- Se debe establecer un adecuado control de plagas que no interfiera con la producción de maíz.

- Se aconseja seleccionar especies híbridas adaptadas a las condiciones de cada región.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abadía B, Afanador G, Céspedes A y Díaz G. Ocurrencia natural de aflatoxinas en sorgos híbridos cultivados en la microregión del Alto Magdalena, Colombia. Rev. CORPOICA 2: 22-26, 1997.
2. Céspedes A and Díaz G. Analysis of Aflatoxins in Poultry and Pig Feeds and Feedstuffs Used in Colombia. J. AOAC int. 80: 1215-1219, 1997.
3. Davis N, Iyer S and Dienner U. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. App. Env. Microbiol. 53: 1593-1595, 1987.
4. Díaz G, Perilla N and Rojas Y. Occurrence of Aflatoxin in selected Colombian foods. Mycotoxin Research 17: 15-20, 2001.
5. Díaz G. Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Primera parte. Veterinaria al día 2: 28-34, 1996a.
6. Díaz G. Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Segunda parte. Veterinaria al día 2: 3-8, 1996b.
7. Díaz G. Regulación de niveles máximos tolerables de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados. Veterinaria al día 1: 22-27, 1995.
8. Leeson S, Díaz G and Summers J. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University books Guelph. Ontario. Canada, 1995.
9. Marín S, Sanchis V, Rull F, Ramos A and Magan N. Colonization of maize grain by *Fusarium moliniforme* and *Fusarium proli-*

- feratum* in the presence of competing fungi and their impact on Fumonisin production. J. Food Protec. 61: 1489-1496, 1998.
10. Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University, University Park and London, 1983.
 11. Pitt J, Hocking A and Glenn D. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. Parasiticus*. J. App. Bacteriol. 54: 109-114, 1983.
 12. Ramírez S. Determinación de aflatoxina B1 en algunos alimentos listos para consumo. Tesis de Magíster en Microbiología. Universidad de los Andes. 44-52, 1994.
 13. Samson R and Van Reenen-Hoekstra E. Introduction to food-Borne Fungi. 3ª Ed: Centraalbureau voor schimmelcultures. BAARN. Cap. 4. Fungal species and their production of mycotoxins, 1988.
 14. Secretaria de salud. Laboratorio de Salud Pública. Manual de técnicas y procedimientos de análisis microbiológico de alimentos. Capítulos I-IV. Técnicas dadas y estandarizadas por el INS e INVIMA, transcripción de gran parte de dichos procedimientos, que se basan en técnicas recomendadas por organismos internacionales como ICMSE, FDA y FAO, 1998.
 15. Smith J and Moss M. Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance. John Wiley & Sons: New York, 1985.
 16. Sweeney M and Dobson A. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. Int. J. Food Microbiol. 43: 141-158, 1998.