

## Coexistencia de aflatoxinas, zearalenona y deoxinivalenol en alimentos de consumo infantil

### Coexistence of aflatoxins, zearalenone and deoxynivalenol in the foods consumed by children

Rojas C. Liliana, Wilches F. Angela M.

*Facultad Ciencias Básicas, Departamento Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología GIMBIO, Universidad de Pamplona, Km 1 Vía Bucaramanga, Pamplona, Norte de Santander, Colombia*

Recibido 30 de Octubre 2011; aceptado 29 de Noviembre de 2011

#### RESUMEN

---

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos, producidos en la etapa final del crecimiento exponencial de una colonia fúngica, que provocan cambios patológicos tanto en seres humanos como animales. Pueden ser producidas antes o después de la cosecha, durante el almacenaje, transporte, procesamiento o en el momento de ser utilizados en alimentación. Se evaluó la coexistencia de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2), zearalenona y deoxinivalenol en muestras de alimentos de consumo infantil comercializados en Pamplona, Norte de Santander. Se aplicaron técnicas analíticas estandarizadas en el Laboratorio de Toxicología (Facultad de Medicina Veterinaria) de la Universidad Nacional de Colombia, basadas en técnicas reconocidas por la Asociación Oficial de Química Analítica de los Estados Unidos (AOAC) para análisis de alimentos. La coocurrencia de aflatoxina + zearalenona en alimentos de consumo infantil analizados en el presente estudio fue del 3.33% (1/30). La coexistencia de aflatoxinas y deoxinivalenol en los mismos sustratos fue de 6.67% (2/30). La coocurrencia de zearalenona + deoxinivalenol en alimentos destinados a la población infantil fue de 3.33% (1/30). La presencia de aflatoxinas + zearalenona + deoxinivalenol en forma simultánea fue del 3.33% (1/30) en

\*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: olrojas@unipamplona.edu.co

---

*alimentos de consumo infantil. Las micotoxinas pueden causar efectos adversos en la salud humana, por lo que se recomienda controlar su presencia en los alimentos de consumo infantil, mediante la utilización de métodos preventivos (aplicación de buenas prácticas agrícolas, control biológico) que eviten el crecimiento de hongos toxicogénicos o a través de sistemas de descontaminación y detoxificación en el alimento.*

**Palabras claves:** *aflatoxinas, alimentos infantiles, cromatografía, deoxinivalenol, zearalenona.*

## **ABSTRACT**

---

*Mycotoxins are fungal secondary metabolites produced in the final stage of exponential growth of a fungal colony which cause pathological changes in both humans and animals. They can be produced before or after harvest, during storage, transport, processing or at the moment of being used in feeding. It was evaluated the coexistence of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2), zearalenone and deoxynivalenol in child food samples commercialized in Pamplona, Norte de Santander. Analytical standardized techniques were applied in the Toxicology Laboratory (Faculty of Veterinary Medicine) of the National University of Colombia, based on techniques recognized by the Association of Official Analytical Chemistry of the United States (AOAC) for food analysis. The co-occurrence of aflatoxin + zearalenone in analyzed children's food in this study was 3.33% (1/30). The coexistence of aflatoxins and deoxynivalenol on the same substrates was 6.67% (2/30). The co-occurrence of zearalenone + deoxynivalenol in children's food was 3.33% (1/30). The presence of aflatoxins + deoxynivalenol + zearalenone simultaneously was 3.33% (1/30) in children's food. Mycotoxins can cause adverse effects on human health, so it is recommended to control their presence in children's food, using preventive methods (application of good agricultural practices, biological control) to prevent the growth of toxigenic fungi or through systems of decontamination and detoxification in the food.*

**Keywords:** *aflatoxins, children's food, chromatography, deoxynivalenol, zearalenone.*

## INTRODUCCIÓN

En el momento actual, el riesgo toxicológico asociado con las micotoxinas se ha convertido en un aspecto central del problema de la invasión fúngica de los cultivos o de los granos almacenados (De Vries *et al.*, 2002). Son muy importantes en salud pública y en salud animal, debido a que pueden causar efectos adversos en el hombre y en los animales. Los efectos de las micotoxinas incluyen diversos tipos de cáncer, disminución de la respuesta inmune, trastornos hormonales, lesiones hepáticas y renales, entre otras.

Las Aflatoxinas (AFLAS), constituyen un grupo muy relacionado de metabolitos heterocíclicos sintetizados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Palmgren *et al.*, 1987). Hasta el momento han sido identificadas 20 aflatoxinas diferentes, sin embargo únicamente las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se originan de manera natural. Las demás aflatoxinas (M1, M2, P1, Q1, aflatoxicol, etc.) ocurren como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Smith *et al.*, 1991). La Aflatoxina B1 es considerada el compuesto biológicamente más activo de la familia de las aflatoxinas y se presenta en un número importante en alimentos para animales así como también en maíz, algodón y maní. Ocasionalmente, *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden colonizar pequeños granos de cereales como cebada, avena y trigo, y producir niveles de aflatoxinas de bajos a moderados.

La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, 1993) ha establecido que son las aflatoxinas cancerígenas para los seres humanos. Además de los trabajos experimentales con sistemas modelo,

los estudios epidemiológicos demuestran que existe una estrecha correlación entre la ingesta de aflatoxinas en distintas poblaciones y la incidencia de cáncer hepático. Entre otros efectos presuntamente relacionados con las aflatoxinas están el Síndrome de Reye y Kwashiorkor. La Zearalenona (ZEA) es un metabolito producido por numerosas especies de *Fusarium*, un compuesto con actividad hormonal. Es considerada una micotoxina dado que su presencia en raciones contaminadas con hongos con frecuencia originó un síndrome estrogénico en cerdos y otros animales de granja (Smith *et al.*, 1991; Leeson *et al.*, 1995). La zearalenona es sintetizada por cepas del género *Fusarium*, principalmente por el hongo de campo *Fusarium roseum* (Wentz *et al.*, 1981, Long *et al.*, 1989) o *Fusarium graminearum* como estado conidial de *Gibberella zeae* (Jurado, 1989; FAO, 2003). Otras especies productoras de la toxina son *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* y *F. semitectum*. Estos hongos requieren alta disponibilidad de agua en el sustrato. Son en su mayoría fitopatógenos, capaces de invadir los cultivos en el campo, pero crecen limitadamente en granos almacenados. La zearalenona aparece con frecuencia en el maíz, en algunos casos en concentraciones bastante altas (Wentz *et al.*, 1981). También se ha detectado en otros granos (trigo, avena, cebada, sorgo, mijo) heno, ensilados y alimentos balanceados (Jelinek *et al.*, 1989; Díaz, 1996).

Biológicamente la ZEA se puede considerar como un “estrógeno xenobiótico”, es decir, una sustancia que tiene la capacidad de actuar sobre los receptores estrogénicos en los tejidos animales o humanos, produciendo

una respuesta similar a la de las hormonas que existen en el organismo. Los efectos tóxicos más importantes de esta toxina se deben a su acción sobre los receptores estrogénicos, que si son estimulados en exceso dan lugar a hiperestrogenismo, con consecuencias dañinas para el sistema reproductivo (Farnworth *et al.*, 1981). Esta micotoxina se ha reportado como un posible factor involucrado en cáncer de cerviz y telarquia prematura (Blunden *et al.*, 1991). La ZEA es la segunda micotoxina más frecuentemente reportada en Estados Unidos y Canadá (después del deoxinivalenol) y puede presentarse conjuntamente con esta micotoxina (Díaz, 1996). No se ha observado sinergismo toxicológico entre la zearalenona y los tricotecenos, aunque ambos pueden estar presentes en el alimento (Smith *et al.*, 1995).

Deoxinivalenol (DON) constituye una familia numerosa de compuestos estructural-

mente relacionados, producidos por diversos géneros de hongos tales como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma* (Beremand *et al.*, 1992). Los más importantes en los alimentos son los producidos por *Fusarium* y entre ellos, los aislados como contaminantes naturales e involucrados en micotoxicosis que afectan al hombre y a los animales. El principal síndrome que provoca es el gastroentérico. El deoxinivalenol, actúa sobre el sistema nervioso central causando un síndrome emético y rechazo del alimento. Las manifestaciones habituales de la intoxicación por tricotecenos consisten en inmunodepresión y náuseas, a veces acompañadas de vómitos.

El objetivo general del estudio se centró en determinar la coexistencia de aflatoxinas, zearalenona y deoxinivalenol en alimentos de consumo infantil.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### *Muestras*

Se analizaron un total de 30 muestras comerciales distribuidas así: al 73% (22) nacionales y 27% (8) venezolanas.

### *Análisis*

Las técnicas utilizadas en el estudio fueron desarrolladas y/o estandarizadas en el laboratorio de toxicología (Facultad de Medicina Veterinaria) de la Universidad Nacional de Colombia, basadas en técnicas reconocidas por la AOAC para análisis de alimentos y en el método descrito por Trucksess *et al.*, 1994.

### *Aflatoxinas*

Fueron extraídas con una mezcla de acetonitrilo:agua (84:16) y purificadas con una columna Micotox<sup>®</sup> 2006 según el método descrito por Wilson y Romer (1991). Luego de adicionar al extracto el reactivo de derivatización (ácido trifluoroacético/ácido acético/agua; 2:1:7), se llevó a baño termostataado (65°C) por 10 minutos. El cromatógrafo empleado (Shimadzu LC – 9A) consta de: bomba cromatográfica LC – 9A, horno CTO – GA 50°C, detector de fluorescencia FLD – GA de longitudes de onda fijas. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna analítica: Merck LiChroCART<sup>®</sup> 125 – 4 HPLC – Cartridge LiChrospher<sup>®</sup>

100 RP – 18 (5 µm), a una temperatura de 30°C; precolumna: Merck LiChroCART® 4 – 4 HPLC – Guard column LiChrospher® 100 RP – 18 (5 µm); fase móvil: Agua: MeOH (60:40), flujo: 0.6 ml/min. El orden de aparición fue el siguiente: AFG1 (AFG2a), AFB1 (AFB2a), AFG2, AFB2; los tiempos de retención aproximados fueron: AFG1 4.4 min., AFB1 6.2 min., AFG2 8.8 min., AFB2 13.9 min.

### **Zearalenona**

La técnica analítica es similar a la de aflatoxinas, se hizo igualmente a través de HPLC según el método reportado por Bennet *et al.*, (1985). En un recipiente de vidrio se mezclaron 50 g de muestra con 100 mL de acetonitrilo:agua (84:16). Se homogenizó durante tres minutos en una licuadora. Se filtró a través de papel cualitativo rápido, se recogieron 5 mL del filtrado en un tubo de ensayo de 10 mL, se adicionaron 25 µL de ácido acético glacial y se agitó en vórtex. Se insertó el extremo con el tapón de caucho de una columna Micotox® 2006 en el tubo de ensayo y se presionó hasta obtener aproximadamente 1 mL de extracto purificado. Con la ayuda de una pipeta, se homogenizó el extracto obtenido al interior de la columna succionando y eliminando varias veces el contenido. Se pipeteó exactamente 0.5 mL de extracto filtrado a un vial y se adicionaron 0.5 mL de agua grado HPLC. Se inyectaron 50 µL en el cromatógrafo de líquidos. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: cromatógrafo Shimadzu LC – 9A, bomba cromatográfica Shimadzu LC – 9A, autosampler SIL - GB, volumen de inyección: 50 µL, horno CTO - GA (50° C), detector de fluorescencia de longitudes de onda fijas FLD – GA (excitación: pico a 350 nm, bomba espectral: 330 - 360 nm, banda de emisión:

450 - 800 nm), integrador: Shimadzu CR4 – A, fase móvil: H3PO4 0.01 M:acetonitrilo (60:40), flujo: 0.8 mL/min., columna: Merck LiChroCART® 125 - 4 HPLC - Cartridge LiChrospher® 100 RP - 10 (5 µm), precolumna: Merck LiChroCARTR 4 - 4 HPLC - Guard column LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), tiempo de retención aproximado: 11.32 min.

### **Deoxinivalenol**

En un recipiente de vidrio de 250 mL, se mezclaron 25 g de muestra molida con 100 mL de CH3CN: agua (84:16), se homogenizó la muestra y el solvente durante tres minutos en una licuadora a alta velocidad. Se filtró a través de papel cualitativo y se colectaron cerca de 5 mL del filtrado en un tubo de ensayo de 15 x 85 mm. Se insertó muy lentamente el extremo con el tapón de caucho de una columna para tricotecenos (Micotox® 2005) en un tubo de ensayo y se presionó hasta obtener aproximadamente 2 mL de extracto purificado al interior de la columna. Se pipeteó exactamente 2 mL del extracto purificado en un tubo de ensayo y se evaporó a sequedad mediante vacío y calentamiento (55°C). Se redisolvió el residuo seco con 1 mL de fase móvil (agua: metanol: acetonitrilo, 90:5:5). Se filtró a través de membrana Millipore de 0.45 µm de diámetro de poro y se inyectaron 50 µL en el cromatógrafo de líquidos. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: cromatógrafo Shimadzu, bomba cromatográfica LC – 9A, inyector automático SIL – GB, system controller SCL – GB, horno CTO - GA (35°C), detector ultravioleta SPD - GAV 220 nm, integrador: Shimadzu CR4 – A, fase móvil: agua: acetonitrilo: metanol (90:5:5), flujo: 0.6 mL/min, columna: Merck LiChroCART® 125 - 4 HPLC - Cartridge LiChrospher® 100 RP -18 (5 µm), tiempo de retención aproximado: 10.097 min.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la Figura 1 se presentan los resultados de la cuantificación de aflatoxinas (B1) y totales, deoxinivalenol y zearalenona.

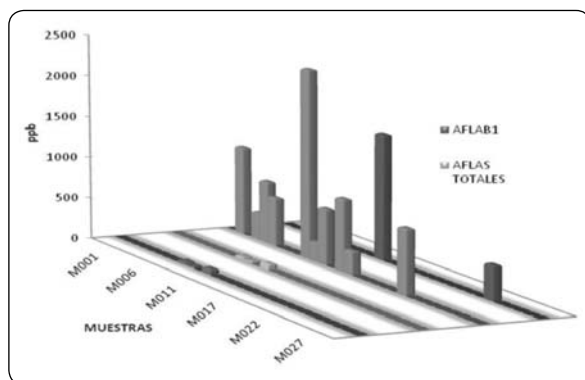


Figura 1. Resultados aflatoxinas (B1) y totales.

La coocurrencia de aflatoxina + zearalenona en alimentos de consumo infantil analizados en el presente estudio fue del 3.33% (1/30). La coexistencia de aflatoxinas y deoxinivalenol en los mismos sustratos fue de 6.67% (2/30). Resultados obtenidos en estudios realizados en Colombia muestran que la ocurrencia de aflatoxinas es baja (8,9%) en comparación con países como India, sin embargo la presencia de niveles de aflatoxinas en maíz y sus productos de convierten en un problema de salud pública debido a los altos valores encontrados (Díaz, *et al.*, 2001). La coocurrencia de zearalenona + deoxinivalenol en alimentos destinados a la población infantil fue de 3.33% (1/30). La presencia de aflatoxi-

nas + zearalenona + deoxinivalenol en forma simultánea fue del 3.33% (1/30) en alimentos de consumo infantil; superior a la coocurrencia presentada en alimentos terminados para aves y cerdos en Colombia 2.2% (1/46), Céspedes, 1997. Dicha coocurrencia fue más baja en el trabajo realizado en la India, en donde la incidencia fue tan solo del 0.5% (2/387). No se reportan estudios sobre incidencia de aflatoxinas solas y asociadas con zearalenona y/o deoxinivalenol en alimentos de consumo humano. Sin embargo, el trabajo desarrollado en el Laboratorio de micotoxinas del departamento de Botánica de la Universidad de Bha-galpur en la India, (Ranjan y Sinha, 1991), quienes analizaron a nivel experimental la concurrencia de aflatoxinas con zearalenona, ocratoxina A, esterigmatocistina y citrinina en alimento concentrado para aves y para otros animales. En este estudio, se lograron aislar cepas de hongos micotoxigénicos como *Aspergillus ochraceus*, *A. versicolor*, *Penicillium citrinum* y *Fusarium moniliforme*; además, aislaron de muestras de alimentos para animales junto a las aflatoxinas presentes en el 35,9% (139/387), zearalenona, ocratoxina A y citrinina, solas o como contaminantes simultáneos de las aflatoxinas. Sin embargo, estos resultados son a nivel experimental y no de coexistencia de micotoxinas en contaminación natural.

---

## CONCLUSIONES

---

La incidencia de aflatoxinas en alimentos infantiles comercializados en Pamplona fue del 10%, superando el nivel máximo permisible por la legislación colombiana (10 µg/kg) y por la establecida por la Unión Europea (0,10 µg/kg). El 6.67% de las muestras analizadas

no cumple con los requisitos estipulados por la FDA (20 µg/kg). El 6,67 de las muestras presentan niveles detectables de zearalenona, superando el valor máximo permisible por la Unión Europea (20 µg/kg).

La mayor incidencia la presentó deoxinivalenol 33,33%, superando el valor máximo permisible por la Unión Europea (200 µg/kg). De las posibles combinaciones de contaminación simultánea con micotoxinas la mayor incidencia correspondió a la presencia

de aflatoxinas y deoxinivalenol (6.67%). La coocurrencia de aflatoxina y zearalenona fue del (3.33%). Igual porcentaje de incidencia presentó zearalenona y deoxinivalenol en alimentos destinados a la población infantil.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennett, GA, Shotwell, OL and Kwolek, WF. (1985). Liquid Chromatographic Determination of a-zearalenol and zearalenone in com: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68: 958 – 961.
- Beremand, MN, McCormick, SP. (1992). Biosynthesis and regulation of trichothecene production by *Fusarium* species. pp. 359 – 384. En: *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 5. BHATNAGAR D. *et al.*, eds. Marcel Dekker. New York.
- Blunden, G, Roch, OG, Rosers, DJ, Coker, RD, Bradburn, N and John, AE. (1991). Mycotoxins in Food. *Medical Laboratory Sciences*, 48: 271 – 282.
- Céspedes, AE and Díaz, GJ. (1997). Analysis of aflatoxins in poultry and pig feeds and feedstuffs used in Colombia. *Journal of the AOAC International*, 14: 74 – 82.
- De Vries, JW, Trucksess, MW and Jackson, LS. (2002). Mycotoxins and Food Safety (Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol.504). Kluwer Academic-Plenum Publishers. New York.
- Díaz, GJ. (1996). Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. *Veterinaria al Día*, Primera parte 2 (1): 28 - 34.
- Díaz, GJ, Perilla, NS and Rojas, Y. (2001). Ocurrance of aflatoxins in selected Colombian Foods. En: *Mycotoxins Research Vol 17*: 15 -20.
- Farnworth ER, Trenholm HL. (1981). The effect of acute administration of the mycotoxin zearalenone to female pigs. *J Environ Sci Health B.*; 16: 239-52.
- FAO. (1991). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Alimentación y nutrición. Manual para el control de calidad de los alimentos. 10: Capacitación en análisis de micotoxinas. p. 144.
- Gear JR, Álvarez AH, Depetris GJ, Cortamira NO, Pita MML, Vartorelli F, *et al.* (2006). Maíz y Nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Recopilación de ILSI Argentina. Serie de informes Especiales. Volumen II.
- Guengerich FP, Johnson WW, Ueng YF, and Shimada T. (1996). Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ. Health Perspect.* 104, 557-562.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1993). Aflatoxins. Summaries and Evaluations. Vol 56, p. 245.
- Jelinek, CF, Pohland, AE and Wood, GE. (1989). Review of Mycotoxin Contamination Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feed – An Update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72 (2): 223 – 230.
- Jurado, R. (1989). Toxicología Veterinaria. Segunda Edición. Salvat. Madrid, España. p. 618.
- Leeson, S, Díaz, G and Summers, JD. (1995). Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. University Books. Guelph, Ontario, Canadá. p. 352.
- Long, GG and Diekman, MA. (1989). Effects of zearalenone on early pregnancy in guinea pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 50 (8): 1220 – 1223.
- McMullen, M, Jones, R, Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81, 1340-1348.
- Palmgren, MS and Hayes, AW. (1987). Aflatoxins in Food. *Mycotoxins in Food*. Cap 4: 65 – 94.
- Eley R. (1992). Intoxicaciones Alimentarias de Etiología Microbiana. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Ranjan, KS and Sinha, AK. (1991). Ocurrance of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Animal Feed from Bihar, India. *J. Sci. Food Agric.*, 56: 39 47.
- Smith, JE y Ross, K. (1991). The toxigenic *Aspergilli*. p. 101-108. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. SMITH J, HENDERSON R, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Trucksess, MW, Stack, ME and Nesheim, S. (1994). Multifunctional Column Coupled with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Com, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts, and Pistachio Nuts: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 77 (6): 1512 – 1521.
- Wentz, I, Silveira, PRS, Sobestiansky, J, Dos Santos, CRM. and Rees, U. (19819). Fusariotoxicose e Estrogenismo em Suínos. *EMBRAPA*. Comunicado Técnico (24): 1 – 3.