

Capítulo 10

Micotoxinas en los DDGS

Introducción

Al igual que todos los ingredientes de alimentos balanceados, los granos de destilería pueden a veces contener ciertas cantidades de micotoxinas que pueden afectar de forma negativa el desempeño animal o pueden llegarse a producir y almacenarse bajo condiciones que causen crecimiento de hongos y producción de dichos compuestos.

Las micotoxinas pueden estar presentes en los DDGS si el grano entregado a la planta de etanol está contaminado con ellas. Las micotoxinas no se destruyen durante el proceso de producción de etanol, ni tampoco se destruyen mediante el proceso de secado para producir los DDGS. De hecho, si las micotoxinas están presentes en el maíz, se van a concentrar tres veces en los DDGS. No obstante, es muy bajo el riesgo de contaminación de micotoxinas en los DDGS de EUA, porque es poco común en la mayoría de las principales regiones de cultivo de maíz en ese país que tengan condiciones climáticas que conduzcan a la producción de micotoxinas. Además, la mayor parte de las plantas de etanol monitorean la calidad del grano y rechazan fuentes que estén contaminadas con estas micotoxinas.

Posibles micotoxinas en el maíz y los DDGS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos que pueden afectar negativamente la salud, el crecimiento y la reproducción de los animales, en especial el ser humano y los animales domésticos. Las aflatoxinas, incluyen a la aflatoxina B1, B2, G1 y G2, y son las más tóxicas y carcinógenas de las micotoxinas conocidas, las cuales están producidas por varias especies de *Aspergillus*. El maíz es susceptible a la formación de aflatoxinas bajo condiciones de sequía durante la temporada de cultivo, en condiciones de alta humedad o de almacenamiento con humedad alta (Richard, 2000).

Fusarium graminearum es el principal hongo productor de deoxinivalenol en granos en EUA (CAST, 2003). El deoxinivalenol (a veces conocido como DON o vomitoxina) puede coexistir con otras micotoxinas, tales como la zearalenona. El *Fusarium graminearum* sobrevive en residuos viejos infestados que permanecen en el campo de la temporada anterior de cultivo, para lo cual le son favorables las condiciones frías y húmedas para que crezcan los hongos en el maíz. Generalmente, no se considera el almacenamiento como una posible fuente de contaminación de deoxinivalenol, si el maíz estaba maduro y almacenado a un nivel de humedad menor al 14% (Richard, 2000).

El *Fusarium verticillioides* es el principal hongo capaz de producir las fumonisinas FB1, FB2 y FB3 (Gelderblom et al., 1988). El maíz es el principal grano afectado por este hongo. Se desconocen las condiciones específicas necesarias para la producción de fumonisinas, pero se ha indicado que parece ser importante el estrés de la sequía seguido de clima cálido y húmedo durante la floración. El *Fusarium verticillioides* está presente en prácticamente cada semilla y

también en la planta de maíz a lo largo del crecimiento, y a veces hay una cantidad considerable de fumonisinas presentes en los granos de maíz asintomáticos. Ya que fue muy reciente (1988) el descubrimiento de esta micotoxina, hay muy poca información con respecto a su producción, así como de los posibles efectos negativos sobre la salud y desempeño de los animales (Richard, 2000).

El *Fusarium sporotrichioides* es el principal hongo responsable de la producción de la toxina T-2; es miembro de los metabolitos fúngicos conocidos como tricotecenos. La producción de T-2 es mayor bajo condiciones de un aumento de la humedad y de temperaturas de 6 a 24° C (CAST, 2003).

La zearalenona es un metabolito fúngico estrogénico, cuyo principal hongo responsable de producirla es el *Fusarium graminearum*. Las condiciones húmedas y frías en el crecimiento son favorables para que este hongo crezca y son las mismas condiciones ideales para la producción del deoxinivalenol. Para evitar la producción de zearalenona, es importante mantener el contenido de humedad del grano y sus coproductos en menos de 14%.

Pruebas de micotoxinas

Desde la década de 1960, se han desarrollado muchos métodos analíticos para analizar las micotoxinas en alimentos para consumo humano y animal, debido a la preocupación de la toxicidad en la salud humana (Trucksess, 2000). Entre ellos se encuentran el método de cromatografía de capa fina (TLC), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y los métodos basados en inmunosensores, que se han utilizado ampliamente para una determinación rápida, mientras que la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) con detección de fluorescencia (FD) y la detección de espectrometría de masas (MS) se han utilizado como métodos confirmatorios y de referencia (Krska et al, 2008). No obstante, debido a la necesidad de métodos rápidos, precisos y más económicos en sitio para la determinación de micotoxinas, en el **cuadro 1** se muestran los equipos de análisis aprobados para uso en DDGS por la Administración de Corrales, Empacadores e Inspección de Granos (GIPSA) del Departamento de Agricultura de EUA.

(<http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area=home&subject=lr&topic=hb>).

Cuadro 1. Equipos de análisis de micotoxinas para DDGS (aprobados por GIPSA).

Marcas	Fabricante	Intervalo de prueba	Formato de prueba	Extracción	Limpieza
Aflatoxinas					
Veratox Aflatoxin	Neogen Corporation	5-50 ppb	Ensayo de placa microtituladora	Metanol/agua (70 + 30)	ELISA
Ridascreen FAST SC	R-Biopharm	5-100 ppb	Ensayo de placa microtituladora	Metanol/agua (70 + 30)	ELISA
Aflatest	Vicam	5-100 ppb	Columna de inmovilización	Metanol/agua (80 + 20)	Columna de afinidad
FluroQuant® Afla IAC	Romer	5-100 ppb	Fluorometría	Metanol/agua (80 + 20)	Columna de afinidad
Fumonisin					
AgraQuant Total Fumonisin 0.25/5.0	Romer	0.5-5 ppm	ELISA competitiva directa	Metanol/agua (70 + 30)	ELISA
Zearalenona					

ROSA® Zearalenone	Charm Sciences, Inc.	50-1000 ppb	Banda de flujo lateral	Metanol/agua (70 + 30)
----------------------	-------------------------	-------------	------------------------	---------------------------

Zhang et al., 2009

Estos métodos son para detección de una sola micotoxina, permiten la facilidad de operación y son cuantitativamente sensibles, lo que permite un alto proceso de muestras. Hay seis métodos aprobados por GIPSA para analizar micotoxinas en DDGS (cuatro métodos para aflatoxina, uno para fumonisina y otro método más para zearalenona).

Cuando se considera el análisis de DDGS de contaminación de micotoxinas, es esencial utilizar procedimientos analíticos aprobados para obtener resultados precisos. El método preferido para determinar la presencia y nivel de micotoxinas en alimentos para animales es la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Con el uso del HPLC y una gran variedad de detectores, se pueden separar y detectar la mayoría de la micotoxinas en los alimentos para animales (Krska et al, 2008). En el **Cuadro 2** se describen los métodos utilizados por los principales laboratorios de análisis de DDGS en EUA, los cuales han sido validados por laboratorios individuales y recientemente publicados en revistas científicas arbitradas.

Cuadro 2. Métodos de pruebas de micotoxinas en alimentos para animales.

Objetivo	Pruebas	Límites de detección	Referencia
Aflatoxinas			
Maíz, almendras, nueces de Brasil, cacahuates (maní) y pistaches	HPLC – FD	5 – 30 ppb	AOAC 994.08
Deoxinivalenol			
Cereales y productos de cereales	HPLC – UV	0.1 ppm (límite de detección)	MacDonald et al., 2005a
Fumonisin			
Maíz y hojuelas de maíz	HPLC – FD	0.5 – 2 ppm	AOAC 2001.04
Maíz y materias primas de maíz	Cromatografía de capa fina (TLC)	0.1 ppm (límite de detección)	Rottinghaus et al., 1992
T-2			
Alimentos para consumo humano y animal	Cromatografía de capa fina (TLC)	0.1 ppm (límite de detección)	Romer, 1986
Zearalenona			
Maíz, trigo y alimentos balanceados	Ensayo de placa microtituladora	0.8 ppm (límite de detección)	AOAC 994.01
Cebada, harina de maíz y trigo, polenta y alimentos para bebés de maíz	HPLC – FD	0.05 ppm (límite de detección)	MacDonald et al., 2005b
Aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisina, T-2, zearalenona			
Alimentos para consumo humano y	LC/MS/MS	Aflatoxinas (1 – 100 ppb);	Sulyok et al., 2007

animal	Deoxinivalenol, (1, 1000 ppb) Fumonisina (16 – 3,200 ppb); T-2, (2 – 1,000 ppb); Zearalenona (20 – 1,000 ppb);
--------	---

Adaptado de Zhang et al. (2009).

Niveles tolerables máximos de micotoxinas en alimentos para animales

La FDA de EUA ha establecido niveles tolerables máximos de aflatoxinas (**cuadro 3**), deoxinivalenol (**cuadro 4**) y fumonisina (**cuadro 5**) en ingredientes para varios tipos de alimentos para animales. No se han publicado niveles de medidas, niveles de notificación o niveles de lineamientos por la parte de la FDA para la toxina T-2 y la zearalenona.

Cuadro 3. Niveles de medidas de la FDA para aflatoxina en alimentos completos e ingredientes de alimentos balanceados¹.

Animales	Niveles de medidas (ppb)
Ganado de engorda establecido en finalización	300
Cerdos en finalización (> 45.4 kg o 100 lb)	200
Ganado reproductor, cerdos reproductores o aves maduras	100
Animales inmaduros, ganado lechero o de uso desconocido	20

¹ Zhang et al., 2009.

Cuadro 4. Niveles de medidas de la FDA para deoxinivalenol en alimentos completos e ingredientes de alimentos balanceados¹.

Animales	Niveles de notificación (ppm)
Ganado en rumia y ganado de engorda establecido mayor de 4 meses, así como pollos con recomendación adicional de que estos ingredientes no excedan el 50% de la dieta	10
Todos los otros animales con la recomendación adicional de que estos ingredientes no exceda el 40% de la dieta	5
Cerdos con la recomendación adicional de que estos ingredientes no excedan el 20% de la dieta	5

¹ Zhang et al., 2009.

Cuadro 5. Niveles de medidas de la FDA para fumonisina en alimentos completos e ingredientes de alimentos balanceados.¹

Animales	Niveles de lineamientos recomendados (ppm)
Aves para sacrificio, no más del 50% de la dieta	100
Rumiantes de más de 3 meses destinados al sacrificio y visones para producción de pieles, no más del 50% de la dieta	60
Rumiantes, aves y visones reproductores, no más del 50% de la dieta	30
Cerdos y bagres, no más del 50% de la dieta	20
Todas las otras especies o clases de ganado y mascotas, no más del 50% de la dieta	10
Équidos y conejos, no más del 20% de la dieta	5

¹ Zhang et al., 2009.

Presencia y concentraciones de micotoxinas en DDGS de EUA

Zhang et al. (2009) realizaron una amplia revisión de literatura de los estudios publicados y muestras evaluadas de tres grandes juegos de datos de muestras de DDGS para determinar el grado y nivel de contaminación de micotoxinas entre las fuentes de DDGS de EUA. En general, las concentraciones de todas las micotoxinas en los DDGS estuvieron por debajo de los niveles de medidas de la FDA. Sólo hubo un par de excepciones, en las que las concentraciones de deoxinivalenol o fumonisinas estuvieron en, o ligeramente arriba, de las recomendaciones para especies seleccionadas de animales sensibles, en cuyos casos la tasa de aparición fue menor a 10% de todas las muestras analizadas; dichas concentraciones estuvieron por debajo de cualquier concentración dañina cuando los DDGS se añadían con otros ingredientes para conformar la dieta animal completa.

Caupert et al. (2011) publicaron concentraciones de micotoxinas adicionales de los DDGS de múltiple estudios y concluyeron que todas las concentraciones de micotoxinas en los DDGS estuvieron generalmente por debajo de la reglamentación de la FDA de las micotoxinas específicas. Solamente en un par de casos en los que las concentraciones de deoxinivalenol o fumonisinas estuvieron en, o ligeramente arriba, de las recomendaciones de especies animales sensibles y en cuyos casos la aparición fue de menos del 10% de las muestras analizadas. Estas concentraciones estarían muy por debajo de cualquier concentración dañina cuando los DDGS se mezclan con otros ingredientes para conformar la dieta animal completa.

Bibliografía

AOAC 2001.6, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th Edition, Chapter 49, 32-33.

AOAC 2001.04 *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th Edition.

AOAC 2004 *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 21st Edition.

AOAC 994.01, 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition, Chapter 49, 56-59.

AOAC 994.08, 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition, Chapter 49, 26-27.

Boyles, S. 2007. Distillers Grains with Solubles. OSU Extension Beef Team, BEEF Cattle Letter. 551.

CAST. 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report No. 139. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology

Caupert, J., Y. Zhang, P. Imerman, J.J. Richard, and G.C. Shurson. 2011. Mycotoxin Occurrence in DDGS. In: Distiller's Grain – Production, Properties, and Utilization. Pp. 215-229. Published by Newgen Imaging Systems, Ltd.

Páginas web de la FDA:

Aflatoxinas en alimentos balanceados y sus ingredientes:
<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fdaact.html#afla>

Fumonisin en alimentos balanceados y sus ingredientes:
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html>

Deoxinivalenol (DON) en alimentos balanceados y sus ingredientes:

<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/grainqui.html>

- Gelderblom, W. C. A., A. K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, and N. P. J. Kriek. 1988. Fumonisin: Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1806–1811.
- Krska R, G. Stubbings, R. Macarthur, C. Crews. 2008. Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 563-576.
- MacDonald, S.J., D. Chan, P. Brereton, A. Damant, and R. Wood. 2005a. Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *J. AOAC International* 88(4): 1197-1204.
- MacDonald, S.J., S. Anderson, P. Brereton, R. Wood, and A. Damant. 2005b. Determination of zearalenone in barley, maize and wheat flour, polenta, and maize-based baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *J. AOAC International* 88(6): 1733-1740.
- Richard, J. 2000. Mycotoxins—An overview. *Romer Labs' Guide to Mycotoxins. Romer Labs Guide to Mycotoxins* Vol. 1.
- Romer, T.R. 1986. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc of Official Analytical Chemists* 69 (4), 699-703.
- Rottinghaus, G.E., Coatney, C.E. and Minor, H.C. 1992. A rapid, sensitive, thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 326-329.
- Sulyok M., R. Krska, R. and R. Schuhmacher. 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 1505-1523.
- Trucksess, M.W. (2000). Natural Toxins. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th Edition. Chapter 49, 1 – 2.
- Página web de la University of Minnesota: www.ddgs.umn.edu
- Página web de GIPSA del USDA: <http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area=home&subject=lr&topic=hb>
- Zhang, Y., J. Caupert, J. Richard, P. Imerman and J. Shurson, 2009. Scientific Overview of Mycotoxins in DDGS. *J. Ag. Food Chemistry* (in press).