

Uso de la cromatografía de gases para determinar la actividad de hongos en el maíz almacenado

ROLANDO A. FLORES G*

RESUMEN

*El objetivo de este experimento fue el de analizar la respuesta de los compuestos volátiles producidos por el hongo *Fusarium roseum* en maíz. Maíz amarillo fue rehumedecido e inoculado con *F. roseum*. Los volátiles producidos a los 13 y 19 días después de la inoculación fueron analizados en un cromatógrafo de gases. Distintas respuestas fueron encontradas en los cromatogramas para los diferentes estados de crecimiento del *F. roseum* en el maíz. El mayor número de compuestos volátiles fue encontrado en el maíz sin contaminación por hongos y el menor número fue observado en el maíz contaminado después de 13 días de almacenamiento. Picos con el mismo tiempo de retención relativa fueron encontrados a los 13 y 19 días de almacenamiento del maíz contaminado.*

INTRODUCCION

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas que permiten la identificación y cuantificación de muchas toxinas producidas por diferentes microorganismos presentes en granos, alimentos para animales, cereales, etc. La pronta determinación de la presencia de estos microorganismos hace posible el tratamiento del material infectado de una manera apropiada y por lo consiguiente se previene que la contaminación continúe, de ahí que el potencial de peligro para humanos y animales que van a consumir dichos productos puede ser controlado.

En el Laboratorio de Diagnóstico de Iowa State University se determinó la formación de com-

puestos de alcoholes de ocho carbonos y cetonas, que son producidos en una abundancia relativa al mismo tiempo que se producen las micotoxinas (4). La determinación se realizó por medio del análisis de diferentes compuestos volátiles que habían sido producidos en el maíz por la presencia de hongos en diferentes estados de crecimiento. Una de las técnicas usadas en esta determinación fue el análisis cromatográfico de gases de los volátiles obtenidos al secar al vacío la muestra de maíz.

Este artículo es un estudio inicial sobre la posible correlación que se puede presentar entre las micotoxinas producidas por los microorganismos y los productos que se generan en forma paralela por estas micotoxinas. En este estudio, una colonia de *Fusarium roseum* fue cultivada e inoculada en maíz húmedo. Los compuestos volátiles que se desarrollaron en el maíz inoculado fueron analizados utilizando el cromatógrafo de gases en dos estados de crecimiento del *F. roseum*.

No está dentro del alcance de este estudio la identificación de los diferentes compuestos producidos por la interacción del *F. roseum* en el maíz húmedo. Sin embargo, este artículo presentará el número de compuestos detectados y sus tiempos de retención relativa. Investigaciones posteriores, utilizando el cromatógrafo de líquidos (CLG), la cromatografía de capa delgada (CCD) y (o) el espectrómetro de masas (EM), podrían identificar los compuestos presentes en los diferentes estados de crecimiento del hongo en el maíz.

FUSARIUM ROSEUM

Especies del género *Fusarium* son comunes y se encuentran distribuidas en toda la naturaleza.

* Ingeniero mecánico, MSc. en Ingeniería Agrícola. Jefe del Departamento de Ingeniería Consejo Nacional de Producción y Profesor del Departamento de Ingeniería Agrícola del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Se reconoce y agradece la colaboración y enseñanzas impartidas durante la realización de esta investigación científica, por el Dr. H. M. Stahr, director del Laboratorio de Diagnóstico de la Escuela de Veterinaria de Iowa State University.

Se presentan como saprófitos en el suelo, en la vegetación que está marchita y (o) en estado de descomposición y como parásitos en plantas silvestres y plantas ornamentales. En las plantas causan una gran variedad de enfermedades tales como decaimiento, marchitez y descomposición. En muchas regiones del mundo, la mayoría de los cereales tales como maíz, trigo, avena, cebada, sorgo y maíz se ven afectados por este hongo, lo que provoca pérdidas considerables desde el punto de vista económico. (2).

Colonias de *F. roseum*, también conocidas como *F. graminearum*, pueden producir micotoxinas tales como la T-2 y zearalenone. No obstante, la producción de estas micotoxinas está condicionada por muchos factores. Los factores más importantes en la interacción de las colonias de hongos y el substrato en el que crecen se presentan en la Figura No. 1 (1). Los efectos de zearalenone en humanos, si hay alguno, no son conocidos a la fecha. Sin embargo, algunas especies de *F. roseum* que producen zearalenone también producen cantidades suficientes de algunas toxinas T-2 (y probablemente algunas otras toxinas desconocidas) que pueden causar serias lesiones en el ganado porcino. Estas toxinas T-2 afectan a los cerdos con un síndrome estrogénico, cuyos síntomas son volvovaginitis, alargamiento del útero, camadas reducidas, abortos y prolapsos rectales (2).

OBJETIVO

Este estudio tuvo el siguiente objetivo: obtener la respuesta del *F. roseum* al cromatógrafo de gases en diferentes etapas de su crecimiento en maíz, por medio del análisis de los compuestos volátiles producidos.

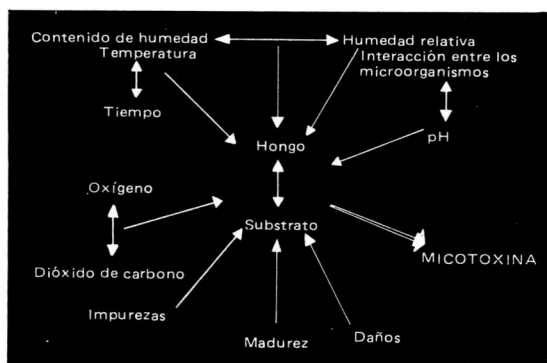


FIGURA No. 1. Factores que interactúan para la producción de micotoxina.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento seguido en este experimento, consistió de cuatro partes:

1. preparación del inóculo;
2. inoculación del maíz húmedo con *F. roseum*;
3. análisis del maíz inoculado y
4. análisis del maíz no inoculado.

Preparación del inóculo

Maíz amarillo seco a 14% de contenido de humedad base seca fue humedecido con agua en una proporción de 1:1 por volumen y dejado a una temperatura de 24°C por 24 horas. Después de este tiempo de almacenamiento, a una muestra de 200 g. del maíz se le adicionó directamente el inóculo preparado en la primera parte del procedimiento. El maíz inoculado fue almacenado a 24°C hasta que el primer análisis fue realizado.

Análisis del maíz inoculado

Se preparó una solución esterilizada con 30 g. de extracto de levadura y 200 g. de cristales de sucrosa disueltos en un litro de agua destilada. En 20 ml. de esta solución, se puso una muestra de una colonia de *F. roseum*. Esta colonia fue obtenida en el Laboratorio de Diagnóstico de la Escuela de Medicina Veterinaria de Iowa State University. La solución inoculada fue almacenada a 32°C por siete días, tiempo suficiente para mostrar evidencia de crecimiento de la colonia.

Inoculación del maíz húmedo con *F. roseum*

Una muestra de tres a ocho microlitros de 3-octanona en una dilución de 10 microlitros por 1,0 mililitro de metanol fue inyectada al cromatógrafo de gases cada día que fue usado y antes de que la muestra del maíz fuera puesta en él. Esta muestra de 3-octanona fue usada como compuesto de referencia para el análisis de la muestra del maíz.

Una muestra de 10 g. del maíz inoculado, con evidencia de crecimiento de hongos, fue tomada a

los 13 y 19 días de almacenamiento después de que la inoculación fue hecha y fue colocada en una bureta.

Una presión de succión de 80 mililitros por minuto fue aplicada a través del portador de muestras por 10 minutos. Después de este tiempo, el portador de la muestra fue colocado en el cromatógrafo de gases.

El cromatógrafo de gases usado tiene las siguientes características:

Marca: Hy Fy
 Columna: Resoflex
 Detector: Llama de hidrógeno
 Gas portador: Nitrógeno

Las condiciones de funcionamiento del cromatógrafo de gases fueron:

Temperaturas:
 Columna: 80°C
 Inyector: 180°C
 Detector: 180°C
 Velocidad de graficación: 40 cm/h
 Escala de graficación: 10 mv para las muestras del maíz
 100 mv para la 3-octanona
 Atenuación: 1 x 16

Ninguna otra muestra fue inyectada al cromatógrafo de gases durante los 30 minutos siguientes al momento en que el portador con la muestra fue colocado en el inyector del cromatógrafo.

Análisis del maíz no inoculado

Una muestra de maíz amarillo no fue inoculada y fue mantenida en congelador a -5°C. Después de que 10 g. de este maíz fueron descongelados, se analizaron en el cromatógrafo de gases usando el mismo procedimiento explicado anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Debe ser aclarado que en este experimento, el tiempo de almacenamiento se refiere al estado de crecimiento del *F. roseum* en el maíz. El crecimiento de la colonia en el maíz comenzó con la inoculación, el tiempo de almacenamiento, después de ese día, constituye el período en que se

dieron las diferentes etapas de crecimiento del *F. roseum*.

Los cromatogramas obtenidos para los compuestos volátiles analizados en el cromatógrafo de gases se muestran en las Figuras No. 2 y No. 3. En ambos cromatogramas la muestra de 3-octanona está presente al principio seguida por un cambio en la escala del graficador. Este cambio en la escala fue debido a un incremento en la sensibilidad del graficador, 100 mv fueron usados con la 3-octanona y 10 mv fueron usados con los volátiles capturados en el portador de la muestra.

El tiempo de inyección o tiempo durante el que el portador de la muestra fue colocado en el cromatógrafo de gases se muestra en los gráficos como el tiempo cero para cada una de las muestras inyectadas.

Los picos tomados en consideración en ambos cromatogramas fueron solo aquellos que muestran una intensidad relevante sobre el comportamiento de "ruido" del graficador antes de la inyección. Por lo tanto para los cromatogramas, el maíz contaminado a los 13 días de almacenamiento, ilustrados en la Figura No. 2, solo fueron considerados dos picos principales y un hombro, mientras que para los cromatogramas del maíz no contaminado, ocho picos fueron tomados en consideración.

El tiempo de retención relativo obtenido en relación con el 3-octanona para los picos considerados se muestran en el Cuadro No. 1.

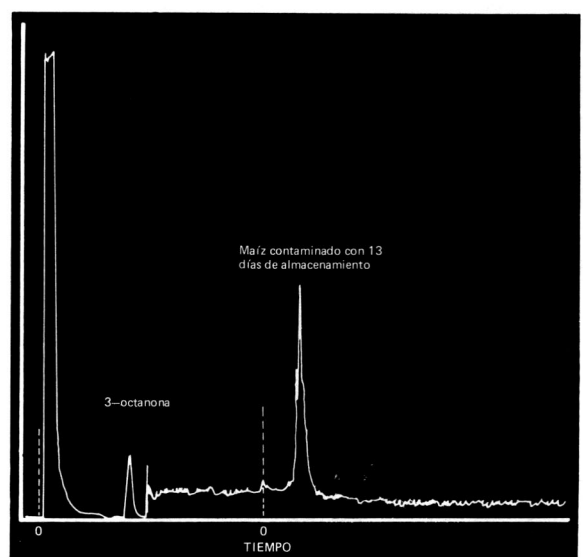


FIGURA No. 2. Cromatograma del maíz contaminado con 13 días de almacenamiento y 3-octanona de referencia.

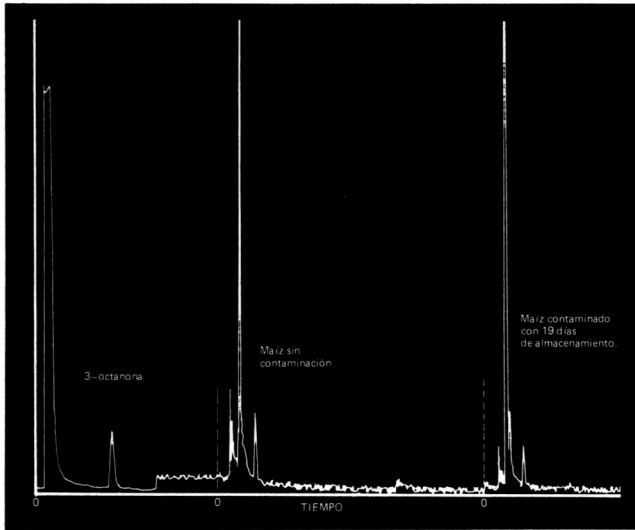


FIGURA No. 3. Cromatograma del maíz sin contaminación, del maíz contaminado con 19 días de almacenamiento y 3-octanona de referencia.

Maíz sin contaminar	Maíz contaminado	
	13 días de almacenamiento	19 días de almacenamiento
0,16		0,19
0,20		0,21
0,22		
0,24		
0,27		
0,29		0,29
		0,34
0,35	0,38	0,38
	0,42	
	0,45	
0,49		
		0,52
6,37*	6,30*	6,37*

*Tiempo de retención para la 3 octanona en minutos.

CUADRO No. 1 Tiempo de retención relativo a la 3-octanona para los picos obtenidos en diferentes estados de crecimiento del *F. roseum* en maíz (min/min).

Los picos encontrados en este experimento son considerados como picos tempraneros debido a que ellos aparecen muy rápido en el cromatograma.

Ninguna otra respuesta fue encontrada después de 3,3 minutos de la inyección. Esto es un

equivalente a un tiempo de retención relativo de 0,52.

En un grupo de picos tan cercanos como los que fueron encontrados en este experimento, el cálculo de las concentraciones de los diferentes compuestos en la mezcla, que son proporcionales al área bajo el pico, no nos da un resultado significativo. Esto es debido a las pequeñas diferencias entre los tiempos relativos de retención, ya que estas diferencias hacen que la computación del área bajo cada pico sea imposible.

Hay dos pares de picos que tienen el mismo tiempo de retención relativo, uno con el valor de 0,29 minutos/minuto para el maíz sin contaminación y para el maíz contaminado a los 19 días de almacenamiento, y el otro con un valor de 0,38 minutos/minuto para el maíz contaminado a los 13 y 19 días de almacenamiento. De estos datos se puede concluir que el compuesto con un tiempo de retención relativo de 0,38 que no está presente en el maíz sin contaminación pudo ser producido durante los 13 primeros días de almacenamiento y se mantuvo presente en los análisis hasta los siguientes 6 días. Sin embargo, dos o más compuestos pueden tener el mismo tiempo de retención relativo, lo que significa que tal vez el mismo compuesto pudo no estar presente después de esos seis días ya que el compuesto original pudo reaccionar para formar otro compuesto con el mismo tiempo de retención relativo. Esto pudo haber sido también la explicación del por qué de los picos que se presentan entre el maíz sin contaminar y el maíz contaminado con 19 días de almacenamiento y que tienen el tiempo de retención relativo de 0,29.

El maíz sin contaminación presenta más picos que el maíz contaminado después de 13 días de almacenamiento, lo que significa que compuestos volátiles del maíz no contaminado reaccionaron o fueron tal vez consumidos en otras reacciones llevadas a cabo por el *F. roseum*.

De acuerdo con Stahr (5) un cromatograma como los obtenidos en este experimento caben dentro de la categoría de una resolución pobre, debido a que los picos se encuentran muy juntos. Una resolución pobre puede ser causada por lo siguiente:

- a. temperatura de la columna muy alta;
- b. pérdida de resolución debido al calcinamiento de la fase sólida;

- c. uso de una columna errónea;
- ch. flujo de gas no apropiado;
- d. columnas contaminadas.

Es el criterio del autor de este informe que las causas c y (o) d pueden haber sido las responsables de esta resolución pobre. De ahí que la alternativa para repetir este experimento puede ser reacondicionar o sustituir la columna.

CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones pueden ser derivadas de este estudio.

1. Una producción de volátiles diferentes fue encontrada para cada una de las tres condiciones de maíz
 - a) sin contaminar,
 - b) después de 13 días de inoculado, y
 - c) después de 19 días de inoculado.
2. El número más alto de compuestos volátiles fue encontrado en el maíz sin contaminación y el más bajo fue encontrado en el maíz contaminado a los 13 días de almacenamiento.

3. Los mismos tiempos de retención relativos de 0,38 fueron encontrados para picos presentes a los 13 y 14 días después de la inoculación.
4. Los resultados de este experimento indican que se requiere más investigación para poder utilizar el cromatógrafo de gases como un indicador de la contaminación en los granos.

REFERENCIAS

1. Christensen, C.M. and Kaufmann, H.H. **Grain Storage: the Role of Fungi in Quality Loss.** Minnesota: University of Minnesota Press, 1969.
2. Christensen, C.M. **Zearalenone.** Conference on Mycotoxins in Animal Feeds and Grains Related to Animal Health. Maryland: Food and Drug Administration, 1970.
3. Keulemans, A.I.M. **Gas Chromatography.** 2ed. New York: Reinhold, 1959.
4. Stahr, H.M. **Supplement to Analytical Toxicology Methods Manual.** Iowa: Iowa State University Press, 1980.
5. Stahr, H.M. **Report NC151, Veterinary Diagnostic Laboratory.** Iowa: Iowa State University, 1980.

