

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS B1,
B2, G1 Y G2 EN POLLINAZA Y GALLINAZA.**

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
RAUL TADEO ORTIZ BERRIEL
DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Margarita Hernández Gallardo
ASESOR DE TESIS
M. en C. Daniel Salvador Monroy
ZAPOPAN, JAL., DICIEMBRE DE 1994

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS
POR DARMELA OPORTUNIDAD DE VIVIR

A MIS PADRES
RAUL ORTIZ SOLORZANO Y AURORA BERRIEL VALENCIA
Por su esfuerzo, carino, comprension y que por sobre todas
las cosas me den un ejemplo constante de superacion.

A MI ESPOSA
MARIA DEL CONSUELO RIZO MACIAS
Porque ha sido mi mas grande inspiracion y ayuda para lograr
cumplir una de mis mas importantes metas.....
A TI TODO MI AMOR.

A MIS HIJOS
RAUL TADEO ORTIZ RIZO Y FABIAN ARTURO ORTIZ RIZO
para ellos que son una bendicion que DIOS me regalo y que
son el motivo constante a ser un ejemplo.

A MIS HERMANOS

Cacho, Carmelita, Ana Rosa, Ime, Pedro, Gigio, Boris;
Gracias por su apoyo incondicional.

A MIS MAS PRECIADOS FAMILIARES

Don Nacho, Sra. Chelo, Isa, Cocon, Tony, Tonin, Lucia,
sobrinos y amigos.

M.V.Z. LUIS RAMON ORTIZ BERRIEL
A el que siempre ha sido mi guía.

M.V.Z. MSc. MARGARITA HERNANDEZ GALLARDO
Directora de tesis, que por su comprension y conocimientos
me ayudo a terminar con satisfaccion este trabajo.

C O N T E N I D O

Página

RESUMEN	X
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
JUSTIFICACION	4
HIPOTESIS	5
OBJETIVO	6
MATERIAL Y METODO	7
RESULTADOS	13
DISCUSION	19
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFIA	22

R E S U M E N

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados durante el desarrollo del hongo y su producción puede ocurrir en el campo, durante el cultivo y/o después de la cosecha, así como durante el almacenamiento. El presente estudio se llevó a cabo en granjas de aves, con el fin de conocer el grado de contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en pollinaza y gallinaza destinados como suplemento no protéico para bovinos. Se obtuvieron 60 muestras en total, de las cuales 30 fueron de gallinaza y 30 de pollinaza. Estas muestras fueron procesadas por el método de cromatografía en capa fina. Este trabajo reveló que el 88.31% del total de las muestras fueron positivas a aflatoxinas, presentando una concentración que varía de 67 ppb a 232 ppb. Se concluye que estos niveles de concentración se consideran fuera de norma, y si este subproducto se utiliza en las raciones alimenticias para bovinos pueden representar un alto riesgo al ser consumido.

I N T R O D U C C I O N

México, país con una población cada vez mayor, requiere de fuentes protéicas a fin de solucionar sus necesidades alimenticias, buscar aumentar la producción de proteínas y a la vez bajar el costo de la misma. (6,11)

Dentro de los alimentos indispensables para el hombre, la carne es uno de ellos; los bovinos son una fuente que aportan una cantidad considerable de ésta, por lo tanto un aumento sustancial en la producción bovina, traerá como consecuencia un incremento importante en la salud de los seres humanos. (6,11)

En la producción animal, desde el punto de vista económico uno de los aspectos más importantes de los costos de producción, es la alimentación. Por lo tanto, si se desea maximizar las utilidades de una producción pecuaria, es primordial que se ponga particular atención en la reducción de costos de alimentación. (6,11,21)

Con base a lo anterior, la utilización de pollinaza y gallinaza es una de las alternativas a seguir en la alimentación animal considerando que los bovinos, de acuerdo a sus características de ruminantes están capacitados para obtener los nutrientes necesarios para su mantenimiento y reproducción, a partir de este tipo de insumos (6,11,21)

Sin embargo, desde el punto de vista sanitario, se debe tener en cuenta que la pollinaza y gallinaza, representa un sustrato adecuado para la proliferación de microorganismos, entre los que se encuentran hongos productores de sustancias tóxicas, lo cual en consecuencia afecta al valor nutricional de la misma. (3,8,13)

Durante los últimos 25 años, los investigadores han estudiado aproximadamente 200 metabolitos tóxicos, producidos por ciertas cepas fúngicas en condiciones ideales de humedad y temperatura, adjunto al mal manejo de estos subproductos de origen animal. (1,4,5)

Existen evidencias de que las toxinas de los hongos juegan un papel importante en las patogénesis de algunas enfermedades de los animales, esto depende de la edad del animal, estado de salud general y tiempo de exposición a la contaminación. El órgano más afectado por las micotoxinas es el hígado, además interfiere con el desarrollo celular de los mecanismos genéticos y son un potente agente carcinógeno. (1,2,10,15,17)

Por otra parte, el hombre al consumir los alimentos provenientes de animales contaminados, están expuestos a sufrir proceso de intoxicación a causa de los efectos acumulativos de las aflatoxinas, siendo esto un problema de Salud Pública. (16,18)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las alternativas en la alimentación animal para disminuir los costos de producción, es la utilización de subproductos de origen animal, como ingredientes de una ración alimenticia que proporcionen ciertos nutrientes indispensables para su desarrollo y reproducción. A la vez, se pueden administrar sustancias tóxicas así como microorganismos no deseables.

Entre estos microorganismos, se encuentran los hongos como Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus productores potenciales de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, que pueden contaminar la pollinaza y la gallinaza y al ser utilizados estos subproductos en la alimentación bovina son de alto riesgo para los animales, por sus efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos y nefrotóxicos, así como efectos residuales resultando un serio problema de Salud Pública.

J U S T I F I C A C I O N

La contaminación de la pollinaza y gallinaza por hongos potencialmente productores de aflatoxinas, juega un papel importante en la producción de sustancias tóxicas, que afectan a los animales. Estas sustancias pueden ser secretadas en el substrato o alimento. Los requisitos para el crecimiento y desarrollo de los hongos, no son necesariamente los mismos que para la producción de aflatoxinas en diferentes alimentos, temperatura 24 a 35 °C, humedad del grano 16%, humedad relativa 70-80%, ventilación deficiente, falta de luz, condiciones que se pueden presentar cuando los ingredientes se almacenan deficientemente. (7,14,16)

Existen evidencias de que las sustancias tóxicas producidas por los hongos juegan un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades de los animales como se ha informado.

O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL

Determinar y cuantificar aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en pollinaza y gallinaza recolectadas en granjas de la periferia de Guadalajara, Jal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la presencia de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ por la técnica de cromatografía en capa fina.
- 2.- Cuantificar los niveles de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en pollinaza y gallinaza.



H I P O T E S I S

La pollinaza y gallinaza es el substrato ideal para la proliferación de hongos potencialmente productores de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ por sus nutrientes, así como humedad, temperatura y mal manejo, entonces, al establecerse estos factores se espera encontrar un alto porcentaje de muestras contaminadas con aflatoxinas.

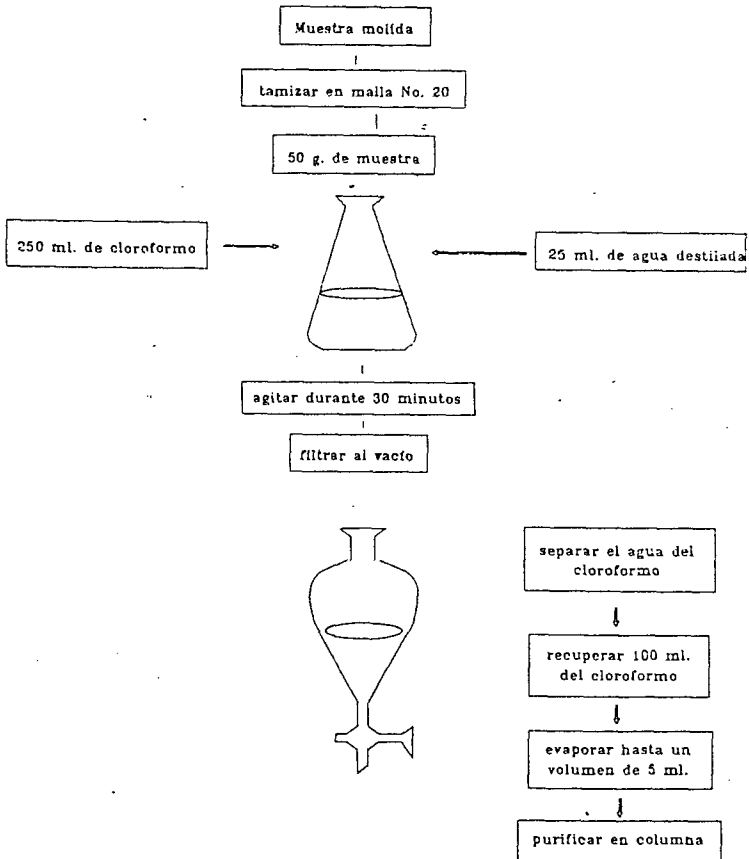
MATERIAL Y METODOS

En este trabajo se recolectaron muestras de granjas avícolas de la periferia de Guadalajara, se obtuvieron 60 muestras en total con una distribución de la siguiente manera: 30 de pollinaza y 30 de gallinaza. Estas muestras se recolectaron de la caseta, formando muestras compuestas de aproximadamente 2 Kg. Se transportaron en bolsas de papel al Laboratorio de Toxicología de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, para la realización de las siguientes pruebas:

1.- Identificación y cuantificación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ por la técnica de cromatografía en capa fina. (19,22,23)

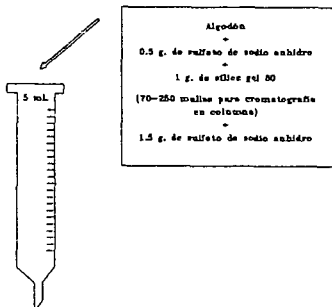
3.- DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE AFLATOXINA
B1, B2, G1 Y G2. POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

EXTRACCION

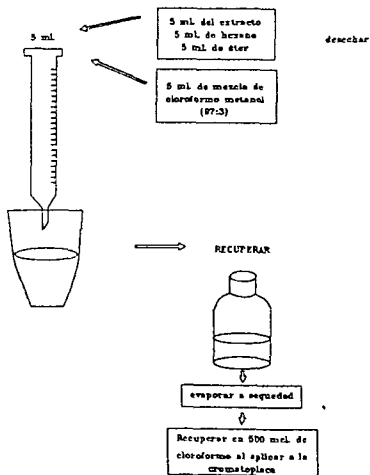


PURIFICACION EN COLUMNA POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Empaquetamiento de la columna



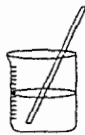
Purificación



DETERMINACION

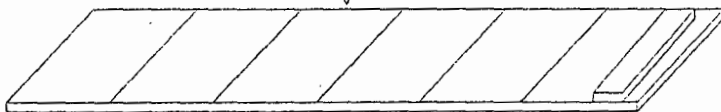
PREPARACION DE CROMATOPLACAS

30 g. de silica gel
 ▽
 66 ml. de agua destilada.



agitar

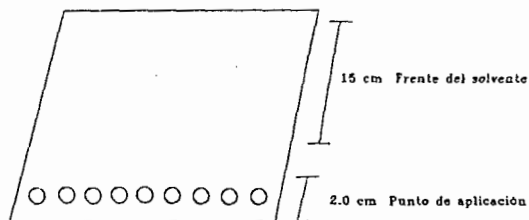
aplicacion en placas de cristal 20 x 20 x 0.3 mm.



dejar a temperatura ambiente
 durante 30 minutos

secular en horno a 110 °C
 durante 60 minutos

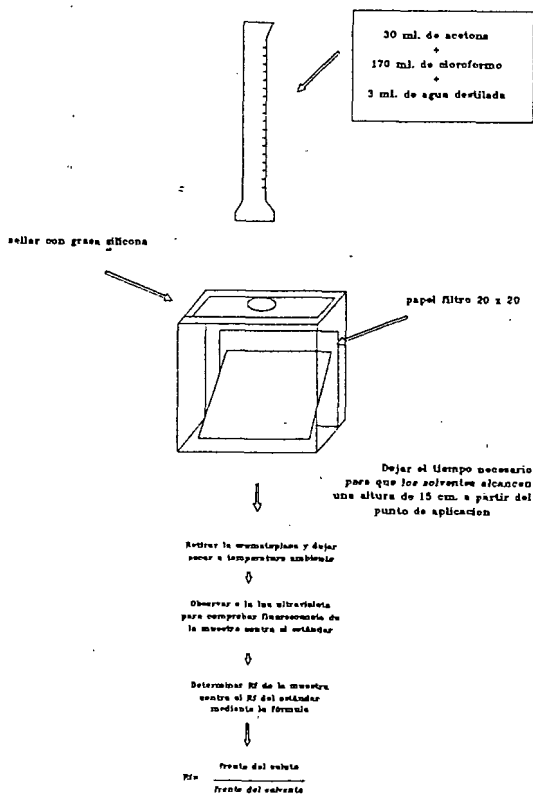
APLICACION DEL EXTRACTO Y ESTANDAR A LA CROMATOPLACA



Muestra 3.5 5 6.5 6.5 mcl

Estándar 5 3.5 5 6.5 5 1

DESARROLLO DE LA CROMATOPLACA



DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

$$\text{mg/kg} = (S \times Y \times V) (X \times W)$$

En donde:

S = mcl. de la solución estandar igual a la de la muestra del problema.

Y = Concentración del estandar mcg/ml

V = mcl. de la dilución final del extracto de la muestra

X = mcl. del extracto de la muestra obtenida

W = gramos de la muestra aplicados a la columna

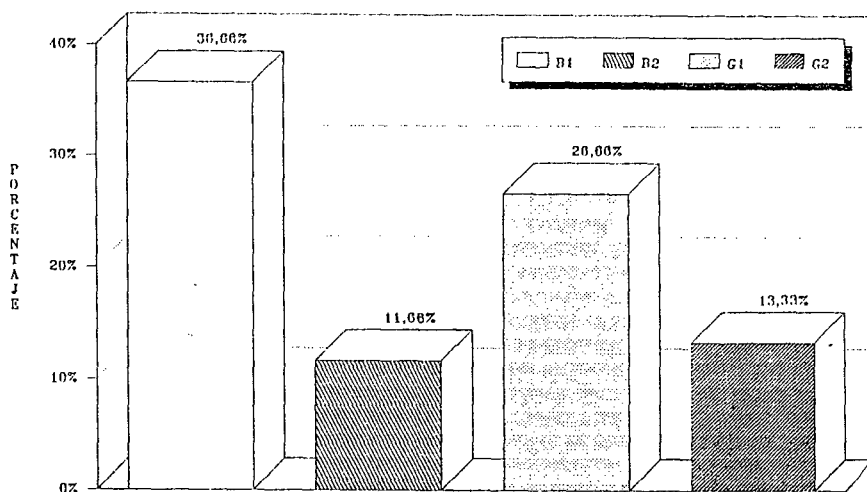
RESULTADOS

Se obtuvieron 60 muestras en total; 30 de gallinaza y 30 de pollinaza. Detectando las cuatro principales aflatoxinas en los siguientes porcentajes; B_1 36.66%, B_2 11.66%, G_1 26.66% y G_2 13.33% (Gráfica No. 1, 2 y 3)

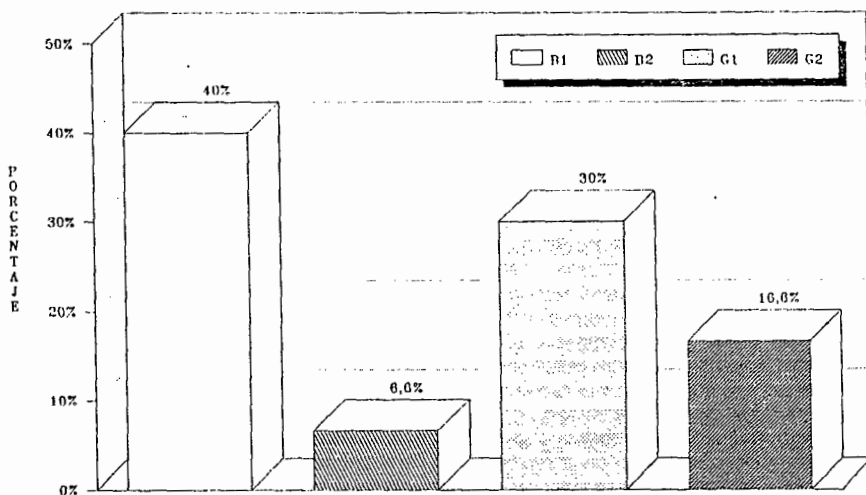
A la vez se detectaron concentraciones que variaron de 67 a 232 ppb. En la siguiente distribución: Con 67 ppb se encontró aflatoxina B_1 en un 16% y G_2 en un 3%. Con 87 ppb la B_1 en un 5%, B_2 en un 1.6%, G_1 6.6% y G_2 1.6%. Con 96 ppb G_1 1.6% y G_2 1.6%. Con 125 ppb la B_1 en un 15%, B_2 5%, G_1 11.6% y G_2 5%. Con 162 ppb la B_1 1.6%, G_1 1.6%. Con 178 ppb la B_1 8.3%, B_2 1.6%, G_1 3.3% y G_2 1.6%. Con 232 ppb la B_1 5%, B_2 3.3% y G_1 3.3%. (Gráfica No. 4 y Cuadro No. 1)

Se muestra que del total de las muestras analizadas el 88.31% presentaron las cuatro aflatoxinas.

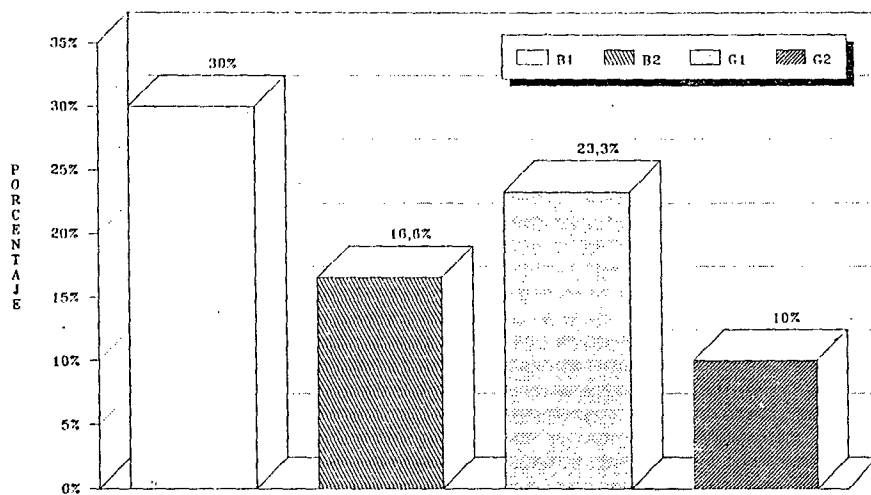
GRAFICA No. 1
PORCENTAJE DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 Y
G2 EN POLLINAZA Y GALLINAZA



GRAFICA No. 2
PORCENTAJE DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 Y
G2 EN POLLINAZA



GRAFICA No. 3
PORCENTAJE DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 Y
G2 EN GALLINAZA

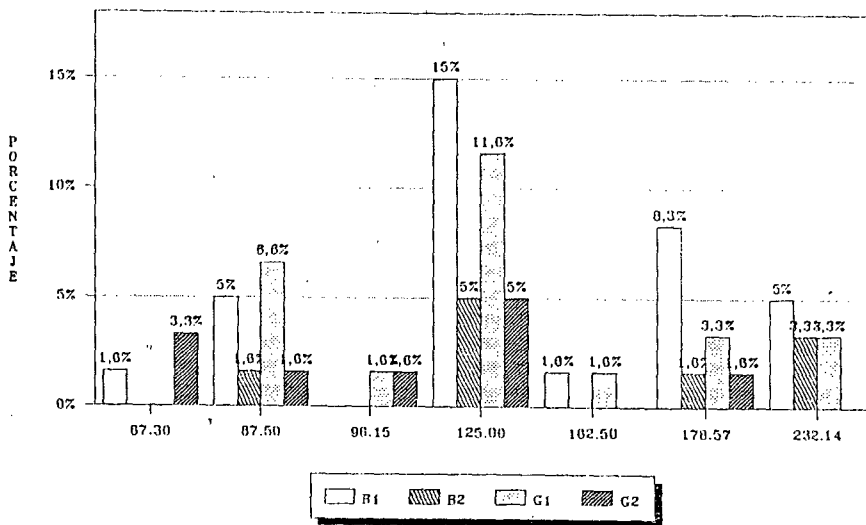


CUADRO No. 1

PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN POLLINAZA Y GALLINAZA

AFLATOXINA	POLLINAZA	GALLINAZA
B ₁	12	9
B ₂	2	5
G ₁	9	7
G ₂	5	3

GRAFICA No. 4
 CONCENTRACION DE AFLATOXINAS B1, B2, G1
 Y G2 EN POLLINAZA Y GALLINAZA



D I S C U S I O N

Los resultados de esta investigación que se realizó con muestras de Pollinaza y Gallinaza, revelan el grado de contaminación con Aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 en un 88.31% de muestras positivas, la de mayor porcentaje fue la B_1 (con una 36.66% seguida de G_1 con un 26.66%, la G_2 con un 13.3% y por último la B_2 11.6%), esto concuerda con estudios que anteceden a éste, dado como porcentaje de mayor concentración a la aflatoxina B_1 , sabiendo que esta aflatoxina es la más patógena por sus características, carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, hepatotóxicas y nefrotóxicas.

La principal aflatoxina que se produce en el medio ambiente natural es la B_1 y G_1 y sus hidroxiderivados B_2 y G_2 de éstas, como se mencionó la B_1 es la más tóxica, por tal motivo se ha estudiado con más profundidad y la mayoría de los efectos bioquímicos notificados se refieren especialmente a esta toxina. (20)

Las concentraciones de las cuatro aflatoxinas variaron de 67 ppb a 232 ppb, rebasando los niveles de riesgo establecidos por la FDA (Food and Droug Administration). Se ha demostrado que no hay tolerancia para aflatoxinas en ningún alimento, ya sea para el consumo humano o animales. Sin embargo se ha aceptado un límite por debajo de 20 microgramos por kilogramo de alimento.

La producción de aflatoxina sobre un determinado sustrato natural como los alimentos, se ve afectada por factores físicos (temperatura, humedad relativa durante el almacenamiento, aireación, tiempo de almacenamiento y puntos calientes de la masa de alimentos producida por el desarrollo de microorganismos; factores químicos (composición del sustrato, uso de agentes fungistáticos, contenido de oxígeno y dióxido de carbono del ambiente) y factores biológicos (cepas toxinogénica, cantidad de esporas viables y presencia de insectos). (9,12,14)

Las frecuencias de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en pollinaza fue de 60% de muestras positivas y en gallinaza fue de 53.33% de muestras positivas.

No existen trabajos que determinan la frecuencia de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en pollinaza y en gallinaza. Sin embargo se tienen datos de estudios que una vez producidas las aflatoxinas son compuestos estables bajo las condiciones que normalmente se manejan los productos agrícolas, resistiendo las temperaturas utilizadas en la elaboración de alimentos.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- El 88.31% de las muestras fueron positivas a aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.
- 2.- Las concentraciones de aflatoxinas presentes en los subproductos analizados se consideran de alto riesgo al ser utilizadas como fuente de nitrógeno no protéico en las raciones alimenticias para bovinos.
- 3.- La pollinaza y gallinaza se encontraron contaminadas en mayor proporción con la aflatoxina B₁.



BIBLIOTECA CENTRAL

B I B L I O G R A F I A

- 1.- AGROTECNIA 1988, "AFLATOXICOSIS" AVANCES DE MEDICINA VETERINARIA ED. AGROTECNIA VOL. IV No. 5/6 PAG. 243,246
- 2.- BALCONI I.R., 1986. "MICOTOXINAS, EFECTOS E INTERACCION" INSTITUTO DE TECNOLOGIA AVIPECUARIA AÑO 2 PAG. 12
- 3.- BIELY, J., KITTS W.D., BURLLEY N.R. 1980 "EL ESTIERCOL SECO DE LAS AVES DE CORRAL COMO INGREDIENTES DE PIENSOS". REVISTA MUNDIAL DE ZOOTECNIA No. 34
- 4.- BURROWS, B.M., 1986. "AFLATOXINAS Y AFLATOXICOSIS GRANDES PREOCUPACIONES PARA LOS PRODUCTORES DE ALIMENTOS". ASA MEXICO. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS E INDUSTRIAS DE GRANOS. UNIVERSIDAD DE KANSAS. NUM 39 PAG. 1 Y 2
- 5.- CAMPOS N.G. CRUZ A., LEYVA J. "AFLATOXINAS B₁ COMO CAUSA DE ABORTOS EN CERDOS" . INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN PECUARIA (SARH) AÑO 8 VOL. 8 NUM. 89 PAG. 5,6,7 Y 8

- 6.- CASTILLO A.A., SANCHEZ G. J.I., ROSILES M.R.,. 1983
"CARACTERISTICAS FISICAS Y NIVELES DE AFLATOXINA B₁, EN
GALLINAZA Y POLLINAZA DE GRANJAS DE TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO"
VETERINARIA MEX. 14: 1983 PAG. 151,152

- 7.- CULLISON A.E. 1983. "ALIMENTO Y ALIMENTACION DE ANIMALES." ED.
DIANA MEXICO PAG. 37

- 8.- EDDS G.T., D.V.C. 1981."AFLATOXINAS Y SALUD ANIMAL". MEMORIAS
DEL PRIMER CURSO DE ACTUALIZACION EN TOXICOLOGIA VETERINARIA.
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (UNAM) PAG. 67-72

- 9.- FULGEIRA C., DE BRACALENLI B.J.C. 1987. "DETECCION SIMULTANEA
DE AFLATOXINAS B₁ Y ZEARALENONA EN ALIMENTO BALANCEADO PARA
CERDO". DPTO. DE MICROBIOLOGIA F.C.G. Y F. UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL ROSARIO. REPUBLICA DE ARGENTINA. PAG. 217-223

- 10.- HAMILTON B.P. 1982, "EFECTO Y CONTROL DE LAS MICOTOXINAS" DEL
DEPARTAMENTO DEL CIENCIAS AVICOLAS UNIVERSIDAD DEL ESTADO DE
CAROLINA DEL NORTE. PAG. 71-72

- 11.- MAGAÑA C.A., RODRIGUEZ G.T. "ENGORDA DE BOVINOS EN CORRAL SIN
LA UTILIZACION DE GRANO. I.- SUPLEMENTACION DE POLLINAZA Y
MELAZA A TORETES ALIMENTADOS CON CAÑUELAS DE MAIZ ENSILADA"
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION FORESTAL AGROPECUARIA.
AREA DE NUTRICION ANIMAL. PAG. 374, 375 Y 376

- 12.- MORAN S.C., VILLA M.J., CRUZ P.F. 1990. "DETECCION DE AFLATOXINAS B₁ EN ALIMENTO PELETIZADO PARA POLLOS DE ENGORDA. DPTO. DE MICROBIOLOGIA DE LA F.M.V.Z. UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA. PAG. 36-37
- 13.- MORENO M.E., 1989. "CURSO DE ACTUALIZACION SOBRE MICOTOXICOSIS AVIAR DOMESTICAS" HONGOS Y MICOTOXINAS EN GRANOS ALMACENADOS PAG. 23-26
- 14.- MOJICA T.M., BLANCA J., 1985 "ELIMINACION DE AFLATOXINA B₁ IN VITRO POR CRECIMIENTO DE HONGOS COMPETITIVOS. REV. LAT-AMER MICROBIOL. 27:169-174
- 15.- PEÑA D.S. Y DURAN DE B. M. DEL C. 1990 "EFECTO TOXICO DE LAS AFLATOXINAS EN LA DIETA" CIENCIA Y DESARROLLO VOL. XVI No. 94 PAG. 64.
- 16.- ROSILES M.R. 1981. "CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE ALGUNAS MICOTOXINAS EN ALIMENTOS PARA ANIMALES DOMESTICOS DURANTE LOS AÑOS 1977 A 1980". VETERINARIA MEXICO VOL. 12 PAG. 4
- 17.- RALDO J. T.L.B. 1987. "NUEVOS ADELANTOS EN LA DETECCION DE MICOTOXINAS." INDUSTRIA AVICOLA, VOL 26 PAG. 10

- 18.- SERRATOS C.M.DE L. 1993 DETECCION DE AFLATOXINAS M₁ EN LECHE DE GANADO BOVINO EN EL ESTADO DE GUANAJUATO. U. DE G. GUADALAJARA, JAL., PAG. 4
- 19.- TEJADA DE H. I., CARRASCO B. 1990. " MANUAL DE TECNICAS DE INVESTIGACION EN RUMIANTES. LA TOMA DE MUESTRAS, SU CONSERVACION Y ENVIO AL LABORATORIO. SISTEMA DE EDUCACION CONTINUA EN PRODUCCION ANIMAL EN MEXICO. PAGES. 1-6
- 20.- TUTEN T. 1989. EL MUNDO MISTERIOSO DE LAS MICOTOXINAS. INDUSTRIA AVICOLA, VOL. 36 PAG. 2
- 21.- WILLIAMS D.W. 1983. GANADO VACUNO PARA CARNE, CRIA Y EXPLOTACION. EDITORIAL LIMUSA. PAG. 72-81
- 22.- WILLIAMS S., 1984. "OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMIST". ED. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMIST. U.S.A. CHAPTER 26.
- 23.- WYATT R. 1983. "ANALISIS DE MICOTOXINAS, LOS PASOS CLAVE" AVICULTURA PROFESIONAL SEPT. VOL. 1 No. 3. PAG. 27-28