
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS,
B1, B2, G1, G2, EN ALIMENTO TERMINADO
PARA CERDOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
HUMBERTO GOMEZ RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Margarita Hernández Gallardo

ASESOR DE TESIS:
M. V. Z. MARIO REAL NAVARRO

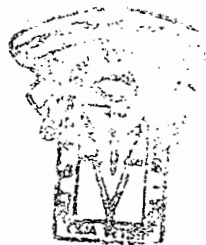
GUADALAJARA, JAL. NOVIEMBRE 1993

C O N T E N I D O

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN	I
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
JUSTIFICACION	4
HIPOTESIS	6
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y METODO	8
RESULTADOS	14
DISCUSION	19
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFIA	22

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos de los hongos que se presentan en una gran variedad de substratos que pueden causar daños tanto económicos como fisiológicos a los animales, y un serio problema de Salud Pública. Este trabajo se llevó a cabo en granjas de cerdo, con el objetivo de determinar y cuantificar las aflatoxinas presentes en el alimento para cerdos. Se recolectaron 60 muestras de alimento para determinar el grado de contaminación por el método de cromatografía en capa fina. De los resultados obtenidos, se observó que el 48% del total de las muestras fueron positivas a aflatoxinas, además presentaron una concentración que varió de 16 a 162 ppb. La etapa que presentó mayor número de muestras contaminadas fue la etapa de engorda. Se concluye que las muestras contaminadas con aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ y a las concentraciones que presentaron se consideran elevadas en su totalidad y de alto riesgo para el consumo de estos alimentos.



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

La contaminación de alimento y materias primas, con hongos productores de sustancias tóxicas (micotoxinas) es un problema mundial que puede ocasionar daños en la salud del hombre y animales. (29)

El inadecuado manejo de alimentos, así como factores ambientales generan las condiciones necesarias para que proliferen las diferentes cepas fúngicas presentes en ellos y la posible producción de micotoxinas, con lo que se espera que dichos alimentos contaminados resulten no aptos para su consumo. (5)

De los diversos microorganismos que invaden a los productos agrícolas durante su desarrollo en el campo, los hongos son los mas abundantes y la principal causa de enfermedad, ocasionando severas perdidas económicas al reducir la producción de los cultivos que se ven afectados. Estos juegan un papel importante en el deterioro de los granos, ya que afecta su calidad nutricional, germinativa y sanitaria. (3,5,18)

La influencia del ambiente (humedad y temperatura), son mediadores para la contaminación micotoxigénica de los alimentos. Así que puede ser variable según las condiciones geográficas, métodos de almacenaje y tipo de alimento. (5,19)

En Inglaterra (1960), se presentó una intoxicación masiva de cien mil pavos alimentados con triturados de cacahuate enmohecido procedente del Brasil. Posteriormente ocurrió en otras especies domésticas y se aisló una toxina, formada por el hongo Aspergillus Flavus, y se dio el nombre de aflatoxina. (25)

Los géneros Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus. Son los productores de las cuatro principales aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, que se denominan así por la fluorescencia que dan a la luz ultravioleta de onda larga. (B, Blue y G, Green). (7)

En intoxicaciones crónicas por consumo causan anorexia y pérdida de ganancia de peso, baja la producción de; leche, huevo, respuesta adecuada a vacunación y resistencia a agentes infecciosos. Elevando la mortalidad en la parvada o en el hato. Sin embargo cuando se ingieren en cantidades considerables, causan diferentes tipos de enfermedades y reducen la productividad. Estos efectos dependen del tiempo de exposición, dosis especie, raza, sexo, edad, estado nutricional y susceptibilidad individual. (2,10,28)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El inadecuado manejo de los productos agrícolas destinados a la alimentación de cerdos, produce un alto índice de proliferación de hongos, los cuales alteran el contenido nutricional y vierten en ellos sus desechos metabólicos que son altamente tóxicos y no metabolizables almacenándose en el tejido animal ocasionando un serio problema de Salud Pública.

Por lo anterior es de suma importancia determinar el grado de contaminación por micotoxinas del alimento terminado para cerdos.

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

Las grandes pérdidas económicas causadas por la presencia y desarrollo de hongos en productos agrícolas y la falta de estudios sobre este tema ha sido de gran preocupación para la ganadería además conocer el grado de contaminación de raciones alimenticias y así poder controlar la presencia de estos metabolitos

Así mismo la utilización de la técnica de cromatografía en capa fina, la cual permite determinar los niveles de estas aflatoxinas en forma confiable, lo cual nos dará una panorámica real de este problema

Al estar presentes estas aflatoxinas en los alimentos para cerdos, no solo resulta una pérdida económica sino también introduce residuos metabólicos en los productos destinados para consumo humano, presentando un problema de Salud Pública.

Las micotoxinas pueden ser; hepatotóxicas, nefrotóxicas, carcinogénicas, embriotóxicas, dermonecroticas, además afectan al sistema endocrino desarrollando un cuadro estrogénico, cambios hematopoyéticos, alteraciones en la coagulación así como en el sistema nervioso y la consecuente disminución de consumo de alimento y ganancia de peso. (2,3,6,7,8,9,10,14,15,16,17,19,20,23, 26)

Una vez que se establecen los factores ambientales adecuados para la formación de hongos estos producirán sustancias tóxicas en el alimento de los animales, alterando los nutrientes de las raciones, obteniendo como resultado grandes pérdidas. (22)

Dentro de las alteraciones nutricionales importantes encontramos la destrucción de Vitaminas tales como: A, D, E, K, B₁₂, Tiamina, Rivo flavina, Niacina, Ac. pantoténico, Piridoxina, Biotina. ya que estas bajan sus niveles en los alimentos en presencia de las sustancias tóxicas producidas por los hongos. También los aminoácidos son reducidos en las dietas cuando los períodos de almacén son muy largos y en malas condiciones, y al aparecer la Lisina y Arginina se reducen más severamente que otras. (1,4,11)

H I P O T E S I S

El insuficiente control de calidad de los ingredientes para la nutrición animal y las deficientes técnicas de almacenamiento y manejo aunados a las condiciones climáticas imperantes en nuestro medio, hace que se esperen elevados niveles de contaminación por aflatoxinas en las raciones destinadas a cerdos.

O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL

Determinar y cuantificar las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimento para cerdo en diferentes granjas por técnica de cromatografía en capa fina.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la proporción en que se presenta las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en seis diferentes etapas de alimento para cerdo.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se trabajaron 60 muestras de alimento terminado para cerdo de la siguiente manera: 10 preiniciador, 10 iniciación, 10 desarrollo, 10 engorda, 10 gestación, 10 lactancia.

Estas se recolectaron directamente de la tolva, comederos y del almacén, para formar muestras compuestas de aproximación a 2 kg. Se transportaron al laboratorio de toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara.

La determinación de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ Y G₂ se llevó a cabo por la técnica de Cromatografía en capa fina. Diagrama No. 1.

(27)

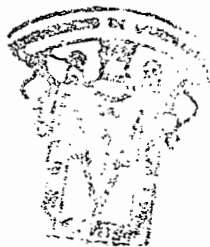


DIAGRAMA # 1

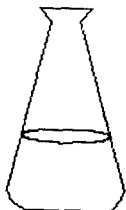
DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE AFLATOXINA B1, B2, G

EXTRACCION

Muestra Molida

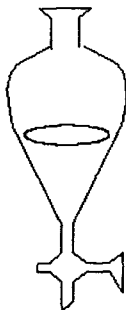
Tamizar en malla No. 20

50 g. de muestra

250 ml. de
cloroformo25 ml. de agua
destilada

agitar durante 30 minutos

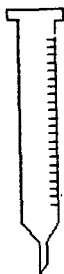
filtrar al vacío

separar el agua del
cloroformorecuperar 100 ml.
del cloroformoevaporar hasta un
volumen de 5 ml.

purificar en columna

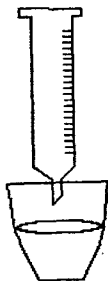
PURIFICACION EN COLUMNA

Empaquetamiento de la columna



Algodón
+
0.5 g. de sulfato de sodio anhidro
+
1 g. de sílica gel 60
(70 - 230 mallas para cromatografía
en columna)
+
1.5 g. de sulfato de sodio anhidro

Purificación



5 ml. del extracto
5 ml. de hexano
5 ml. de éter

desechar

5 ml. de mezcla de
cloroformo metanol
(97:3)

RECUPERAR



evaporar a sequedad

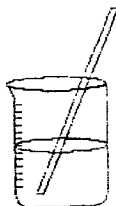
Resuspender en 500 μ l. de
cloroformo al aplicar a la
cromatoplaca

DETERMINACION

PREPARACION DE CROMATOPLACAS

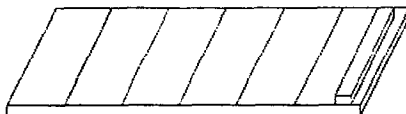
30 g. de sílica gel

66 ml. de agua destilada



agitar

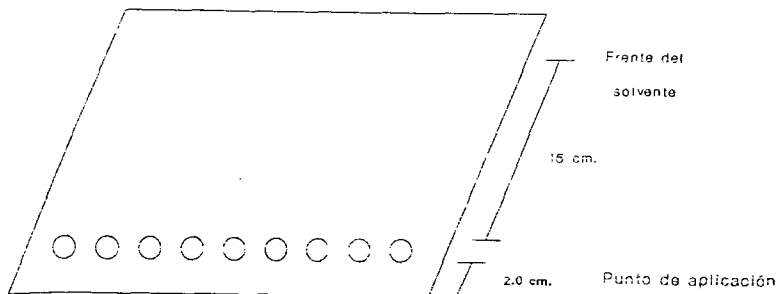
aplicación en placas de cristal 20 X 20 X 0.3 mm.



dejar a temperatura ambiente
durante 30 minutos

activar en horno a 110 °C
durante 60 minutos

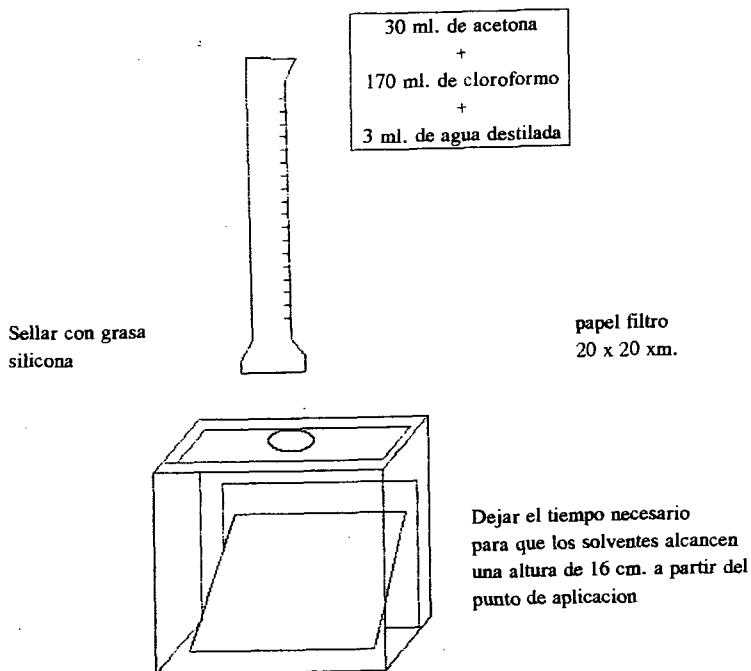
APLICACION DEL EXTRACTO Y ESTANDAR A LA CROMATOPLACA



Muestra 3.5 5 6.5 8.5 mcl.

Estándar 5 3.5 5 8.5 5 1

DESARROLLO DE LA CROMATOPLACA.



Retirar la cromatopla y dejar
secar a temperatura ambiente

Observar a la luz ultravioleta
para comparar fluorescencia de
la muestra contra el estándar

Determinar R_f de la muestra
contra R_f del estándar
mediante la fórmula

$$R_f = \frac{\text{frente de soluto}}{\text{frente de solvente}}$$

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

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

En donde:

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

Y = Concentración del estándar 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

(2, 24, 25)

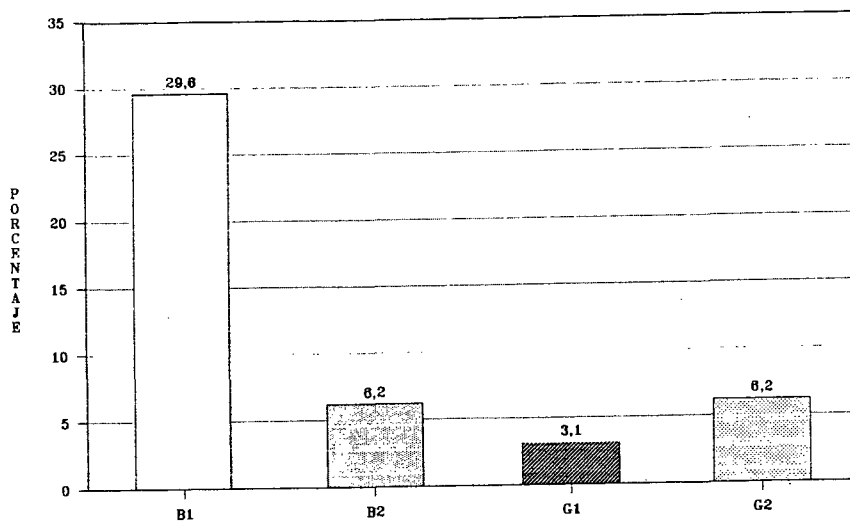
RESULTADOS

Se recolectaron 60 muestras de alimento para cerdo de las cuales 29 fueron positivas a aflatoxinas, con los siguientes porcentajes; de B₁ 29.6%, B₂ 6.2%, G₁ 3.1% y G₂ 6.2% (Gráfica No. 1)

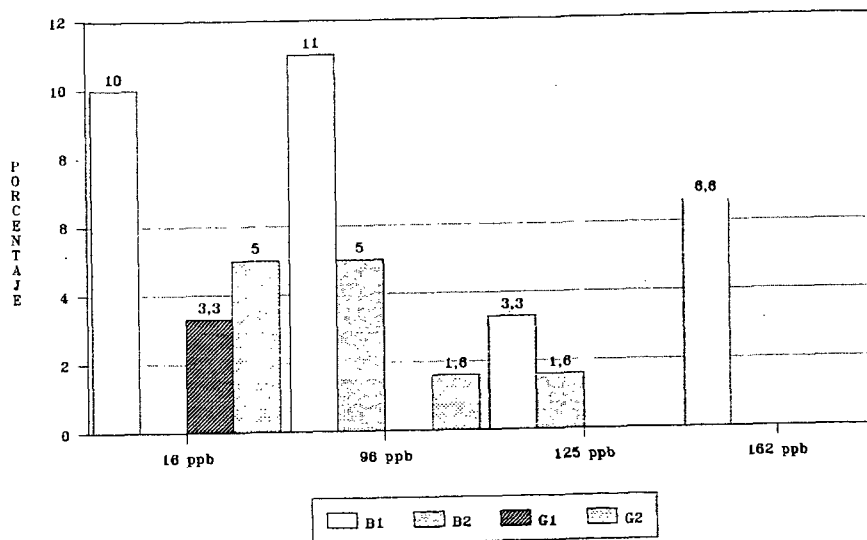
La concentración de las aflatoxinas presentes en el alimento para cerdos, variaron de 16 a 162 ppb, con la siguiente distribución; con 16 ppb B₁ 10%, G₁ 3.3%, G₂ 5%, con 96 ppb B₁ 5%, G₂ 1.6%, con 125 ppb B₁ 3.3%, B₂ 1.6% y 162 ppb B₁ 6.6% (Gráfica No. 2)

El alimento se muestreó de 6 diferentes etapas de alimento, presentando; 15% en la etapa de engorda, 8% de iniciación, Gestación y Lactancia, 6.6% preiniciación y 1.6% de desarrollo (Cuadro No. 1 y Gráfica No. 3)

GRAFICA No. 1

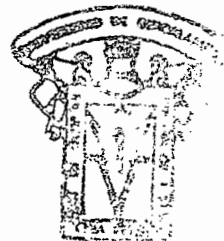
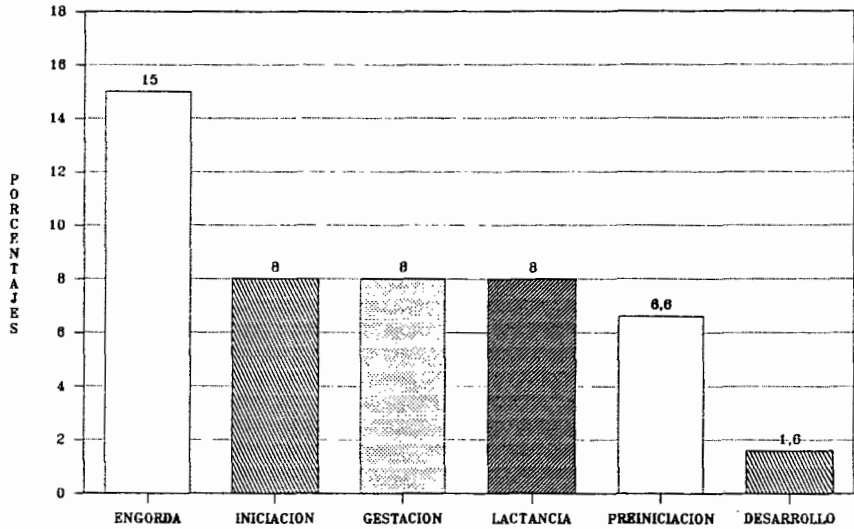
PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN
ALIMENTO PARA CERDO

GRAFICA No. 2
CONCENTRACION DE AFLATOXINAS EN
ALIMENTO PARA CERDO



ppb = partes por billón

GRAFICA No. 3

PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS EN LAS
DIFERENTES ETAPAS DE ALIMENTO

INSTITUTO NACIONAL DE
NUTRICION

CUADRO No. 1 PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE ALIMENTO
PARA CERDO

AFLATOXINA	PREINICIADOR	INICIADOR	DESARROLLO	ENGORDA	GESTACION	LACTANCIA
B1	2	3	1	6	4	3
B2	1	1	-	1	-	1
G1	-	-	-	-	1	1
G2	1	1	-	2	-	-

DISCUSION

Los resultados de esta investigación realizada en el alimento terminado para cerdo en 6 diferentes etapas revelan el grado de contaminación con aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. El 48% de muestras fueron positivas a aflatoxinas. La de mayor porcentaje fue la B₁ con un 29% seguida de B₂ con 6% y G₂ con 6% y por último G₁ con 3%. Esto concuerda con otros estudios realizados, donde la aflatoxina B₁ es la que se observa con mayor frecuencia. (2,13,21,23)

La principal aflatoxina que se produce en el medio natural es la B₁ y la G₁ y sus hidroxiderivados B₂ y G₂. De las cuatro aflatoxinas la más tóxica es la B₁, considerándose el agente carcinogénico más potente que existe en la naturaleza. Por esta razón se le ha estudiado con más profundidad y la mayoría de los efectos bioquímicos notificados se refieren especialmente a esta toxina. (20,23,24)

Wogan et. al. en 1971 estudió la relación entre las estructuras químicas y su hepatocarcinogenicidad concluyendo que la aflatoxina B₁ es más carcinogénica que la G₁ y que ambas son mucho más activas que la B₂ y G₂ donde su toxicidad es menor. (2,12,20)

Las concentraciones de las cuatro aflatoxinas variaron 67 a 162 ppb. Rebasando los niveles de riesgo establecidos por la FAO, estas aflatoxinas se han encontrado cada vez con mayor frecuencia en alimentos que se guardan en condiciones de humedad y temperatura favorables para su desarrollo, así como condiciones inadecuadas de almacenamiento.

La frecuencia de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ varió en las 6 etapas de alimento, presentando la etapa de desarrollo una diferencia muy marcada en comparación a las cinco restantes. Para la elaboración de ciertos alimentos se someten a tratamientos térmicos para dar una presentación al producto. Estas se someten a una temperatura de 82 a 83 °C (180 °F). Esperando que dicho alimento no presente contaminación, lo cual no fue así. Por considerarse las aflatoxinas termoestables y no biodegradables. (9)

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

- 1.- Más del 40% del total de las muestras de alimento para cerdos presentaron aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.
- 2.- Las concentraciones de cada aflatoxina presentes se consideran elevadas y de alto riesgo para su consumo.
- 3.- El alimento es sometido a tratamientos térmicos (82 a 83 °C), esto indica que las aflatoxinas son resistentes a esta temperatura al seguir presentes en estos alimentos.
- 4.- Es importante llevar a cabo un manejo adecuado de almacenaje de alimento sobre todo cuando el clima es extremadamente húmedo.

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

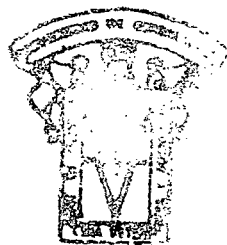
- 1.- ANTILLON R.A., LOPEZ C.C. 1987 ENFERMEDADES NUTRICIONALES DE LAS AVES U.N.A.M. PAG. 1,2
- 2.- AGROTECNIA: 1988 "AFLATOXICOSIS", AVANCES EN MEDICINA VETERINARIA ED. AGROTECNIA. VOL. IV, No. 5/6 PAG. 243, 246, 249.
- 3.- BALCONI I. R. ENERO 1989. "MICOTOXINAS EFECTOS E INTERROGACIONES" TOMO I. TECNOLOGIA AVIPECUARIA. AÑO 2 No.12. PAG. 15,18
- 4.- BUENO L., DIA M.O., GARCIA C. 1989 "PERDIDA DE MATERIA SECA EN EL MAIZ PROVOCADA POR MOHOS". TECNOLOGIA CUBANA. PORCICULTURA MEXICANA AÑO 1 No. 1 PAG. 4-5
- 5.- COTTRAL G. E. 1986. MICROBIOLOGIA VETERINARIA. ED. LA PRENSA MEDICA MEXICANA S.A. PAG. 584, 585
- 6.- CYSEWSKY S.J. 1990. THE ACUTE AND CHRONIC EFFECTS OF AFLATOXIN IN SWINE. USDA-ARS NCR-NADC IOWA PAG. 12-15
- 7.- EDDS G.T. 1981: "AFLATOXINAS Y SALUD ANIMAL" MEMORIAS I CURSO DE ACTUALIZACION DE TOXICOLOGIA VETERINARIA UNAM . PAG. 67, 68, 69

- 8.- HARVEY R. B., KUBENA L. E., PHILIPS T. D., HUFF W. E AND
CORRIER D. E. "PREVENTION OF CLINICAL SINGS OF AFLATOXICISIS
WHIT HYDRATED SODIUM CALCIUM ALUMINOSILICATE ADDED TO DIETS".
VETERINARY TOXICOLOGIA AND ENTOMOLOGY RESEARCH LABORATORY
USDA/ARS PAG. 99, 100
- 9.- HERNANDEZ G.M. 1992: "DETERMINACION DE ESPECIES FUNGICAS Y DE
AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ Y G₂ EN ALIMENTO PARA POLLO DE ENGORDA,
EN GRANJAS DE LA PERIFERIA DE LA CIUDAD DE GUADALAJARA". TESIS
DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA NUTRICION ANIMAL, UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA. PAG. 15,27
- 10.- HUFF W.E., KUBENA L.F. Y DOERR J.A.: AUG-SEP 1988
"INTERACCION DE LAS MICOTOXINAS". CORREO AVICOLA AÑO I VOL.1
No. 7 PAG. 7
- 11.- JONES F. 1987: "CONTROLLING MOULD GROWTHIN FEEDS". FEED
INTERNATIONAL VOL. 8 No. 3 PAG. 49, 50, 51.
- 12.- KURTZ H. J. 1991: "ESTROGENIC SINDROME CAUSED BY ZEARALANONE
(F-2) MICOTOXICOSIS". COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE
UNIVERSITY OF MINNESOTA
- 13.- LINDER E.1989: "TOXICOLOGIA DE LOS ALIMENTOS"
ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. PAG. 83, 84

- 14.- LIN Y.C., AYRES J.C. KOELER P.E. 1980: "INFLUENCE OF TEMPERATURE CYCLING OF THE PRODUCCION OF AFLATOXINAS B₁ Y G₁ BY ASPERGILLUS PARASITICUS APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGYCUS". APLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY. VOL. 40 No. 2 PAG. 333,336
- 15.- MANNIGR. O. 1985.: "DETERMINACION DE AFLATOXINA B₁ EN HIGADO DE POLLO". AVICULTURA PROFESIONAL VOL. 3 No. 2 PAG. 71
- 16.- MORRILLA G. A. 1990.: "AFLATOXINAS E INMUNIDAD". AVIRAMA AÑO 8 VOL. 7. No. 93 PAG. 17, 23
- 17.- MORECHA CH. J. , KURTZ H. J. AND MEADE R. 1990: "THE ASSOCIATION OF THE MYCOTOXIN DUACETOXISCIRPENOL (DAS) WITH HEMORRAGIC BOWEL SYNDROME (PROLIFERATIVE HEMORRAGIC ILEOPAHY IN SWINE)". COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE. UNIVERSITY OF MINNESOTA
- 18.- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD: 1990 CRITERIOS DE LA SALUD AMBIENTAL. TOMO II "MICOTOXINAS" ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. PAG. 483,485
- 19.- OSUNA S. O. 1989. MICOTOXINAS AVIAR. CURSO DE ACTUALIZACION SOBRE MICOTOXICOSIS AVIAR. ANECA. PAG. 1,9,10,12,15,29,30,89

- 20.- OSWEILER G.D. 1980: "ASSOCIATED WITH BLEEDING DISORDERS IN SWINE". COLLEGE OF MEDICINE UNIVERSITY OF MISSOURI PAG. 60-65
- 21.- PALACIOS F.C. MORAN S.C. VILLA M.L.1990: "DETERMINACION DE AFLATOXINA B₁ EN ALIMENTO PELETIZADO PARA POLLO DE ENGORDA". CIENCIA ANIMAL ED. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA. PAG. 9, 13
- 22.- PEREZA C. AGRICULTURA TECNICA 1990 AÑO XII No. 164, PAGES. 2, 3, 4
- 23.- QUEZADA T.T.; CUELLAR P.L. ; JARAMILLO J.F. VALDIVIA.F.A. Y ORTIZ M.R. 1989: "ACTIVIDAD DE ENZIMAS HEPATICAS EN POLLOS INTOXICADOS CON AFLATOXINAS B₁." ED. ANECA PAG. 230
- 24.- ROSILES M.R. 1979. "LAS AFLATOXINAS EN LAS TORTILLAS" EDITORIAL VETERINARIA MEXICANA UNAM. VOL. X No. 1 PAG. 27,29
- 25.- SUNGER S. H. 1981. "INTRODUCCION A LA HIGIENE DE LOS ALIMENTOS". EDITORIAL ACRIBIA. PAG. 37
- 26.- WAGSTAFF R. W. SEPT. 1990: "HONGOS Y MICOTOXINAS EN ALIMENTOS PARA CERDOS". CERDOS-SWINE. TECNOLOGIA INTERNACIONAL. AÑO 1. No. 2 PAG. 19, 20.

- 27.- WILLIAMS S. 1984: ED. OFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTE USA. CHAPTER 26.
- 28.- WISEMAN M.O., RALPHL., PRICE D. 1982. "TOXICITY OF AFLATOXIN B₁ TO PENAEID SHRIMP". APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY VOL.44 No. 6 PAG. 1479, 1481.
- 29.- WYATT R.D. 1988: "COMPARACION DE LAS TECNICAS DE LA LUZ ULTRAVIOLETA Y ELISA PARA CONTAMINACION POR AFLATOXINAS EN EL MAIZ". AVICULTURA PROFESIONAL VOL. 6 No. 3 PAG. 109



INSTITUTO DE
ESTUDIOS CIENTÍFICOS