

Presencia de micotoxinas en alimentos balanceados para ponedoras

*Toso, R. E.; Toribio, M. S.; Diesser, M.; Borrello, A. B.; Ardoino, S. M.
Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos. Facultad de Ciencias
Veterinarias, UNLPam.*

Correspondencia: cidef@vet.unlpam.edu.ar

Recibido: 17 de octubre de 2016

Aceptado: 25 de noviembre de 2016

Resumen

Los alimentos balanceados para gallinas ponedoras pueden estar contaminados con hongos. Las micotoxinas producidas por éstos generan problemas económico-productivos en las aves, tales como disminución de la producción, pérdida del estado general y en casos extremos la muerte. Las micotoxinas que más afectan a las aves son las aflatoxinas producidas por el género *Aspergillus*. El objetivo del presente trabajo fue relevar la presencia de aflatoxinas en alimentos comerciales y manufacturados por productores para gallinas ponedoras en la ciudad de General Pico, La Pampa. Las muestras obtenidas se analizaron por el método de ELISA. En el año 2014 se determinó la presencia de niveles tóxicos de aflatoxinas en el 77,8% de las muestras analizadas, en tanto que en la primera mitad del año 2015 se analizaron 17 muestras obteniéndose niveles por encima de los deseables en el 64,7% de las mismas. La presencia de aflatoxinas en los alimentos es consecuencia de la falta de controles de calidad a la materia prima y sistemas de almacenamiento inadecuados. Estos resultados determinan la necesidad de que aquellas personas que manipulan alimentos balanceados adopten medidas preventivas para evitar los riesgos a los cuales se exponen. Mientras tanto, el uso de secuestrantes es la indicación más adecuada para reducir los efectos tóxicos en las aves y evitar pérdidas en la producción.

Palabras claves: micotoxinas, aflatoxinas, alimentos balanceados, gallinas ponedoras.

Presence of mycotoxins in balanced food for laying hens

Abstract

The balanced food for laying hens may be contaminated with strains of fungi. The mycotoxins produced by them generate economic and productive problems in birds, such as decreased production, loss of overall state and death in extreme cases. The mycotoxins that affect more birds are aflatoxins produced by *Aspergillus* genus. The aim of this study was to assess the presence of aflatoxins in commercial and manufactured by farmers food for laying hens in the city of General Pico, La Pampa. The samples obtained were analysed by the ELISA method. In 2014 the presence of toxic levels of aflatoxin was determined in 77,8% of the analysed samples, while in the first half of 2015 out of 17 samples 64,7% of them were with toxic levels. The appearance of Aflatoxins in foodstuff is a result of the lack of quality controls of the raw materials and inadequate storage systems. These results determine the need for preventive measures for food handlers to avoid risks to which they are exposed. Meanwhile, the use of sequestrants is the most appropriate indication to reduce toxic effects on birds and avoid production losses.

Keywords: mycotoxins, aflatoxins, balanced food, laying hens.

Introducción

La introducción de nuevos métodos de almacenamiento de granos, como la incorporación del silo bolsa, contribuyeron a que se detecten con mayor frecuencia problemas por micotoxicosis (CAST, 2013). Principalmente el control se realiza sobre hongos micotoxigénicos pertenecientes al género *Aspergillus spp.* (Tomasevi-Canovi *et al.*, 2003; Vaamode *et al.*, 2003). Las aflatoxinas producidas por este género, B1, G1, B2 y G2, tienen importancia en salud humana y animal. Se ha determinado que la más tóxica es la B1 provocando serios problemas en la salud, como la posibilidad de inducir carcinoma hepatocelular por formación de ligandos, entre los metabolitos que se forman en el hígado y el ADN de los hepatocitos, alterando la replicación hepatocelular (Smela *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 2002). El inadecuado almacenamiento y condiciones ambientales desfavorables antes de

la cosecha, pueden actuar aumentando el efecto tóxico de estas aflatoxinas. Estudios epidemiológicos, llevados a cabo en seres humanos en Asia y África, evidencian una posible correlación entre la ingesta de alimentos contaminados con la presencia de otras enfermedades (Groopman *et al.*, 1996; Periacca *et al.*, 1999; Egner *et al.*, 2001). También se ha demostrado que producen un efecto aditivo cuando la toxicosis se presenta combinada con algunos agentes químicos (Combata Prieto *et al.*, 2009; Torres, 2011).

Las aflatoxinas presentes en los cereales contaminan, por distintas vías de ingreso, tanto a animales como a seres humanos expuestos por vía oral, por inhalación (Lakab *et al.*, 1994; Krysnska Traczyk *et al.*, 2001) y también por vía cutánea (Pitt, 1996), alcanzado niveles sistémicos que producen efectos tóxicos de curso crónico como carcinogenicidad, inmunosupresión y disrupciones endócrinas (Wild y Hall, 1996; Frink Gremmels *et al.*, 1999). Esta característica hace difícil identificar a las aflatoxinas como los agentes etiológicos responsables de estas enfermedades en seres humanos o del atraso en el desarrollo y la producción en animales. Por el contrario, cuando los cereales poseen una alta concentración, los síntomas se muestran rápidamente y resultan orientativos para el diagnóstico.

De acuerdo con lo expresado, bajas concentraciones de aflatoxinas en alimentos destinados a gallinas ponedoras pueden pasar desapercibidas, ya que en general, el balanceado no presenta alteraciones a simple vista que evidencien mal estado. Tampoco sería posible observar alteraciones por altas concentraciones si los alimentos balanceados han sido procesados adecuadamente y se encuentran uniformemente mezclados. Por otro lado, como se indicó, los síntomas tardan un tiempo en aparecer, dependiendo directamente de la concentración de estas toxinas en el alimento. Pero representan un grave peligro para las personas que manipulan los alimentos balanceados sin protección adecuada, considerando las vías de ingreso de las aflatoxinas al organismo. Estas características ponen en evidencia la necesidad de realizar controles sistemáticos. En general, los productores avícolas confían en la calidad de los alimentos comerciales, pero puede ocurrir que determinadas condiciones de humedad durante el proceso de almacenaje favorezca el crecimiento de hongos y éstos liberen aflatoxinas por encima de niveles de 20 µg/kg. Se indica este valor ya que es aplicado por 17

países, la mitad de ellos en América Latina, armonizado en el MERCOSUR y en varios países del África. También en los Estados Unidos, uno de los primeros en fijar un límite de acción para las aflatoxinas, se rigen por este límite (FAO, 2004).

En la fabricación de alimentos, ante la disponibilidad de materia prima contaminada pueden adoptarse dos opciones, descartarla o minimizar los riesgos empleando sustancias secuestrantes (Bueno *et al.*, 2001).

Se utilizan dos tipos de secuestrantes: los orgánicos y los inorgánicos. Los primeros ligan la toxina en sitios de unión sin que estén relacionados directamente con cargas electrostáticas y corresponden, en general, a derivados de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (b-D-glucanos). Estos productos presentan acción secuestrante para diversas micotoxinas, entre ellas las aflatoxinas. Los secuestrantes inorgánicos, ligan la micotoxina por diferencia de carga. Entre estos compuestos pueden mencionarse a minerales de arcillas como por ejemplo bentonita, zeolitas, carbón activado, colestiramina y clorofilina. Estos secuestrantes inorgánicos tienen mayor especificidad sobre las aflatoxinas (Shatzmayr, 2004; Zakhia Rozis *et al.*, 2007; Diaz y Smith, 2008).

Las pérdidas económicas que generan las aflatoxinas, junto con el riesgo potencial para los consumidores y personas que manipulan alimentos, evidencian la necesidad de analizar esta problemática para determinar el estado actual de la situación y eventualmente proponer medidas preventivas. El agregado sistemático de secuestrantes demostró resultados satisfactorios para prevenir los problemas en las aves, ya que se evita la absorción intestinal de las micotoxinas presentes en el alimento, sin embargo, aún queda un riesgo latente para las personas que trabajan en criaderos y están expuestos al contacto cutáneo y a la inhalación de estas sustancias. Con respecto a este riesgo latente la Organización Panamericana de la Salud, determinó que “en países desarrollados, la contaminación por aflatoxinas raramente afecta alimentos en niveles suficientes para causar aflatoxicosis aguda en seres humanos. Por ese motivo, los estudios de la toxicidad en el hombre apuntan hacia su posible efecto carcinogénico”.

Los antecedentes expuestos parecen relativizar los efectos sobre la producción y la toxicidad en animales cuando se emplean secuestrantes. Sin embargo, ponen en duda la potencial

gravedad de sus efectos en seres humanos a largo plazo. Por este motivo, se llevaron a cabo estudios de alimentos balanceados de origen comercial o preparados por los propios productores en la zona de influencia de la ciudad de General Pico, La Pampa, destinados a la alimentación de gallinas ponedoras y pollos parrilleros con el objetivo de determinar el grado de alimentos y materia prima destinada a la elaboración de balanceados contaminados. Estudios previos realizados durante el año 2014 por este grupo de trabajo, determinaron que el 77,8% de las muestras contenían aflatoxinas. En esta publicación se muestran los resultados obtenidos en el año 2015.

Materiales y Métodos

Obtención de las muestras

Se recolectaron al azar muestras de alimentos, preparados por productores y de materia prima en la zona de influencia de General Pico, La Pampa. Las muestras, de 200 gramos cada una, se preservaron en bolsas de plástico, fueron rotuladas y llevadas al Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) de la Facultad de Veterinaria para su conservación, aisladas de la luz y refrigeradas hasta el momento de la realización de los ensayos.

Preparación de la muestra: Extracción de las aflatoxinas

Cada muestra por separado fue molida y tamizada. Se pesaron 20 g de las muestras de alimento balanceado y 10 g de la muestra de maíz. Se extrajeron agregando 100 mL de una solución metanol-agua (70/30, v/v) y agitó durante 3 minutos. Se dejó sedimentar y filtró utilizando papel de filtro Whatman grado 1 conservando el sobrenadante. Los extractos obtenidos se rotularon y controló el pH (rango 6-8, requerido para evaluar la presencia de aflatoxinas por el test de ELISA).

Determinación de aflatoxinas

Se determinó la concentración de aflatoxinas presentes en los extractos obtenidos de las muestras por medio de la prueba de inmunoensayo enzimático competitivos de tipo ELISA (Fernandez-Surumay *et al.*, 2000).

El Kit comercial empleado para determinar la presencia de aflatoxinas totales fue el AgraQuant® Total Aflatoxin

(COKAQ1000) con un rango de cuantificación de 4-40 ng/ml y límite de detección de 3 ng/ml.

Las soluciones estándar y las muestras fueron añadidas a los pocillos que contienen los anticuerpos anti-aflatoxinas. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Durante el período de incubación, las moléculas libres de aflatoxinas se unen a los mencionados anticuerpos. Las sustancias que quedan sin unir se eliminan en el proceso de lavado con agua destilada. La actividad de la enzima ligante se determina añadiendo una enzima sustrato que da a la solución un color azul. Se lo dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente y luego se añadió la solución stop, la cual frena la reacción y produce un cambio de coloración de azul a amarillo.

Resultados

Se determinó la presencia de aflatoxinas en el 64,7% de las muestras analizadas. El cálculo porcentual se realizó sobre el total de muestras analizadas. Las muestras que mostraron valores inferiores a 12 ppb de aflatoxinas totales fueron consideradas negativas (Lesson, *et al.*, 1996).

Tabla 1. Resumen de las muestras analizadas en alimentos y maíz para determinar el grado de contaminación con aflatoxinas. Primer Semestre de 2015.

Sustrato	Muestras positivas/ Muestras totales	Rango de contaminación
Alimento balanceado comercial	2/4	25 ppb
Alimento balanceado elaborado por productores	4/6	32 ppb
Maíz	5/7	40 ppb

Ref. Las muestras fueron analizadas con el método de ELISA.

Discusión

En el presente estudio se determinó y cuantificó por medio de la técnica de ELISA la concentración de aflatoxinas en alimentos balanceados comerciales, preparados por productores y maíz

destinado a la alimentación de ponedoras. Pineda Mejía *et al.* (2012) pone en duda la técnica de ELISA como único método de detección, sin embargo otros estudios llevados a cabo por Fernandez Surumay *et al.* (2000) determinaron que el método espectrofotométrico ELISA es rápido, sensible y puede detectar niveles entre 0,26 y 44 ng/ml. Esta afirmación permitió al grupo de trabajo seleccionar el método de ELISA aceptándolo como confiable para este relevamiento.

Un estudio similar realizado por los autores, fue llevado a cabo durante el año 2014 evidenciando la presencia de aflatoxinas en el 77,8% de las muestras de alimento balanceado y maíz empleado para su elaboración.

Los datos obtenidos en este trabajo durante el año 2015 muestran que el 64,7% de las muestras superan las 12 ppb.

Teniendo en cuenta que el número de muestras recolectadas fueron al azar y que las muestras de materia prima, maíz, estaban destinadas a la elaboración de alimentos balanceados, se considera que los resultados 2014 - 2015 evidencian un alto porcentaje de contaminación.

No se han realizado estudios en la zona de influencia donde se realizó este trabajo que determinen el beneficio que se le atribuye al uso de secuestrantes evitando los efectos inmunológicos y la pérdida de la eficiencia en la producción por la ingesta de alimentos contaminados descriptos por Chi Fang y Broomhead (2009).

Mallmann *et al.* (2007), señalaron que las inadecuadas condiciones de almacenamiento como elevada temperatura y humedad ambiente y mala aireación, favorece el desarrollo de micotoxinas, las que aumentan proporcionalmente al tiempo de almacenaje. El tiempo de almacenaje varía según la demanda y más recientemente está vinculado con la política comercial del país, tales los casos de la estrategia utilizada por los agricultores, quienes conservan los cereales en los silos bolsa hasta el momento del año en que logran mayor precio para sus productos. Con respecto a la demanda de cereales por la avicultura, ésta es mayor en los meses de noviembre y especialmente diciembre. Generalmente, los últimos silo - bolsas se abren en enero y febrero, en vísperas de la nueva cosecha. En ambos casos, el tiempo de almacenamiento excede ampliamente las recomendaciones de utilización de esta tecnología. Un estudio realizado por Cuniberti, (2014) determinó que para trigo, soja y maíz

los períodos recomendados de almacenaje en silo bolsa, según la humedad son los siguientes: a) Riesgo Bajo con humedad inferior al 14%, de 6 a 12 meses. b) Riesgo Medio con humedad entre el 14 y 16%, de 2 a 6 meses y c) Riesgo Alto con humedad superior al 16%, de 1 a 2 meses.

Rodríguez *et al.*, (2002) realizaron un estudio detallado de distintos aspectos relacionados con la conservación en silo bolsa, analizando el efecto del almacenaje a través del tiempo. Sin embargo, aun conociendo los períodos de almacenamiento aconsejados, factores relacionados con la política económica del país determinaron que se excedan largamente. Con el fin de monitorear la presencia de micotoxinas en silos bolsa de maíz, con prolongado tiempo de almacenamiento, el Laboratorio de Control de Calidad de Biofarma, programó un muestreo en distintas zonas del país en los meses de enero y febrero de 2006. Por el método de ELISA se encontraron aflatoxinas en el 24,6% de las muestras que fueron almacenadas entre 8 y 11 meses.

Conclusiones

- Estudios realizados en el año 2014 y 2015 determinaron que el 77,8% y 64,8% respectivamente de las muestras de alimentos balanceados y maíz destinado a la alimentación de las aves contenían niveles de aflatoxinas totales superiores a 12 ppb.
- Los resultados de este trabajo determinan que un elevado porcentaje de muestras de alimentos destinados a la alimentación de las aves se encuentran contaminadas con aflatoxinas.
- Es evidente que el uso sistemático de secuestrantes resulta efectivo para prevenir la absorción intestinal de las aflatoxinas explicando la falta de síntomas.
- El elevado porcentaje de muestras positivas debe ser considerado como una alerta para tomar precauciones relacionadas con el cuidado de la salud de operarios que están en contacto con los alimentos.

Bibliografía

Bueno, D.J.; Salvano, M.; Silva, J.O.; González, S.N. y Oliver, G. 2001. Micotoxinas: Diagnóstico y Prevención en Aves de Corral. Boletín Micológico, 16: 23-36.

- CAST 2003.** Mycotoxins: Riskinplant ,animal and human systems. Council of Science and Technology. Ames, Iowa, USA.
- Chi, F.; Broomhead, J. 2009.** Micotoxinas y Aves. Una Revisión para productores de Aves. Amlan International. Chicago, Illinois, USA. P. 15.
- Combata Prieto, A.P.; Mildenberg Ortiz, S. 2009.** Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona de Valle del Cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. P. 111.
- Cuniberti, M. B. 2014.** Almacenamiento de granos (silo bolsa) y calidad. Publicación del INTA. <http://inta.gob.ar/documentos/almacenamiento-de-granos-silo-bolsa-y-calidad-trigo>
- Díaz, D.E y Smith, T.K. 2008.** Agentes secuestrantes de micotoxinas: herramientas prácticas para su neutralización. Pp. 345-362. En El libro azul de micotoxinas, D.E. Díaz (ed.), Nottingham University Press, Inglaterra.
- Egner, P.; Wang, J-B.; Zhu, Y-R.; Zhang, B-C.; Wu, Y.; Zhang, Q-N. 2001.** Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. Proceeding of National Academy of Science, 98(25): 14601-14606.
- FAO, 2004.** Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición.
- Fernandez-Surumay, G.; Negrón-Gonzales, G.; Isea-Fernández, G.; Sánchez-Camarillo, E. 2000.** Report of quantitative analysis of aflatoxins by ELISA method in raw ingredients samples of balanced feed for poultry a factory located at Mara municipality of Zulia State, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ, 10 (1): 63-68.
- Frink-Gremmels, J. 1999.** Mycotoxins: their implications for human and animal held. The Veterinary Quarterly, 21 (4): 115-120.
- Groopman, J.D.; Wang, J.S.; Scholl, P. 1996.** Molecular biomarkers for aflatoxins: from ad ducts to gene mutations to human liver cancer. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 74: 203-209.
- Jakab, G.J.; Hmielewski, R.R.; Zarba, A.; Hemenway, D.R.; Groopman, J.D. 1994.** Respirat aflatoxicosis: Suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. Toxicology and Applied Pharmacology, 125: 198-205.
- Krysińska-Traczyk, E.; Kiecoma, I.; Percowsky, J.; Dutkiewicz, J. 2001.** Mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms of eastern Poland. Annals of Agricultural Environmental Medicine, 8: 268-274.
- Leeson, S.; Díaz, G.; Summers, J.D. 1996.** Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books. Guelph, Ontario, Canada. P. 345.
- Mallmann, C.A.; Dilkin, P.; Giacomini, L.Z.; Rauber, R.H.; Pereira, C.E. 2007.** Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Porto Alegre. Brasil. Pp. 191-204.
- Periaca, M.; Radi, B.; Luci, A.; Pavlovi, M. 1999.** Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Bulletin of the World Health Organization, 77 (9): 754-766.
- Pineda Mejia, A.; Flores Ortiz, C.M.; Hernandez Portilla, L.B.; Urzua Meza, M.A. 2012.** Métodos de análisis de Micotoxinas en granos y alimentos de uso pecuario. http://www.avicultura.com.mx/uploads/temp/Articulo_Metodos_de_analisis_de_micotoxinas_en_granos_y_alimentos_de_uso_pecuario.pdf.

- Pitt, J.I. 1996.** ¿What are mycotoxins? Australian Mycotoxin Newsletter, 7(4): 1-8.
- Rodríguez, J.; Bartosik, R.; Malinarich, H.; Exilart, J y Nolasco, M. 2002.** Almacenaje de granos en bolsas plásticas: Sistema Silobag. Informe Final de maíz. Fundación ArgenInta. EEA INTA Balcarce. P. 27.
- Shatzmayr, D. 2004.** Estrategias combinadas para el control de micotoxinas. *Avicultura Profesional*, 22: 28-30.
- Smela, M.E.; Hamm, M.L.; Henderson, P.T.; Harris, C.M.; Harris, T.M.; Essigmann, J.M. 2002.** The aflatoxinB1 formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proceeding of National Academy of Science*, 99(10): 6655-6660.
- Tomasevi-Canovi, M.; Dakovi, A.; Rottinghaus, G.; Matijasvi, S.; Durii, M. 2003.** Surfactant modified zeolites-new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials*, 61: 173-180
- Torres, A.M. 2011.** Ocurrencia de micotoxinas en alimentos en Argentina y Mercosur. XII Congreso Argentino de Micología, XII Jornadas Argentinas de Micología, Posadas, Misiones. P. 124.
- Vaamode, G.; Patriarca, A.; Fernández, V.; Comercio, R.; Degrossi, C. 2003.** Variability of *Aspergillus flaviaflatoxin* and cyclopiazonic acid production by section from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 79-84
- Wild, C.P.; Hall, A.J. 1996.** Epidemiology of mycotoxin-related disease. Human and Animal Relationships. Howard/Miller Eds. Berlin Heidelberg. Pp 213-226.
- Wild, C.P.; Turner, P.C. 2002.** The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decision. *Mutagenesis*, 17(6): 471-481.
- Zakhia-Rozis, N.; Catalá A.I.; Soriano J.M. 2007.** Trazabilidad y descontaminación/detoxificación de las micotoxinas. En *Micotoxinas en alimentos*, J.M. Soriano del Castillo (Coord.). Ed. Díaz de Santos, España. Pp. 119-132.