

P PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN GRANOS Y RACIONES PARA CERDOS

^{1,2}Knass, Patricia S / ¹Klein, Patricia A. / ¹Marucci, Raúl S.

¹Laboratorio de Análisis Micológico y Micotoxinas en Alimentos (LAMMA) - Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Mariano Moreno 1375, (3300), Posadas, Misiones, Argentina. TE: 03752-427687. FAX: 03752-435118.

²Centro de Investigación en Micotoxinas (CIM) - Universidad Nacional de Luján.

Correspondencia: E-mail: patrisk@fceqyn.unam.edu.ar

MYCOTOXINS PRESENCE IN GRAINS AND SWINE FEEDS

ABSTRACT

Experiments were conducted to determine the levels of contamination of feed diets and feedstuffs for swine with Aflatoxins and Zearalenone. During a three-months period, 11 feedstuff samples and 5 samples of starter swine feed were obtained. The BF Method modified with toluene for two mycotoxins extraction was used. Determination and semi-quantification of mycotoxins was carried out by TLC, spotting samples extracts and known concentration standards in silica-gel plates, which were later observed and confirmed under UV light. In starter swine feed, a mean of 16,8 ppb of Aflatoxins and 620 ppb of Zearalenone were found. The corn grains presented the highest values in contamination with both mycotoxins. The average of Aflatoxins was calculated in the whole feedstuffs and a value of 18 ppb was obtained, while the value for Zearalenone was 527 ppb. Although the average values of both mycotoxins in the feeds are low, variations to be found in the feedstuffs should be periodically controlled, so as to reduce to the minimum the contamination of manufactured feeds.

KEY WORDS: mycotoxins, swine, feeds, feedstuffs.

RESUMEN

Se realizaron experiencias a fin de determinar los niveles de contaminación de alimentos balanceados y materia prima para la elaboración de raciones para cerdos con Aflatoxinas y Zearalenona. Se obtuvieron, en un período de tres meses, 11 muestras de materia prima y cinco muestras de raciones de tipo "Iniciador". Para la extracción de las dos micotoxinas, se utilizó el Método BF modificado con tolueno. La determinación y la semi-cuantificación de las micotoxinas se realizó mediante TLC, sembrando los extractos de las muestras y patrones de concentración conocida en placas de sílica-gel, que luego se observaron y confirmaron bajo luz UV. En las raciones se encontró Aflatoxinas con un valor medio de 16,8 ppb y de 620 ppb de Zearalenona. El maíz en grano presentó los valores más altos de contaminación con ambas micotoxinas. Se calcularon los promedios para Aflatoxinas en toda la materia prima y se obtuvo un valor de 18 ppb, y para la Zearalenona de 527 ppb. Si bien los valores promedios de ambas micotoxinas en las raciones son bajos, se deben controlar en forma periódica las variaciones que pueden hallarse en la materia prima, para proceder de tal manera de reducir al mínimo la contaminación de los alimentos elaborados.

PALABRAS CLAVES: micotoxinas, cerdos, alimentos balanceados, granos.

INTRODUCCIÓN

Se estima que cada año, el 25% de las cosechas mundiales están afectadas por micotoxinas. Estas toxinas de origen fúngico son producidas principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* [1]. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos en respuesta a factores de estrés que actúan sobre éstos [2]. Rara vez se encuentra en forma aislada un solo tipo de hongo o micotoxina, y dos o más micotoxinas pueden ejercer un mayor efecto tóxico que cada una por separado, es decir que sus acciones se sinergizan [3, 4].

La presencia de micotoxinas en granos y raciones, cuyo tipo o estructura química depende del desarrollo de cepas fúngicas específicas, está sujeta a la influencia de factores ambientales como humedad del sustrato y temperatura ambiente, además del método de procesamiento o producción, almacenamiento y tipo de sustrato [5].

Entre las micotoxinas que más afectan a los cerdos en las regiones subtropicales, prevalecen a) Aflatoxinas, b) Zearalenona, c) Vomitoxina y d) Fumonisin. Con respecto a esta dos últimas, aún no se han realizado estudios en la región Nordeste de la Argentina.

Las Aflatoxinas, tipo B₁, B₂, G₁ y G₂ son producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que son de distribución universal y muy frecuentes en las raciones y en el maíz. Casi todas las raciones permiten un aislamiento en laboratorio de estos hongos, lo que equivale a decir que prácticamente la totalidad son susceptibles de presentar un crecimiento descontrolado de estos microorganismos, en caso de presentarse las condiciones adecuadas de humedad. La temperatura ideal para su crecimiento es de 28°C, pero son microorganismos poco exigentes en este término, y pueden desarrollarse desde los 18°C hasta los 40°C aproximadamente. Contando con una temperatura óptima y un sustrato adecuado, por ejemplo maíz, estos hongos necesitan solamente cinco a siete días para producir concentraciones altas de aflatoxinas si la humedad del producto fuera al menos del 18% [6].

Las Aflatoxinas son las micotoxinas de mayor influencia en la performance porcina. El efecto del consumo de raciones contaminadas en este aspecto depende de la edad y la salud del animal, los niveles de concentración de toxina en el alimento, y el período de ingesta del mismo. Los cerdos jóvenes son los más afectados. Bajos niveles de Aflatoxinas (20 a 200 ppb) ejercen acciones inmunosupresoras, tornando al animal más susceptible a las infecciones y reduciendo la ganancia de peso, afectando la conversión alimenticia; cuando la exposición es prolongada, puede presentarse cáncer, daño hepático e

ictericia. Altos niveles de contaminación (1.000 a 2.000 ppb) producen aflatoxicosis aguda, provocando la muerte del animal en pocas horas, con daño hepático evidente y hemorragias, (ver Tabla 1) [7]. En la leche de las cerdas se puede encontrar Aflatoxina M₁ cuando consumen raciones medianamente contaminadas, y esto puede producir disminución del desarrollo y mortandad en los lechones.

Otra toxina muy común en las raciones para cerdos es la Zearalenona producida principalmente por *Fusarium graminearum*, pero otras especies también la pueden producir: *F. sporotrichioides*, *F. roseum* y *F. culmorum*. Esta micotoxina tiene efectos similares a la hormona femenina estrógeno y puede inducir a la feminización aun cuando se encuentre en bajas concentraciones. Estas especies poseen características peculiares de exigencia en lo que respecta a la temperatura de desarrollo, necesitando de 24°C a 28°C para un crecimiento óptimo, pero de 14°C a 17°C para la síntesis de Zearalenona. Esto hace que la toxina aparezca en los alimentos susceptibles en los períodos fríos en que hay oscilación de la temperatura, como ser la fase entre otoño e invierno y cuando se presentan temperaturas más cálidas en el invierno. Cuando los índices de humedad son adecuados, el hongo crece abundantemente en la semana de calor, y en la semana siguiente, cuando disminuye la temperatura, comienza a sintetizar la toxina contaminando el alimento [6]. Altas concentraciones interfieren con la ovulación, concepción, implantación y desarrollo fetal. En los no-natos, puede aumentar el número de abortos y fetos mortinatos, los lechones nacidos pueden presentar baja probabilidad de sobrevivencia o vulva hinchada [8]. Las hembras jóvenes son las más sensibles: concentraciones bajas pueden conducir a un pseudoestro y prolapso rectal o vaginal. Cuando las hembras pre-púberes consumen raciones contaminadas con Zearalenona presentan la vulva hinchada y enrojecida, con un pico evidente luego de las seis semanas del comienzo de la ingesta, y esto causa un alto índice de prolapso vaginal. En los jóvenes reproductores puede producirse disminución de la libido y disminución del tamaño testicular, pero no hay consecuencias evidentes de intoxicación en los reproductores adultos, aun en concentraciones altas [9]. En los capones, que consumen alimento para terminación, las concentraciones altas afectan muy poco la conversión alimentaria.

Algunos países, como ser Brasil y la Unión Europea, tienen especificaciones acerca de los niveles máximos recomendados de Aflatoxinas y Zearalenona, para las materias primas destinadas a la elaboración de alimentos balanceados, y raciones completas para cerdos [10]. (Ver Tabla 1).

Tabla 1: niveles de concentración máxima de micotoxinas presentes en raciones y materia prima para ganado porcino establecidos por la Unión Europea

Niveles de Aflatoxinas y Zearalenona aceptados para materia prima destinada a la elaboración de raciones	
Aflatoxinas	50 ppb
Zearalenona	1.000 ppb
Niveles de Aflatoxinas y Zearalenona aceptados en raciones para cerdos	
Aflatoxinas	20 ppb
Zearalenona	500 ppb

El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de contaminación por Aflatoxinas y Zearalenona, en muestras de materia prima destinada a la manufactura de alimentos balanceados para cerdos y raciones de tipo Iniciador que se elaboran y consumen en la provincia de Misiones, debido a las características climáticas que favorecen el desarrollo de los géneros fúngicos potencialmente micotoxigénicos y la producción de toxinas por los mismos en esta región de la Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

La obtención de la muestra se resolvió con el método propuesto por GIPSA-USDA (Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration – United States Department of Agriculture) [11], tomando las muestras en distintos puntos de los silos, utilizándose para ello una sonda de profundidad, lográndose una muestra global de 5 kg, que por cuarteo se redujo a 500 g, que fue lo recibido en el laboratorio. Cada muestra de materia prima correspondió a un nuevo lote adquirido por la empresa fabricante de las raciones provenientes de distintos puntos del país, durante un período de tres meses; en total fueron 11: siete de maíz en grano (MG), dos de *pellets* de soja (PS), uno de afrechillo de trigo (TA) y una de soja desactivada (SD).

Las muestras de alimentos, en total cinco, correspondieron una a cada nuevo lote de raciones de tipo “Iniciador”, elaborado con la materia prima analizada.

Extracción y análisis de las micotoxinas

Se procedió a la extracción de las Aflatoxinas y Zearalenona, utilizando el método BF modificado con tolueno [12, 13]. Cada muestra recibida en el laboratorio se molió con un molino de martillos hasta alcanzar una granulometría de 20 mesh, luego se tomaron 50 g del material molido y se mezclaron, en un vaso de precipitado de 500 ml, con 250 ml de una solución metanol-agua

(55:45), 100 ml de hexano y 4 g de cloruro de sodio, sometiéndose a agitación con un agitador de paletas durante 10 minutos; una vez cumplido el tiempo, se procedió a filtrar con un embudo y papel de filtro; se separaron las dos fases, y se recogieron 25 ml de la fase acuosa, que se colocó en una ampolla de decantación donde se realizaron dos extracciones sucesivas con 25 y 12 ml de tolueno respectivamente, y se recogió la fase orgánica en un vaso de precipitado, pasando a través de un lecho de sulfato de sodio anhidro, se colocó la fase del tolueno en un balón y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a 80°C. El residuo seco se resuspendió en 200 µl de benceno-acetonitrilo (98:2) y se sembró 10 µl en una placa de sílica gel 60 con base de aluminio. También se sembraron patrones de Aflatoxina B₁ y Zearalenona de concentración conocida, y se desarrolló la Cromatografía en Placa Delgada (TLC), utilizando cloroformo-acetona (90:10) como solvente de corrida. Una vez retirada la placa de la cuba, se dejó secar y se procedió a observarla bajo una lámpara de luz UV.

Identificación de los analitos

La identificación de las micotoxinas se efectuó comparando el R_f de los patrones con las muestras bajo la luz UV. La Aflatoxina B₁ aparece con fluorescencia azul vista con UV onda larga con un R_f de 0,3, la Zearalenona aparece con fluorescencia verde vista con UV onda corta, con un R_f de 0,5. Para la confirmación, se agregó ácido sulfúrico al 30% sobre los *spot* sospechosos de Aflatoxina B₁; la fluorescencia viró del azul al amarillo. Para confirmar la Zearalenona se agregó con una pipeta, a las manchas sospechosas, una solución de cloruro de aluminio en etanol, y se examinó la placa con UV onda larga; la Zearalenona apareció con fluorescencia azul [12].

Cuantificación de los niveles de micotoxinas presentes en las muestras

Se comparó la intensidad de la fluorescencia de la muestra con los patrones y se aplicó la siguiente fórmula

la (AOAC) [12]:

$$\text{concentración toxina } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{V_s \times C_s \times V_f}{V_m \times P}$$

Vs: μl de estándar igual al desconocido.

Cs: concentración de estándar en mg / ml .

Vf: volumen en μl de la disolución final del extracto.

Vm: μl del extracto cuya fluorescencia coincide con Vs.

P: gramos de la muestra original en el extracto final.

De esta forma se obtuvieron los resultados de concentración de Aflatoxina B₁ y Zearalenona expresados en partes por billón (ppb = $\mu\text{g}/\text{kg}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación de la materia prima

Los niveles de contaminación encontrados en los distintos tipos de materia prima utilizados para la elaboración de las raciones variaron, como era de esperar, según el tipo de sustrato.

En la Figura 1 se observan los resultados obtenidos para ambas micotoxinas, expresados en partes por billón (ppb). Se puede observar que la mayor concentración de Zearalenona y Aflatoxina B₁ se presentó en las muestras de maíz en grano. Dos de las muestras de MG presentaron altas concentraciones de Zearalenona, 1.200 y 1.600 ppb, y en una tercera muestra de MG se registró una concentración de Aflatoxina B₁ de 96 ppb, también considerada elevada. No se detectaron Aflatoxinas en las muestras de *pellets* de soja, afrechillo de trigo y soja desactivada. En TA y SD tampoco se determinó la presencia de Zearalenona.

Contaminación de las raciones

Las raciones elaboradas en un período de tres meses, utilizando los lotes analizados de materia prima, exhibieron los niveles de contaminación presentados en la Figura 2 (ver Tabla 2).

Debido a que las raciones para el ganado porcino se formulan utilizando un 75% de maíz, esta es la principal materia prima que debe tenerse en cuenta para la vigilancia de los niveles de micotoxinas. Se calculó el promedio para ambas micotoxinas en las muestras de maíz en grano

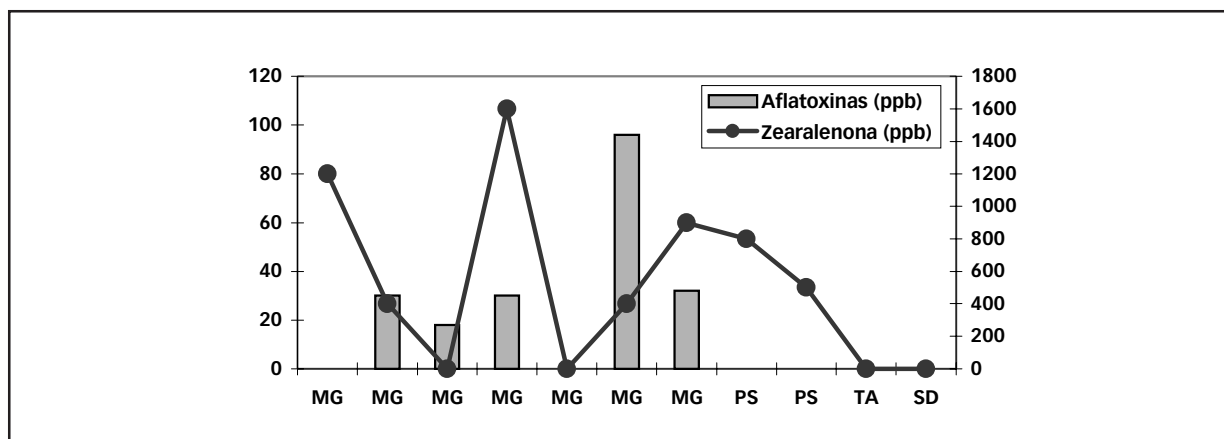


FIGURA 1: concentración de Aflatoxina B₁, (eje izquierdo) y Zearalenona (eje derecho) hallados en la materia prima.

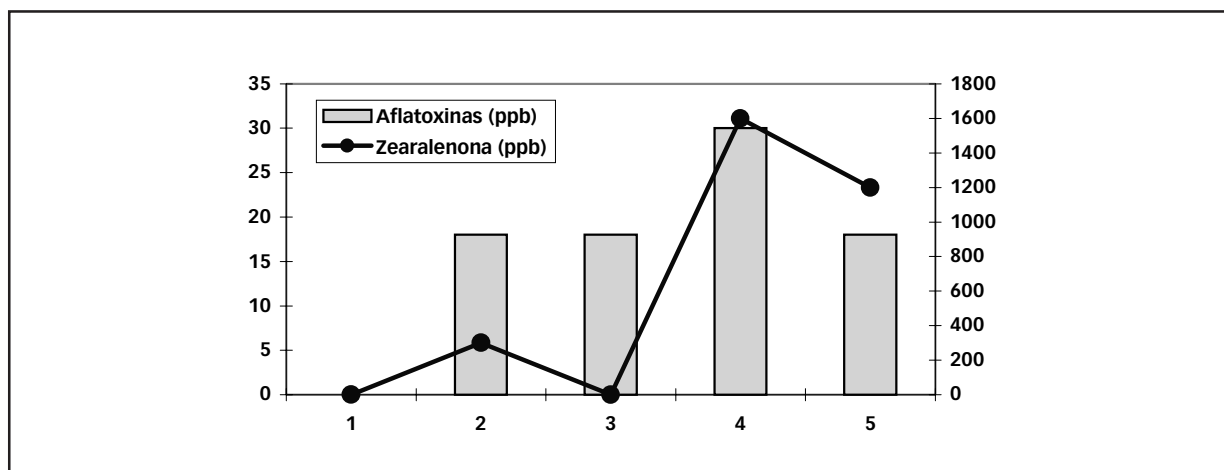


FIGURA 2: concentración Aflatoxina B₁, (eje izquierdo) y Zearalenona (eje derecho) en raciones de tipo "Iniciador".

y se obtuvo un valor de 18 ppb de Aflatoxina B₁ y 470 ppb de Zearalenona (ver Tabla 2).

Se puede observar que solamente en uno de los lotes analizados de las raciones no se detectó contaminación con las micotoxinas analizadas. Una de las muestras presentó niveles considerables de Aflatoxina B₁ (30 ppb) y Zearalenona (1.600 ppb), y otra exhibió un nivel elevado de Zearalenona solamente.

CONCLUSIONES

Los niveles de contaminación hallados en general, demostraron que la ocurrencia varía de lote a lote, tanto de materias primas como de las raciones completas; además son valores que se encuentran por debajo de los máximos permitidos excepto en unos pocos casos, si se los considera en forma individual, y si tenemos en cuenta los valores medios, para los dos casos, estos se consideran

aceptables para ambas micotoxinas, tanto en el maíz como en las raciones completas (ver Tablas 1 y 2).

No podemos, por lo expresado anteriormente, dejar de considerar la importancia de haber encontrado micotoxinas en las muestras analizadas, por lo que se sugiere lo siguiente.

-Examinar en forma periódica las variaciones de los niveles de micotoxinas que pueden hallarse en la materia prima, para proceder de tal manera de reducir al mínimo la contaminación de los alimentos elaborados.

-Controlar las raciones, para disminuir las pérdidas económicas por los efectos de las micotoxinas en la producción porcina, debido a que la contaminación con múltiples toxinas produce efectos sinérgicos, aumentando así el riesgo productivo.

-Un adecuado manejo de materia prima y raciones, para evitar un aumento en las concentraciones de micotoxinas en silos y comederos.

Tabla 2: resultados de los análisis de las muestras de materias primas y raciones iniciador

Materia Prima		
Muestra	Aflatoxina B1 (ppb)	Zearalenona (ppb)
1. MG	0	0
2. MG	30	400
3. MG	18	0
4. MG	30	<u>1600</u>
5. MG	0	0
6. MG	<u>96</u>	400
7. MG	32	900
Promedio contaminación Maíz	18	470
8. PS	0	800
9. PS	0	500
10. TA	0	0
11. SD	0	0
Raciones "Iniciador"		
Muestra	Aflatoxina B1 (ppb)	Zearalenona (ppb)
1	0	0
2	18	300
3	18	0
4	<u>30</u>	<u>1600</u>
5	18	<u>1200</u>
Promedio contaminación raciones	16,8	620

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de trabajo del “Laboratorio Central” de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones: Ing. Nicolás Kolb, Ing. Darío Ferreyra, Ing. José Luis Herrera por su valiosa colaboración y préstamo de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. **Devegowda, G.; Radu, M. V. L. N.; Nazar, A.; Swamy, H. V. L. M.** *Mycotoxin Picture Worldwide: Novel Solutions for their Counteraction* En *Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium*. Biotechnology in the Feed Industry. Passport of the Year 2000. Nottingham University Press, U.K. p: 241-255, 1998.
2. **Osweller, G. D.** *Mycotoxins En Diseases of Swine*. 7th Edition, Wolfe Publishing, London. p: 735-743, 1992.
3. **Pasteiner, S.** *Coping with Mycotoxin Contaminated Feedstuffs*. Feed Int. Mayo 1997: p. 12-16.
4. **Lawlor, P. G.; Lynch, P. B.** *Mycotoxins in Pigs Feeds 1: Source of Toxins, Prevention and Management of Mycotoxicosis*. Irish Vet. J. Ireland Vol 54 (3): p. 117-120, Marzo 2001.
5. **Santurio, J. M.** *Micotoxinas e Adsorventes em Suínos*. Trabalhos Técnicos Exclusivos Porkworld. www.porkworld.com.br.
6. **Fiorentin, L.** *As micotoxinas e a produção de suínos*. Suinocultura dinâmica. EMBRAPA-CNPSA. Año II – N° 10. Octubre 1993.
7. **Diekman, M. A.; Coffey, M. T.; Purkhiser, E. D.; Reeves, D. E.; Young, L. G.** *Mycotoxins and Swine Performance*. PIH-129, Nutrition. Purdue University. Cooperative Extension Service. West Lafayette, Indiana, USA. 1992.
8. **Vanyi, A.; Bata, A.; Glavits, R.; Kovacs, F.** *Perinatal Oestrogen Syndrome in Swine*. Acta Vet. Hungarica 42:433-416. 1994.
9. **Lawlor, P. G.; Lynch, P. B.** *Mycotoxins in Pigs Feeds 2: Clinical Aspects*. Irish Vet. J. Ireland Vol 54 (4): p. 172-176, Abril 2001.
10. **Fao Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995–A. Compendium**. Food and Nutrition Paper, No. 64, Roma, 1997.
11. **USDA.** Grain Fungal Diseases & Mycotoxins References: Sampling. GIPSA, Technical Services Division. Internet on-line. Kansas City, USA. p. 24-29. 1999.
12. **AOCS-AOAC 970.45 BF Method**. Official Methods of Analysis of the AOAC. 16th Edition. Section 49.2.09 (AOAC Method 970.45) 1991.
13. **Chulze, S.; Bertinetti, C.; Dalcero, A.; Etcheverry, M.; Farnochi, C.; Torres, A.; Rizzo, I.; Varsavsky, E.** *Incidence of Aflatoxin, Zearalenone and Deoxynivalenol on Corn in Argentina*. Mycotoxin Research, vol 5: p 9-12. 1989.