MICOTOXINAS EN CEREALES ALMACENADOS

Dubarry, J.R.; Ramirez, E.E.; Alvarez, A.R.; Errea. A.L.; Vera, O.A.; Berdini, G.M.; Musitani, J.C.

RESUMEN

Ante el hallazgo de signos clínicos, lesiones macro y microscópicas compatibles con los producidas por aflatoxinas en varios casos de muerte de animales, cuya dieta era cubierta por cereales que previamente habían sido almacenados, fue necesario investigar si en las condiciones de conservación en las silos se producían estas toxinas.-

Se obtuvieron muestras de maíz y trigo provenientes de plantas almacenadoras de cereal de la zona norte de la provincia de La Pampa y fueron analizadas por el método de cromatografía en capa delgada, para dosaje de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2. En un 10 % se detectó aflatoxina B_1, en cantidades que oscilaban entre 2 y 4 μgr por kilo de muestra.-

Se elaboró una dieta que contenía la misma concentración de afllatoxina encontrada con la que se alimentaron ratones con el objeto de medir el ritmo circadiano en las células epiteliales del duodeno, sin encontrarse variaciones significativas.-

Estos resultados llevaron a concluir que muchos casos de intoicación ocurridos pueden corresponder a condiciones de almacenamiento traslado o industrialización de los granos.

PALABRAS CLAVES: Aflatoxina; cereal almacenado; silo; ritmo circadiano.

ABSTRACT

Clinical signs, gross and histological lessions aflatoxins contaminate food compatibles in many cases of animal death, whose the principal component of theirs diets was stored cereal was found. It was the reason for investigate if that toxins was produced in the north of La Pampa silo´s storage conditions.-

It was obtained wheat´s and maize´s corn samples in the closed silos of that region and were tested for aflatoxins B_1, B_2, G_1 y G_2 by the thin layer chromatography method. In 10% of the samples, aflatoxin B_1 levels between 2 to 4 μgr/Kg of cereal were detected.-

A aflatoxin with the found conc contaminate diet was elaborated, and it was administrated to mice in standard conditions, for evaluate circadian rhytthm variation in duodenum enterocites, it was´nt found significative changes.-

Keywords: Aflatoxin; corn; stored cereal; silo; circadian rhythm; Argentine Republic.-

INTRODUCCION

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos por contacto o por ingestión, producidos por hongos del género Aspergillus y Penicillum en condiciones ambientales favorables. Este hábitat lo encuentran principalmente en los cereales y sus derivados (6), y las toxinas pueden producirse tanto en el cultivo, como en el almacenamiento o durante la industrialización.-

Los factores facilitadores principales que deben considerarse son la tempertura, humedad, proporción de oxígeno y de dióxido de carbono.-

La temperatura y humedad son inversamente proporcionales en su acción y varían de acuerdo con el hongo productor, entre 30 y 21 °C y un a_w entre 0,84 y 0,94 (a_w= relación entre presión parcial del vapor de agua del alimento y presión de vapor de agua a esa temperatura). Es por esto que se establecen niveles de humedad de seguridad en los distintos granos, para el maíz se admite una humedad máxima de 14,5%, con un a_w entre 0,65 y 0,70 (15). El pH también influye, aunque algunos hongos crecen a pH por debajo de 4.-

Los daños a los granos por la acción de pájaros, artrópodos y roedores, permiten el acceso directo de los hongos y la producción acelerada de toxinas.

La proporción de O_2 y CO_2 también influye, siendo ambos inversamente proporcionales en su acción facilitadora de crecimiento, ya que los hongos son aeróbicos.-

La génesis de toxina también depende de la variedad de Aspergillus productor y de la competencia microbiana.-

El tiempo de almacenamiento, así como la cantidad de hongos, favorecen directamente la formación de toxinas, así como también las corrientes de aire caliente dentro del silo y el acúmulo en el tiempo de cereal en los lugares de salida y transporte del mismo(11).-

Resumiendo, las condiciones básicas son: el sustrato, el hongo, la competencia microbiana y las condiciones ambientales. Es por ello que para determinar la toxicidad de un alimento enmohecido se necesita medir la concentración de toxina en el mismo (10).-

Estas sustancias actúan de distintas formas, lesionando el organismo tanto animal como humano, ya sea disminuyendo la inmunidad celular (13)(14)., produciendo desde toxicidad aguda hasta enfermedades de curso crónico incluyendo neoplasias principalmente hepáticas(2); también alteraciones en el desarrollo prenatal, muerte o distocias(9).-

En nuestro país los primeros antecedentes registrados sobre micotoxinas son los referidos a un problema surgido en 1967 a raíz de la exportación de maní a Inglaterra(16), posteriormente se llevaron a cabo estudios sobre muestreo, metodología analítica y delimitación de zonas geográficas de acuerdo con la temperatura media anual y las precipitaciones pluviales, para establecer un cuadro comparativo con otras zonas del mundo donde se conocía la incidencia de estas toxinas.-

Se realizaron estudios en varias provincias, encontrándose una gran contaminación en Córdoba y Santa Fe con Aspergillus y aflatoxibas en girasol y maíz(8).-

La toxicidad de las aflatoxinas dependen de la edad, sexo, especie, vía de administración y dosis, siendo los patitos de un día los animales más susceptibles, por ej las ratas de sexo macho son más sensibles, así como los animales de menor edad. Cuando la dosis es mínima pero se prolonga en el tiempo se producen alteraciones de coagulopatías, hipoproteinemia, inmunosupresión o bien neoplasia hepática (adenomas o adenocarcinoma).-

En varios casos de patologías bovinas que llegaron como consulta a la Cátedra de Patología General de la Fac. de Cs. Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, se encontraron lesiones que indicaban una intoxicación con aflatoxinas. En general los bovinos provenían de la zona norte de esta provincia y consumían cereales como parte de su dieta, los hallazgos histopatológicos fueron los más significativos y coincidentes y consistían en necrosis centrolobulillar y proliferación incipiente de conductillos biliares, algunos presentaron enterorragia leve, especialmente de intestino grueso. Debido a que el lugar donde con más frecuencia se producen las toxinas es durante la conservación en los silos, fue donde se comenzó la búsqueda.-

Hasta ese momento no se habían realizado estudios sobre la presencia de micotoxinas en esta provincia.-

Se muestrearon silos que contenían trigo y luego maíz, de la zona norte de la provincia de La Pampa. Esta zona se eligió debido al origen de los animales enfermos y también porque posee la caracteríastica de que allí se encuentra la mayor concentración de las plantas cerealeras, concomitante con la más alta producción agrícola, como así también las condiciones climáticas favorables en cuanto a humedad y temperatura.-

Debido al mecanismo por el cual las aflatoxinas se unen a las macromoléculas, especialmente ácidos nucleicos y nucleoproteínas, produciendo carcinogéneseis, teratogénesis, inhibición mitótica e inmunosupresión (10), fue de interés medir el ritmo circadiano en células epiteliales de duodeno de ratones para establecer si ocurrían variaciones. Para ello se los alimentó con balanceado intoxicado con las concentraciones halladas en los silos estudiados de Aflatoxina B_1 (7) (5) (17).-

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO EN SILOS:

Se recolectaron 50 muestras de plantas almacenadoras de cereales que estaban activas en el momento del muestreo, en silos cerrados, distribuídas en la zona delimitada al norte, oeste y este: los límites políticos de la Provincia de La Pampa; al sur: ruta nacional 143 hasta General Pico, ruta provincial 1 hasta el cruce con ruta provincial 4 y por esta hasta el límite político de la provincia de La Pampa.-

Estos muestreos se realizaron durante el segundo semestre de 1995 obteniéndose muestras de maíz y en el primer semestre de 1996 muestras de trigo.-

En las plantas donde el cereal es ciclado o removido periódicamente se tomaron las muestras después de la remoción.-

En los establecimientos donde no se realizaban movimientos el cereal se obtuvieron en los camiones en el momento de descarga del silo, utilizando en todos los casos calador de profundidad en 5 partes de cada lugar de extracción (submuestras), de acuerdo con las Normas COPANT (12).-

TAMAÑO DE LA MUESTRA: 10 KG por planta.-

MANEJO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO:

- Molienda con molino con malla de 14 mesh.
- Reducción de la muestra hasta 2 Kg utilizando cuarteador.
- Segunda molienda con malla de 20 mesh.
- Segunda reducción hasta tamaño de 250 gr utilizando el cuartedor.
- Embolsado y conservación en freezer hasta su análisis.

CUANTIFICACION DE MICOTOXINAS:

Se utilizó el método de la AOAC Official Method 993.17 (18) cuyo principio se basa en: extraer las aflatoxinas de las muestras con metanol-agua y diluirlas en solución de cloruro de sodio, extraer la parte oleosa con hexano, separar las micotoxinas por evaporación en rotavapor, y cuantificada por thin layer chromatography (TLC) (cromatografía en capa delgada) en placas de silicagel 60 con estimación visual.-

EVALUACION DE LA INCIDENCIA DE LAS AFLATOXINAS EN EL RITMO DE CRECIMIENTO CELULAR (CIRCADIANO):

Los ensayos fueron realizados con ratones de la cepa C3H-S, con un alto grado de consanguinidad.-

Se efectuó un diseño experimental donde se formaron tres grupos, cada uno con doce ratones de la cepa C3HS, con individuos escogidos al azar del sexo hembra y 34 días de edad. Al grupo intoxicado (GI), se le dió alimento balanceado comercial (sin niveles dosables de Aflatoxinas), al que se contaminó con Aflatoxina B_1 (4 gr / Kgr de alimento), esto se realizó humedeciendo los pellets con una solución de las toxinas en

cloroformo: acetona: agua (88:12:1,5), solvente recomendado por la AOAC, conteniendo la cantidad necesaria de toxina para lograr la concentración descripta. Luego se evaporó el solvente.-

Al grupo testigo de solvente (GTS), se lo alimentó con el mismo balanceado, pero remojado en la cantidad de solvente empleado para el GI, y también previa evaporación.-

Al grupo testigo (GT) se lo alimentó con balanceado sin ningún agregado. La ingestión de agua y alimento fué ad-libitum.-

Desde su nacimiento se los colocó en condiciones estandarizadas para el análisis de periodicidad (3) (4), en cuartos con temperatura estable (22 más menos 1°C) y sometidos a un régimen de iluminación artificial de 12 horas alternados con 12 horas de oscuridad.-

Se sacrificaron por descerebrado previa inoculación de colchicina 4 horas antes (Colcemid: 1mgr/gr de peso), 4 animales de cada grupo, los días 10, 20 y 30 de iniciada de la intoxicación. Cada día se sacrificaron dos ratones de cada grupo a las horas 08:00 12:00.(5).-

Se tomaron muestras de la región del duodeno (0,5 cm), colocándolas en formol bufferado al 10%, la tinción usada fué Hematoxilina-Eosina y se observaron por inmersión.-

Se contaron las metafases colchicínicas de 140 campos, controlando el número de núcleos en 15 campos, para calcular el índice mitótico que será expresado en metafases colchicínicas por mil núcleos.-

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados nos han servido para demostrar la presencia de aflatoxinas en las condiciones de almacenamiento, así como para formular nuevas hipótesis.-

Los niveles de contaminación en los silos de la zona norte de la provincia de La Pampa figuran en el cuadro N° 1. En un 10% de las muestras se detectó Aflatoxina B1, cuyos valores oscilaban entre 2 y 4 µgr/Kg de muestra.-

Cuadro N° 1.- SILOS CONTAMINADOS CON MICOTOXINAS

N° de muestra	Aflatoxinas (ug/kg)	Zearalenona (ug/Kg)
2	3,4	0
5	4,0	0
6	2,4	0
10	2,3	0
13	2,5	0

Las concentraciones de micotoxinas halladas no fueron de la magnitud que representara un peligro inmediato desde el punto de vista de la salud humana como animal, así como en vista a las exigencias de los organismos internacionales y países compradores. No obstante se deberá seguir investigando para comprobar los efectos subclínicos de estas concentraciones.-

Esto lleva a pensar que los casos de intoxicaciones ocurridos previamente, durante y luego del período de análisis de este trabajo, pueden corresponder a condiciones de almacenamiento, traslado e industrialización de los granos. Estudios que será necesario realizar ante la sospecha de futuras intoxicaciones.-

En el ritmo circadiano no hubo variaciones significativas con respecto a lo descripto en la bibliografía.Se empleó para su análisis el método de comparación de medias utilizando los desvíos standard de las medias. Los resultados obtenidos figuran en el cuadro N° 2.-

Cuadro N° 2.- Efecto de la intoxicación con alflatoxina B_1 en ratones hembra de 34 días de edad. (cepa C3H-S)

	X MC/1000 N +/- s (n)		
	Día 10 post in. Intox.	**Día 20** post. In. Int.	**Día 30** post in. Int.
	X +/- s (n) %V	X +/- s (n) %V	X +/- s (n) %V
GT	193,7 +/- 12,9 (4)	190,7 +/- 15.1(4)	168,6 +/- 11,4(4)
GS	189,5 +/- 11,3(4)	168,5 +/'13,4(4)	197,7 +/- 14,8(4)
GI	178,9 +/- 13,5(4)	163,3 +/- 12,5(4)	189,7 +/- 13,3(4)

X MC/1000 N: Media de las metafases colchicínicas cada 1000 núcleos
Post. In. Int.: post iniciación de la intoxicación
GT: Grupo testigo
GS: Grupo alimentado con balanceado más solvente
GI: Grupo alimentado con balanceado contaminado con 4 ug/Kg de aflatoxina B_1
Los valores arriba expuestos corresponden a la media de los recuentos efectuados en dos grupos de 2 individuos cada uno, sacrificados a las horas 08:00 y 12:00 del día enunciado.-

El análisis estadístico para comparación de medias utiliza el siguiente criterio:
Si $[X_1 - X_2]$ es $>(s_{m1} + s_{m2})$
Entonces la diferencia de las medias es significativa
Si $[X_1 - X_2]$ es $<(s_{m1} + s_{m2})$
Entonces la diferencia de las medias no es significativa

Comparamos todas las medias con respecto al GT (grupo testigo), no hallando diferencias significativas.-

Los valores obtenidos indican que en las concentraciones halladas en los silos cerrados, la aflatoxina B_1 no modifica el ritmo circadiano en los enterocitos de la región duodenal, de lo que podemos deducir que son cantidades detoxificadas suficientemente por el hígado, sin llegar a producir cambios celulares.-

BIBLIOGRAFIA

1. CHARMELEY, L.L.; TRENHOLM; PRELUSKY, D.B. "Mycotoxins, their origin, impact and impotance: insghts into common ways to control and eliminate" (1996). Feed-Compounder. 16 (1), p.14-17
2. COULOMBE, R.A.jr:"Biologic action of mycotoxins"; Journal of dairy science (USA)mar 1993, V. 76 (3), p. 880-891
3. ECHAVE LLANOS, J.M. "Importancia del ritmo circadiano en el estudio de los factores de crecimiento durante la regeneración hepática" (1963)Rev. Soc. Arg. Biol. 39. 256
4. ECHAVE LLANOS, J.M.; NASH,R. "Mitotic circadian rhythm in a fast-growing and slow-growing hepatoma: mitotic rhythm in hepatomas"(1970) J. of Nat. Cancer. 3. p.581, 585
5. ERRECALDE, A. L. "Effect of ES2 tumor extract and plasma of tumor bearing animals on the mitotic activity of enterocytes of young mice". (1993) J. Exp. Cancer Res., 12, 2

6. .HUFF, W.E.; RUFF, M.D.; CHUTE, M.B.; "Characterization of the toxicity of the mycotoxins aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin in game birds". (1992). II Ringneck pheasiant. Avian diseases.36 (1) 30-33
7. INDA, A.M.; GARCIA, A.L., ERRECALDE, A. L. "G2 Population Cells in Mouse Duodenum". (1996). J. Exp. Cancer Res., 15, 1
8. INTA EERAP Carpeta de producción vegetal: Maíz Información N° 48.
9. IRVIN, T.R., IYER, P., GOLLAHON, L.S, STEVENS, E.K., MARTIN, J.E "Prenatal toxicity of Aflatoxins: Application of mammalian cell culture sistems to characterize developmental toxicity of Aflatoxins"; Pennington Center Nutrition Series (USA); 1991, V.1, p.167-182
10. JUBB Y KENNEDY. "PATHOLOGY OF DOMESTIC ANIMALS" CUARTA ED. (1995) p. 389-390.-
11. LE BARS, J. "Contribution to a practical strategy for preventing aflatoxin contamination of dried figs" (1990).Microbiologie, Aliments, Nutrition. Vol 8, 265-270.
12. NORMAS PANAMERICANAS (COPANT). 1978. 989/78.
13. SHARNA, R.P "Immunotoxicity of mycotoxins"; Journal of dairy science, (USA); mar 1993; V. 76 (3), p.892-897
14. VENTURINI, M.C.; PERFUMO, C.J.; RISSO, M.A.; GOMEZ, C.M; PISCOPO, M. V.; SALA DE MIGUEL, M., AND GODOY, H. "Effect of Aflatoxin B_1 on ressitance induced by *Bordetella bronchiséptica* vaccine in rabbits"; Veterinary Microbiology, (1990), 25, p. 209, 216, Elseiver Science Publishers B.V, Amsterdam
15. VIQUEZ, O.M.; CASTELL-PEREZ, M.E.; SHELBY, R.A., BROWN, G. "Aflatoxin contamination in corn samples due environmental conditions, aflatoxins-producing strains, and nutrients grain grown in Costa Rica. (1994). J. Agric. Food Chem, 42, 2551-2555
16. RESNIK, S. "Situacion del problema de las micotoxinas en la República Argentina" (1988) Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre Micotoxinas. Buenos Aires
17. RICHARD, J.L.; PIER, A.C.; STUBBLEFIELD, R.D., SHOTWELL, O. L.; LYON, R.L; CUTLIP, R.C."Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic and pathologyc changes, and tissue residues in steers" (1983). Am. J. Of Veterinary Research, Vol 44, N° 7, p. 1294-1299.
18. STOLOFF AND COL. " Aflatoxins (TLC). (1984). Journal of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC).-