

Trabajo Original

Toxicología analítica

## **Identificación de Aflatoxinas en alimentos de uso animal y vísceras de siete venados muertos súbitamente.**

---

**María Di Bernardo; Néstor Uzcateguí; Lenny Pérez; Maria Y Garcia; Carlos Hernández; Carlos Yáñez; Cesar Rengifo; Alexis Morales; Luis Rojas; Alfredo Usubillaga; Lester Rodríguez; Nurby Ríos.**

GITAEF. Grupo de Investigación en Toxicología Analítica y Estudios Farmacológicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. e-mail [girard@ula.ve](mailto:girard@ula.ve), Teléf. 58-274-2403489

Correspondencia de autor: Dra. María Luisa Di Bernardo Navas, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Departamento de Farmacología y Toxicología, Universidad de Los Andes- Mérida-Venezuela. Apartado postal 5101. Correo electrónico [girard@ula.ve](mailto:girard@ula.ve)

## Resumen

En el presente estudio se analizaron por cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas, muestras de vísceras (hígado y riñón) procedentes de 7 venados que fallecieron súbitamente, sin patología clínica aparente. También en 3 muestras de alimentos comerciales de uso veterinario. Los resultados de la autopsia hicieron sospechar la presencia de una micotoxina, tipo aflatoxina, las cuales constituyen sin lugar a dudas causa de muerte por su marcado efecto hepatotóxico con consiguiente hemorragia y edema.

Los resultados analíticos obtenidos tanto por CCF y HPLC evidenciaron la presencia de aflatoxina B1 tanto en los alimentos concentrados como en el hígado. En riñón no se encontró, explicando su ausencia por ser el mismo órgano no diana de la micotoxina.

En los alimentos concentrados se encontraron niveles entre 15-20 ppm, en el hígado 10-15 ppm. Por reportes de la literatura concentraciones de 10 ppm son letales a este tipo de mamíferos rumiantes.

La ocasión es propicia para alertar a la comunidad y a la industria agropecuaria sobre la necesidad imperiosa de mantener los insumos sensibles a la aflatoxina en óptimas condiciones de temperatura y humedad hasta que sea ingerido por la población para evitar enfermedades y patologías prevenibles.

**Palabras claves:** aflatoxinas, venados, alimentos animales, CCF, HPLC.

## Abstracts

### ***Identification of use food Aflatoxins animal and viscera of seven dead deer suddenly***

In the present study fine layer chromatography of and liquid chromatography high resolution –MS, samples of viscera's (liver and kidney) coming from 7 deer were analyzed by that they passed away suddenly, without apparent clinical pathology. Commercial food samples 3 of veterinary use.

The results of the autopsy made suspect the presence a mycotoxin, type aflatoxin which without doubt constitutes cause of death by their noticeable hepatotoxic effect with consequent hemorrhage and edema.

The analytical results obtained as much by TLC and HPLC -MS demonstrated the presence of B1 aflatoxin as much in foods concentrates as in the liver. In kidney one was not, explaining his absence for being the same organ nonmorning call of mycotoxin. In foods concentrates were levels between 15-20 ppm, in liver 10-15 ppm. By reports of literature 10 concentrations of ppm is lethal to this type of ruminant mammals. The occasion is propitious to alert to the community and the farming industry on the urgent necessity to maintain he sensible consumptions to the high frequency in optimal conditions of temperature and humidity until it is ingested by the population to avoid prevenibles diseases and pathologies.

**Key words: animal aflatoxins, deer, animal foods, TLC, HPLC.**

## **Introducción**

Las enfermedades de origen nutricional pueden tener diferentes causas, entre ellas, el uso de dietas inadecuadamente balanceadas, mala calidad de los ingredientes y la presencia de micotoxinas, las que se originan por contaminación y mal manejo del alimento y/o sus ingredientes. Las micotoxinas, particularmente aflatoxinas (AF), son metabolitos tóxicos producidos por el hongo *Aspergillus* sp. Por sus características propias de zona tropical, Venezuela presenta condiciones ambientales favorables para la proliferación de hongos y la síntesis de micotoxinas (1). Los hongos del género *Aspergillus*, productores de AF, son contaminantes de productos agropecuarios almacenados y utilizados para el consumo humano y de animales. (La AF ha sido aislada de diversos productos para el consumo humano, entre ellos frutos secos, semillas, granos y sus aceites, derivados y harinas, productos y derivados de animales y en otros vegetales como cebolla, melón y plátano.(2)

El primer caso reportado fue en el año 1960, en Escocia por muerte repentina de 100 mil pavos alimentados con maní infectado con AF. En Venezuela en el año 2005, se reporto un caso en alimentos de la división PURINA®, de NESTLÉ VENEZUELA, S.A., para los productos DOG CHOW® y CAT CHOW®, ocasionando la muerte de cientos de mascotas caninas.

Las AF son compuestos altamente ionizables y por ello muy reactivos, pudiendo modificar DNA, RNA y proteínas celulares; experimentalmente se ha demostrado que entrañan un elevado potencial hepatotóxico, mutagénico y cancerígeno.

La AFB1, es absorbida vía tracto gastrointestinal dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde sé metaboliza. Una porción de AF es activada y fijada en los tejidos hepáticos.

Algunos metabolitos conjugados de la AFB1 solubles en agua, son excretados dentro de la bilis y van a las heces. Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB1 y metabolitos no conjugados de ésta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen sistémicamente. Eventualmente esos residuos mencionados van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. Son moléculas muy termorresistentes y no se destruyen con los tratamientos clásicos de esterilización de alimentos. (3,4)

## **Reporte del caso**

A finales del año 2008 se nos fue notificado de extrañas muertes de etiología desconocida en venados, principalmente con marcado daño hepático y fuertes hemorragias. Este tipo de fauna se encuentra en el parque zoológico Gustavo Rivera-MARAVEN (Punto Fijo-Venezuela). Es un pequeño zoológico orientado hacia la fauna venezolana, con un departamento educacional muy bien preparado. Posee una organización ejemplar, cumpliendo además con todas las exigencias de un zoológico moderno. Con estos datos se inicio un proceso de investigación en nuestro laboratorio de Toxicología Forense (GITAEF) paralelamente con el Instituto de Investigaciones Químicas

(IIQ) de nuestra Facultad. Se iniciaron ensayos analíticos para identificar y confirmar la presencia de aflatoxinas. En el presente caso aplicamos metodologías desarrolladas en nuestro centro de investigaciones para realizar análisis en muestras postmortem de hígado, riñón y alimentos concentrados.

Se realizó la determinación por cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de gases (CG), para la primera se utilizaron placas de aluminio precubiertas, Merck. #. 5721. D.D. de 20 x. 20 cms, activadas durante. 60 min a 100°C. y para HPLC se empleó un equipo marca Waters Delta Prep 4000, equipado con bomba Waters Prep LC™, detector Waters 480 Tunable Absorbance Detector, Software Millennium y Columna  $\mu$  bondapack™ C<sub>18</sub> 3,9 x 300 nm. Los resultados obtenidos se validaron con estándares certificados.

## Metodología

El método cromatográfico desarrollado (IIQ y GITAEF), se aplicó a las muestras de hígado rotuladas M1 al M3 y alimentos identificados puriengorde saco 1, puriengorde saco 2, Carbarina saco 2. Utilizando los siguientes parámetros analíticos para la identificación de Aflatoxinas por HPLC: Columna C<sub>18</sub>  $\mu$  bondapack™ C<sub>18</sub> 3,9 x 300 nm, fase Móvil: Metanol -Agua 50:50v/v, Longitud de Onda: 360 nm, Flujo: 1,5 mL /min. Las muestras y el patrón luego de ser mineralizadas se extrajeron en metanol y se sonicaron por 15 minutos.

## Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos confirman los hallazgos anatomopatológicos.

Niveles de AF B1 en vísceras de 13,16  $\pm$ 1,54 ppm y en los sacos de alimentos de 17  $\pm$ 2,94 ppm, fueron encontrados. Investigadores reportan que niveles superior a 5 ppm, resultan fatales a este tipo de mamíferos rumiantes (2,4-10).

Otros investigadores, sin embargo, reportan niveles superiores entre 10-20 con simple daño hepático, con marcada hepatitis sin representar fatalidad. Respondiendo estos mamíferos a tratamientos terapéuticos (10-13).

Nuestras experiencias con este tipo de micotoxinas han resultado irreversibles, con muertes entre las 24-72 horas de presentarse las primeras manifestaciones clínicas (dificultad respiratoria, alteración en la digestión, en la absorción y/o en el metabolismo de los nutrientes, caminar incoordinado, tambaleante, presencia de hematuria, transaminasas elevadas y posterior postramiento trasero).

Como puede observarse en los cromatogramas (Fig. II, III y IV) correspondientes al estándar, hígado y alimento respectivamente, de acuerdo al tiempo de retención del estándar (3,12 seg.) al ser comparados con todas las muestras (3,12 seg.) evidenciaron la presencia de AF. Cabe señalar que en los primeros ensayos observamos saturación en las muestras de alimentos pero luego de purificar y repurificar obtuvimos una señal cromatográfica mas clara. Estos mismos resultados se obtuvieron por CCF, observándose a LUV onda larga la fluorescencia azul característica, con Rf de 0,50.

Los resultados analíticos obtenidos nos hacen presumir, que la contaminación vino directamente del alimento por mal almacenamiento. En la Figura I se muestran gráficamente los resultados obtenidos.

## **Conclusiones**

Las muestras analizadas por CCF se corroboraron por HPLC. La concentración promedio de AF en vísceras fue de  $12,8 \pm 1,24$  ppm y en los sacos de alimentos de  $14 \pm 2,94$  ppm. La necrosis marcada del hígado coincide que la concentración de la AF superaba lo permitido por la FDA ( $5\mu\text{gKg}^{-1}$ ), además de la muerte tan violenta en animales que superaban los 150 kg de peso (3). Sin lugar a dudas nuestro grupo de Farmacéuticos expertos en Toxicología Forense reportan a la AF como la causa cierta de muerte.

La ocasión es propicia para alertar a la comunidad y a la industria agropecuaria sobre la necesidad imperiosa de mantener los insumos sensibles a la AF en óptimas condiciones de temperatura y humedad hasta que sea ingerido por la población para evitar enfermedades y patologías prevenibles.

Figura I. resultados analíticos por HPLC de niveles de AF en vísceras y alimentos concentrados.

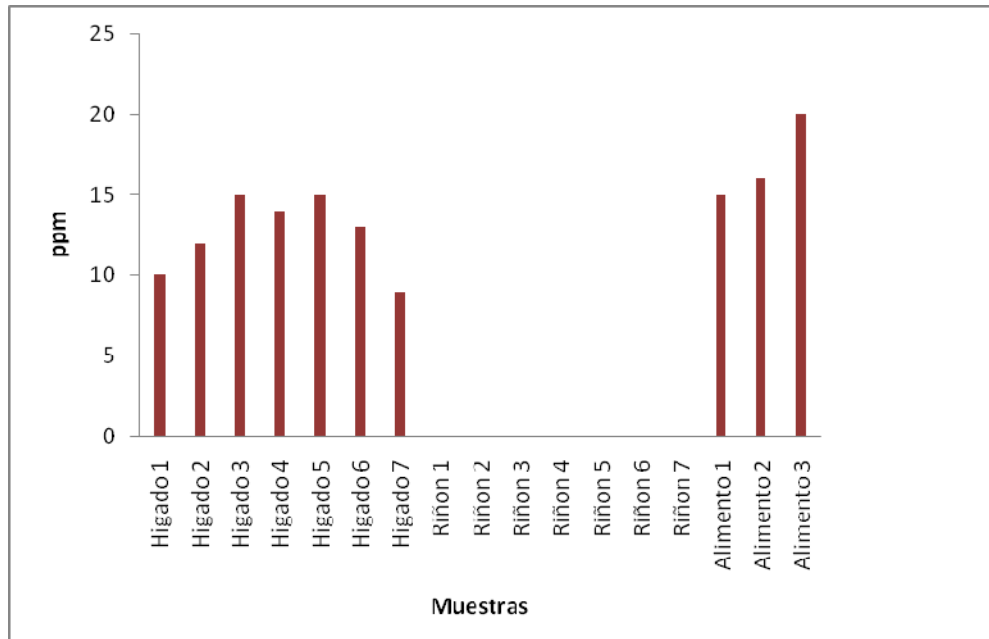


Fig. II. Cromatograma de estándar (patrón) de aflatoxina

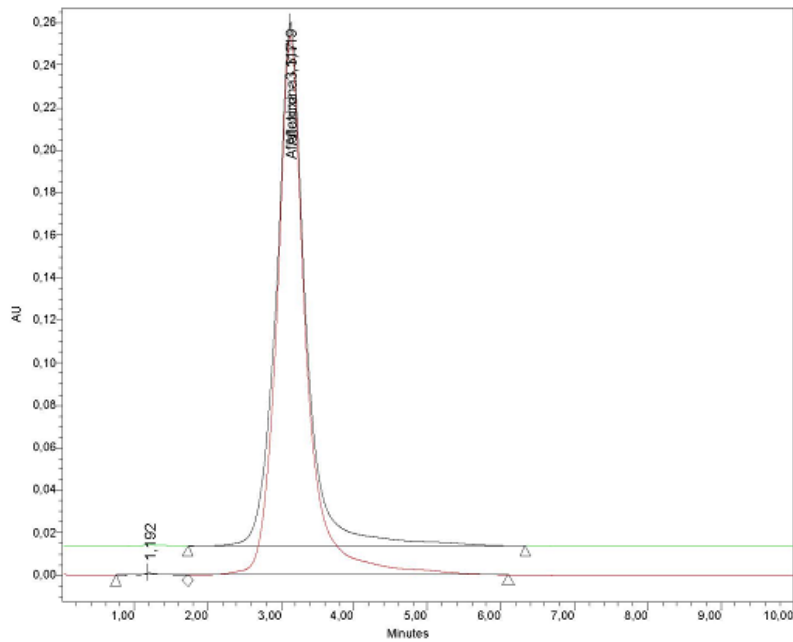




Fig. III. Cromatograma de muestras de hígado

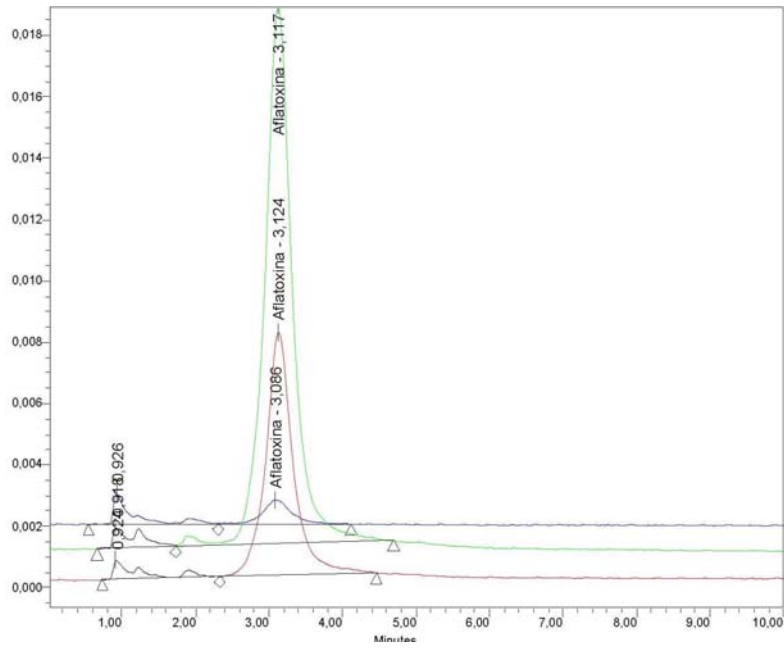
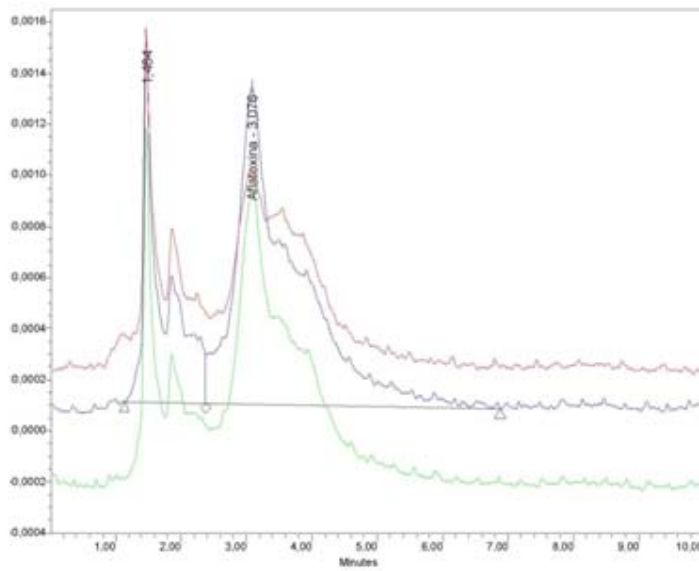


Fig. IV. Cromatograma de muestras de alimentos



## Referencias

1. Mazzani C, Borges O, Luzón O, Barrientos V, Quijada P Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 1999, 12: 9-13.
2. D Arrieta, P Arevalo, L Maria, C Gómez, G Molero. Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B1. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2006 16 (1), 39 – 47.
3. Kuiper T. Micotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicol Lett* 1995;83: 853-59.
4. Ayres J, mundt J, Sandine W. *Microbiology of foods.* San Francisco: Freeman, 1980: 708.
5. Blount W. Turkey X disease. *J Br Turkey Fed* 1991;9: 52-77.
6. Carnaghan R, Sargeant K. The toxicity of certain groundnut meal to poultry. *Veterinary Record* 1961; 73: 726-27.
7. Sargeant K, Sheridan A, Okelly J, Carnaghan R. Toxicology associated with certain samples of groundnut. *Nature* 1961;192: 1096- 97.
8. Smith J, Hacking A. *Fungal toxicity. The filamentous fungi.* London: Arnold EV, 1983: 238-64.
9. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001;167: 101- 34.
10. Bastardo, Hilda, Sofia, Sara, Nava. Efecto de la concentración de Aflatoxina B1 y tiempo de exposición sobre la condición hepática de la trucha Arcoiris. *INCI*, jun. 2006, 31(6) 437-440.
11. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Aflatoxinas humanas en países en desarrollo: revisión de toxicología, exposición, consecuencias potenciales a la salud, e intervenciones. *Am J Clin Nutr* 2004;80: 1106-22.
12. Serck-Hanssen, A. Aflatoxin-induced fatal hepatitis? A case report from Uganda. *Archives of Environmental Health* 1990, 20:729-731.
13. De Oliveira, PML Germano. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular *Public Health.* 1997.14. 30-39.

**Recibido: 03/07/09**

**Aceptado: 11/07/09**