



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA



**AFLATOXINA B1 EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA PERROS
QUE SE EXPENDEN EN LA CIUDAD DE MÉRIDA**

www.bdigital.ula.ve

Autoras:

María del R Chacón C.

Yenifer Valero

Tutor: Prof. Carlos Yanez

Mérida, septiembre 2018



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**AFLATOXINA B1 EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA PERROS
QUE SE EXPENDEN EN LA CIUDAD DE MÉRIDA**

Presentado por:

www.bdigital.ula.ve
María Chacón y Yenifer Valero

Para optar al título de:

LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

Tutor:

Prof. Carlos Yáñez

Mérida, septiembre 2018

DEDICATORIA

A Dios primeramente porque sin su bendición este sueño no hubiera podido realizarse; que a pesar de las dificultades que se hayan presentado en el camino, siempre estuvo a mi lado, en forma inquebrantable a través de manos amigas y el amor fraternal de las personas que me rodean.

A la memoria de mi padre: José Acacio Chacón Márquez (2017) por su amor y apoyo incondicional y sus sabios ejemplo, quien sacrifico todo por hacer realidad este sueño. Mi amor perdura a pesar de la distancia.

A mi hermosa princesa mi hija Haydee Dairismar González Chacón, el pilar y motor de mi vida, la razón de mi ser.

www.bdigital.ula.ve

María Chacón

En primer lugar dedico este trabajo de investigación a Dios padre todo poderoso, Jesús de nazareno por haberme dado la vida y haberme permitido ingresar en esta carrera q era mi anhelo y mi sueño poder formarme en esta ilustre universidad de los Andes, por guiarme cada día, darme fortaleza con su infinito amor, sabiduría, paciencia en especial en los momentos más difíciles.

A mis padres: Sixto Valero Fernández y Yasmira Paredes por demostrarme siempre su apoyo y amor incondicional, por ser un ejemplo de lucha, de amor, de superación, de fortaleza , de grandes valores de constancia, perseverancia y muchas cosa maravillosas, los amo infinitamente. Mi triunfo es de ustedes.

A la memoria de mi abuela María que sé que donde esta se sentiría feliz y contenta porque siempre desde el cielo me ayudo, me acompaña en cada momento, en cada parcial que presente y tantos obstáculo y momentos difíciles que tuve que atravesar en mi carrera. Estoy segura q en dónde estés me estarás viendo con ojos de alegría inmensa.

A mi abuelita Delia Aurora por siempre decirme que siguiera luchando, por darme palabras de aliento, ánimos, en momentos de flaqueza. Te quiero mucho.

Yenifer Valero

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a Dios por que sin él, nada soy. A mi madre Iris Alejandra Criollo de Chacón quien es mi apoyo constantes, mi confidente simplemente mi mejor amiga.

A David José González Pérez, mi esposo, el amor de mi vida, compañero de mis metas y sueños, la paz en medio de mis tormentas, por depositar su confianza en mí, sus consejos, valores y motivación constante gracias por estar siempre a mi lado y construir juntos esta historia.

A nuestro tutor Carlos Yanes por su valiosa orientación y apoyo para la conclusión de la misma.

De igual forma agradecerle al técnico de laboratorio de toxicología Néstor Uscategui por sus conocimientos y asesoría se logró la culminación de este trabajo de investigación.

Al Profesor Pedro Matheus que contribuyo significativamente en el desarrollo del trabajo, por su valiosa colaboración apoyo y ayuda constante.

A ti mi compañera de tesis Yenifer Valero gracias por estar en las buenas y en las malas conmigo por tenerme mucha paciencia y apoyarme en la culminación de nuestro trabajo de investigación y todas aquellas personas, amigos, compañeros, que en forma directa e indirecta colaboraron amablemente en la elaboración de ésta tesis.

María Chacón

Agradezco a ti señor padre bendito, Jesús de nazareno por acompañarme por ser mi fortaleza, mi guía, mi padre amado , por darme aliento, amor, por escucharme en cada momento que te pedía que me ayudaras, que no me abandonaras por darme salud, bienestar físico espiritual y por permitirme culminar con éxito esta meta. Hacer puesto en mi camino personas maravillosas, generosas que han sido mi apoyo, mi compañía y han significado mucho en mi vida durante el trascurso de la carrera.

A la ilustre universidad de los andes, al laboratorio de toxicología analítica Dr. Pablo Paredes Vivas de la facultad de farmacia y Bioanálisis, al instituto de investigación de la facultad de farmacia y Bioanálisis por darnos la oportunidad de pertenecer a los estudiantes de pertenecer a los estudiantes que aspiran al título de Licenciados en Bioanalisis.

A nuestro tutor Carlos Yáñez por brindarnos su valioso tiempo, conocimiento, por guiarnos, apoyarnos durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al señor Néstor Uscategui técnico de laboratorio por atendernos, darnos las pautas a seguir en el desarrollo de la parte experimental.

A nuestros profesores Julio Rojas, custodio, al profesor Lidio ser humano grandioso, especial noble que siempre me tomo en cuenta, me explico y me brindó su apoyo incondicionalmente hoy también licenciado en Bioanalisis.
Te quiero y aprecio Lidio

Yenifer Valero

RESUMEN

Las Aflatoxinas son metabolitos secundarios, producidos principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, los cuales inducen a una gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos expuestos con alimentos contaminados. La más potente y carcinógena que se conoce es la B1 por sus efectos toxicológicos agudos en animales y seres humanos, crecen en productos alimenticios, y que por su consumo pueden afectar el metabolismo de casi todos los seres vivos incluyendo a los perros, elevados contenido de toxinas en el alimento puede producir la muerte de los animales. La presencia de la aflatoxina ha sido detectada a nivel biológicamente significativa en una gran variedad de productos agrícolas como los granos principalmente el maíz que es el producto de mayor preocupación a nivel mundial. Se evaluó la presencia de aflatoxina B1 en muestras de alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida, se aplicaron técnicas de Cromatografía de Capa Fina en el laboratorio de Toxicología Analítica Dr. Pablo Paredes Vivas en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes y Cromatografía de Gases, esta se basa en cuantificar y confirmar debido a su gran sensibilidad, polivalencia y rapidez al realizar un análisis; en el Instituto de Investigación de dicha facultad ambas muestras resultaron negativas y se determinó que todas las muestras se encontraban en buen estado para su consumo, libre de contaminantes de aflatoxina B1. Las micotoxinas pueden causar efectos adversos en la salud humana, por lo que se recomienda controlar la presencia de niveles de aflatoxinas en los alimentos de consumo humano y animal, mediante la utilización de métodos preventivos (aplicación

de buenas prácticas agrícolas, control biológico) que eviten el crecimiento de hongos toxicogénicos o a través de sistemas de descontaminación y detoxificación en el alimento.

Palabra clave: aflatoxina, alimentos para perros, canes, cromatografía fina y cromatografía de gases.

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
VEREDICTO	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN	VI
INDICE DE CONTENIDO	VIII
INDICE DE FIGURAS	XIII
INDICE DE TABLAS	XIV
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	5
Problema	9
ANTECEDENTES DE HIPOTESIS	10
Investigaciones Previas	10
BASES TEÓRICAS	12
Etiología	12
Aflatoxina	13

VIII

Tipos de Aflatoxina y sus metabolitos	14
Características generales	15
Características químicas	15
Propiedades generales de aflatoxinas	15
Crecimiento de Aspergillus	16
Condiciones ambientales que favorecen la proliferacion de aflatoxinas	16
Aflatoxinas en alimentos	17
Efectos de la aflatoxinas	18
Patología	18
Signos clínicos	20
Prevención y control	21
Tratamiento	23
Toxicocinetica	23
Toxicodinamica	24
Cromatografía	25
Tipos de cromatografía	26
Cromatografía de capa fina	27
Adsorbente y eluyente de cromatografía de capa fina	28

Determinación Rf	29
Revelado de las placas	31
Cromatografía de gases	31
Características que debe tener el gas portador de cromatografía de gases	32
ANTECEDENTES HISTORICOS	34
HIPÓTESIS	36
Hipótesis alternativa	37
Hipótesis nula	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	38
JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	39
MATERIALES Y METODOS	41
Variables de estudio	41
Definición de las variables	41
Aflatoxina B1	41
Alimentos concentrados para perros	42
Operacionalizaciòn de las variables	42
METODOLOGIA	44

TIPO DE INVESTIGACION	44
POBLACION Y MUESTRA	45
Población	45
Muestra	46
Descripción de la muestra	47
Procedimiento de análisis	48
Métodos de análisis de aflatoxina	49
Método de cromatografía de capa fina	50
Método de cromatografía de gases	50
Equipos y materiales a utilizar	51
Reactivos	52
Preparación de reactivos	53
Preparación de la muestra	53
Preparación y acondicionamiento de la columna	54
Acondicionar las columnas	55
Extraer la aflatoxina	55
Retomar con 0.5 ml de Colroformo (CHCL3) y sembrar en la placa Cromatografica T - 254	55
Método de cromatografía de gases	56

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	58
Determinar la presencia de aflatoxina B1 con el método de CCF	59
Confirmar por el método de cromatografía de gases la presencia de aflatoxina B1 en alimentos concentrados para perros.	62
Establecer los niveles de aflatoxina B1 en alimentos concentrados para perros	65
Comparar las diferencias entre los resultados obtenidos por los métodos usados	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
Conclusión	69
Recomendaciones	70
BIBLIOHEMEROGRAFIA	xv

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de aflatoxina B1	13
Figura 2. Maíz y trigo contaminado con aflatoxina B1	17
Figura 3. Muestra de alimento y su filtrado	54

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies de hongos productores de aflatoxina	12
Tabla 2. Operacionalización de las variables	43
Tabla 3. Descripción de la muestra	48
Tabla 4. Resultado de cromatografía de capa fina a la cual fueron sometidas las muestras	60
Tabla 5. Resultado de la cromatografía de gas a la cual fueron sometidas las muestras	63
Tabla 6. Comparación de las técnicas de cromatografía de capa fina y cromatografía de gases empleadas en	

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos **eucariotas**. Muchos de ellos pueden semejarse a las plantas, sin embargo, no fabrican su propio alimento a partir de la energía solar como lo hacen las plantas por carecer de clorofila. Los hongos pueden vivir a expensas de tejidos vivos de un organismo, absorbiendo azúcares y aminoácidos simples de las células vivas del hospedante (biótrofos), ocasionan enfermedades; o bien le causan la muerte por acción de toxinas o la destrucción de tejidos por enzimas y luego utilizan la materia orgánica (necrótrofos) (1).

Se caracterizan por un crecimiento rápido y pueden infectar al hombre, se han descrito aproximadamente 900 especies, siendo 12 las que se relacionan con enfermedades humanas. *Aspergillus fumigatus* es la especie que produce el mayor porcentaje de enfermedades pulmonares, alérgicas e invasivas (85%), *Aspergillus flavus* con un 5 -10%, *Aspergillus níger* y *Aspergillus terreus* con un 2-3%, quienes se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, en la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de material orgánico, son patógenos oportunistas que afectan a pacientes inmunocomprometidos (2).

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, inadecuado 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 (3).

Los hongos del género *Aspergillus*, productores de AF, son contaminantes de productos agropecuarios almacenados y utilizados para el consumo humano y de animales, según la FAO (organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación) se estima que el 25% de los cultivos agrícolas a nivel mundial son contaminados por micotoxinas liberadas por los hongos. 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 también se pueden hallar en el maíz, cacao, trigo, avena, algodón y otros cereales. El problema de las aflatoxinas se puede presentar en cualquier parte del mundo ya que *Aspergillus flavus* crece a temperaturas de 25º C y una humedad relativa del 70% (4).

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. Se conocen cuatro tipos principales de AF: B1, B2 G1 y G2. La AFB1, es carcinógeno natural y la más potente que se conoce, es absorbida vía tracto gastrointestinal dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde se 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 termo resistente y no se destruyen con los tratamientos clásicos de esterilización de alimentos (5).

Desde tiempos muy remotos, el perro (*canis do mesticus*) ha sido considerado el mejor guardián y amigo del hombre, por tanto se ha dado mayor importancia a su cuidado en sanidad, manejo y alimentación, esta última muy fundamental como en cualquier otra especie animal. En la actualidad la crianza de perros en forma doméstica se ha intensificado tanto en criaderos comerciales como en los hogares adoptándolos como mascotas predilectas. Los perros por naturaleza carnívoros, han ido adaptándose al cambio alimenticio que el hombre le ha impuesto. En la actualidad se dispone de alimento balanceado de diferentes marcas (6).

Estos alimentos son elaborados a base de harina de maíz, se conoce que el maíz como todos los cereales es muy susceptible a la contaminación de hongos y por consiguiente de Aflatoxinas. El perro como cualquier especie doméstica es susceptible a padecer de una intoxicación por Aflatoxinas que podría estar presente en el alimento que consumen, poniendo en grave riesgo la salud de los mismos. Numerosas especies de hongos son reconocidos como productores de una o más micotoxinas y un gran número de estos metabolitos tóxicos ya fueron identificados y caracterizados como sustancias producidas en contaminaciones naturales de granos y otros alimentos. Por esto, conocer las micotoxinas y sus efectos es sumamente indispensable para los médicos veterinarios y todos los profesionales involucrados en la salud humana y animal (7).

ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Los hongos del género *Aspergillus* son organismos eucariotas, productores de AF, esto se consideran los principales contaminantes de productos agropecuarios almacenados y utilizados para el consumo humano y de animales. Los hongos en la etapa de desarrollo utilizan nutrientes contenidos en los granos, principalmente aquellos contenidos en el germen y por lo tanto cuanto más tiempo tardan las condiciones que propician el desarrollo fúngico, mayor es la pérdida de nutrientes de los granos. El germen es caracterizado por poseer alto tenor de grasa, por lo tanto, reducirán en los valores energéticos de granos contaminados (8).

Los granos de cereales constituyen un medio nutritivo adecuado para el crecimiento de diferentes especies de hongos, especialmente cuando su humedad se encuentra por encima del 14% y la cantidad de oxígeno es suficiente. La temperatura es también un factor importante habiéndose comprobado crecimiento de hongos a temperatura desde 4 – 40º C siendo estos los límites para el desarrollo de los diferentes géneros y especies de hongo (9).

El daño causado a los granos durante la cosecha o por la acción de insectos durante el almacenaje propicia la implantación y el desarrollo de los hongos especialmente cuando las condiciones ambientales no son adecuadas. Una vez el crecimiento de los hongos ha comenzado, estos producen su propia agua metabólica. Por consiguiente, aun cuando los cereales, son almacenados en ambientes de baja humedad (menos del 14%) los hongos crecerán apoyados por el crecimiento inicial (9).

Las micotoxinas son productos resultantes del metabolismo secundario de los hongos (desechos), pueden desencadenar cuadros graves de toxicidad cuando las condiciones medioambientales son favorables para su producción por lo que es muy importante su prevención, estas 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 (3).

Las aflatoxinas son sustancias altamente tóxicas, resultantes del metabolismo de algunas cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y de las especies relacionadas, *A. nomius* y *A. Niger*. Existen cuatro aflatoxinas importantes: B1, B2, G1, G2 y los productos metabólicos adicionales, M1 y M2. Las aflatoxinas M1 y M2 fueron aisladas de la leche de animales alimentados con piensos contaminados; la designación con la letra M, proviene de milk. Mientras que la designación de B, de las aflatoxinas B1 y B2 proviene de la fluorescencia azul (Blue) bajo exposición a la luz-UV, mientras que la designación de G, se refiere a la fluorescencia de color verde amarillo (green) de las estructuras relevantes bajo luz - UV. Estas toxinas tienen estructuras similares y forman un grupo único de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados, naturales (10).

Las aflatoxinas se han asociado a varias enfermedades, tales como aflatoxicosis, en ganado, animales domésticos y seres humanos. Las aflatoxinas han recibido más atención que cualquier otra micotoxicosis debido a su potente efecto carcinógeno demostrado en animales de laboratorio susceptibles y sus efectos toxicológicos agudos en seres humanos. Las aflatoxinas a menudo afectan a los cultivos en el campo antes

de la cosecha. La contaminación postcosecha puede ocurrir si la humedad del producto durante el almacenaje en bodega excede los valores críticos que permiten el crecimiento del moho *Aspergillus*. Las infestaciones de insectos o de roedores facilitan la invasión de hongos de algunas materias almacenadas (11).

El maíz es probablemente el producto de mayor preocupación mundial, debido a que crece en climas favorables al desarrollo de los hongos. Sin embargo, algunos procedimientos usados en la elaboración de subproductos del maíz, (tortillas) como la oxidación o alcalinización, son capaces de reducir la contaminación del producto final. Los piensos a base de maíz y semilla de algodón usados en raciones destinadas a vacas lecheras, han dado lugar a leche y productos lácteos contaminados con M1 (7).

La toxicidad de micotoxicosis-aflatoxina es el término médico utilizado para la enfermedad producida por la toxina fúngica que afecta a animales que son alimentados con productos en los que se usa el maíz como principal rubro, siendo los perros la especie más susceptible ya que los alimentos concentrados empleados para su sustento están preparados a base de maíz, es por ello que se ha determinado que el hígado de estos animales es el órgano blanco de la aflatoxina. La afección también puede desarrollarse si los granos contaminados (como los granos que son almacenados de manera inadecuada y por lo tanto expuesto a la humedad) se utilizan en la producción de alimentos. Se sabe que los brotes de vez en cuando se han producido debido a que los cereales contaminados son utilizados en la producción de alimentos comerciales para perros (6)(7).

El grado de importancia que puede llegar a tener la presencia de metabolitos fúngicos en los alimentos, está relacionado con su toxicidad, con la naturaleza e incidencia económica de los productos contaminados, su proporción en la dieta del hombre y de los animales, el tipo de efecto tóxico producido y la posibilidad de que este sea acumulativo con graves efectos a largo plazo, como la oncogénesis o mutagénesis (12).

Debe tenerse en cuenta que usualmente cuando los alimentos se deterioran, no son consumidos por el hombre o al menos se descartan las partes afectadas, que muchas veces son destinadas al consumo animal. Esto explica que la incidencia de las micotoxicosis agudas es fundamentalmente un problema de sanidad animal, en tanto que para el ser humano la de mayor importancia es la toxicidad crónica, asociada con el consumo de pequeñas cantidades de toxinas durante períodos prolongados. En general las micotoxicosis agudas son más fácilmente detectables, por la intensidad y especificidad de los síntomas y también por la posibilidad de identificar el material contaminado y toxicidad responsable. En cambio en la toxicidad crónica, muchas veces es difícil establecer una relación causa – efecto por que los síntomas se producen a largo plazo y pueden confundirse con los de otras enfermedades (11).

En la actualidad la crianza canina en forma doméstica se ha intensificado tanto en criaderos comerciales como en los hogares adoptándolos como mascotas predilectas. Los caninos por naturaleza carnívoros, han ido adaptándose al cambio alimenticio que el hombre le ha impuesto. Hoy en día se dispone de alimento balanceado de diferentes marcas. Estos alimentos son elaborados a base de harina de maíz, ya que se conoce que el maíz como todos los cereales es muy susceptible a la contaminación de hongos y

por consiguiente de aflatoxinas. El perro como cualquier especie doméstica es susceptible a padecer de una intoxicación por aflatoxinas que podría estar presente en el alimento que consumen, poniendo en grave riesgo la salud de los mismos (13).

En tal sentido se hace conveniente realizar el estudio de la aflatoxina B1, tomando en cuenta todos los argumentos antes mencionados, y así, generar respuestas efectivas ante el problema que representa la detección de tal toxina y de esta manera evitar problemas de salud de los canes; la presente investigación pretende profundizar en el tema a través de la siguiente interrogante:

PROBLEMA

¿Los principales alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida presentan contaminación con aflatoxina B1?

ANTECEDENTES DE HIPÓTESIS

Antecedentes de investigaciones previas

De acuerdo con las muestras tomadas al maíz usado en la materia prima para el procesamiento o mezclado del alimento de uso canino, los expertos realizaron los estudios microbiológicos que tardaron aproximadamente 15 días. Estos análisis fueron realizados por el laboratorio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH), del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS), para los productos Purina Chow de la empresa Nestlé, arrojaron resultados positivos a la presencia de Aflatoxina (14).

En la ciudad de Santa Cruz de la Sierra, entre los meses de febrero a marzo del 2008 se procedió a analizar muestras de alimento balanceado para canes de diferentes marcas y procedencia que se expende en la ciudad, las mismas que fueron procesadas a través del método del alflatest; lo que permitió la detección de aflatoxinas en el laboratorio de patología aviar de la asociación departamental de avicultores (ADA) (15).

El día 6 de febrero del 2005 fue publicada en prensa un comunicado de Purina de Venezuela donde anunciaba el retiro de los productos DogChow y CatChow del mercado debido a “Reportes de Veterinarios que aparentemente relacionan problemas de salud al consumo de alimento procesado”. El comunicado fue seguido de otro comunicado más detallado y una guía de preguntas frecuentes (16).

Según Purina los análisis realizados en un laboratorio independiente indican que el problema puede estar limitado a dos lotes de producción de DogChow y CatChow. Además hacen una solicitud formal al gremio comercial la continua colaboración en la suspensión temporal de la venta de la referida marca. Pero no hay de parte de la empresa una explicación técnica sobre el problema en sí. Al parecer los alimentos fabricados por Purina de Venezuela fueron creados a base de maíz contaminados con hongos por lo que nuestras mascotas fueron perjudicadas esta vez (16).

En la Universidad de Pamplona 1991, Norte de Santander, Facultad de Ciencias Básicas Departamento de Microbiología se evaluó la presencia de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en muestras de alimentos de consumo infantil comercializados en la Ciudad de Pamplona se aplicaron técnicas analíticas especializadas en el laboratorio de Toxicología (Facultad de Medicina Veterinaria) basadas en técnicas reconocidas por la Asociación Oficial de Química Analíticas de los Estados Unidos (AOAC) para análisis de alimentos. Se detectaron Aflatoxinas en el 10% de las muestras, con niveles de 18.42ug/Kg y 71.25ug/Kg de AFB1 estos niveles superan el valor máximo admisible por la legislación colombiana (10ug/Kg) y por la Unión Europea (0.10ug/Kg) para alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.(17)

BASES TEÓRICAS

Etiología

Existen por lo menos 200.000 especies de hongos y entre ellas, 300 tienen efecto tóxico para los humanos y los animales (2).

Maíz	Avena	Arroz	Trigo
<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium spp</i>
<i>Wallemiasebi</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Alternaria alternaria</i>
<i>Aspergillus terreus</i>		<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus candidus</i>

Tabla: 1 principales especies de hongos productores de aflatoxina.

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son altamente tóxicas y se clasifican en 4 tipos: B1, B2, G1, G2; el carcinógeno natural más potente que se conoce es el B1 por sus efectos toxicológicos agudos en animales y seres humanos. Los efectos de su acción dependerán de la cantidad ingerida, el tiempo de exposición, la edad, y el estado nutricional del animal. Los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos. Las aflatoxinas son toxinas hepáticas que afectan a todos los seres vivos. Elevados contenidos de toxinas en el alimento pueden producir la muerte de los animales (10)

www.bdigitalula.ve

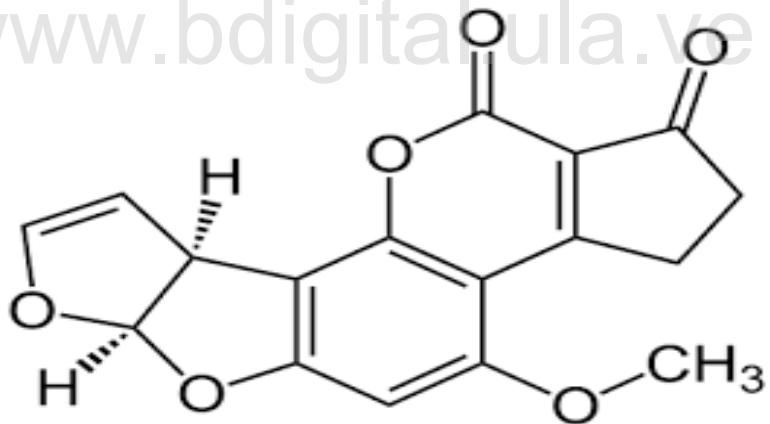


Figura. 1 estructura de aflatoxina B1

Tipos de aflatoxinas y sus metabolitos

Al menos 13 diferentes tipos de aflatoxina son producidas en la naturaleza. La aflatoxina B₁ es considerada la más tóxica y es producida tanto por *Aspergillus flavus* como *Aspergillus parasiticus*. La aflatoxina G₁ y la G₂ son producidas exclusivamente por *A. parasiticus*. Aunque la presencia de *Aspergillus* en productos alimentarios no significa siempre indicación de niveles dañinos de aflatoxina, pero sí implica un riesgo significativo al consumir ese producto.

- Aflatoxina B₁ & B₂: producida por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.
- Aflatoxina G₁ & G₂: producida por *Aspergillus parasiticus*.
- Aflatoxina M₁: metabolito de la Aflatoxina B₁ en humanos y en animales (exposición en ng que puede provenir de la leche materna).

La designación de aflatoxinas B1 y B2 viene dada porque bajo la luz ultravioleta éstas exhiben fluorescencia azul, mientras que las designadas como G se refiere a que muestran en sus estructuras relevantes fluorescencia amarilla verdosa bajo la luz ultravioleta. Además, dos de los productos metabólicos, aflatoxina M1 y M2, son contaminantes directos significativos de alimentos y piensos. Éstos fueron los primeros en ser aislados de la leche (milk) de animales alimentados con preparaciones de aflatoxina; de ahí la designación de M. Estas toxinas tienen estructuras muy parecidas y forman un grupo único de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados, de forma natural (18).

Características generales de la micotoxicosis.

Las características de una micotoxicosis son las siguientes:

- No es una enfermedad transmisible.
- El tratamiento con drogas o antibióticos tiene poco o ningún efecto.
- Los brotes observados son debido a las condiciones climáticas.
- El brote esta comúnmente asociado a un alimento o forraje específico.
(19).

Características químicas

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Es difícil eliminarlas una vez que se producen (20).

Propiedades generales de las aflatoxinas

- Resistente al calor
- No los destruye el proceso de cocción

- No son antigénicas, por lo contrario disminuyen la resistencia de los animales a las enfermedades.
- Los propionatos previenen el crecimiento del hongo pero no tienen efecto sobre las micotoxinas.
- Son carcinógenas, mutagénicas, teratogénicas y embriotóxicas (20).

El crecimiento de *Aspergillus*

Se optimiza con una humedad próxima al 22%, una temperatura entre 25 y 30 °C, además de una buena ventilación. Un déficit de oxígeno limita su crecimiento y su ausencia genera esporulación (por eso no suelen abundar en suelos con alto contenido en arcilla y su desarrollo no es coincidente con la actividad de la nitrificación) (21).

Condiciones ambientales que favorece la proliferación de Aflatoxinas.

Los *Aspergillus* son muy comunes; la acumulación de Aflatoxinas depende de las condiciones del medio ambiente. Antes de la cosecha, el riesgo para el desarrollo de Aflatoxinas es mayor durante los períodos de sequía. Cuando la humedad está debajo del valor normal y la temperatura es alta, el número de esporas en el aire de *Aspergillus* se incrementa. Estas esporas infectan las cosechas a través de los insectos. Una vez infectada

una planta, la producción de aflatoxinas se favorece. Durante la fase de postcosecha, la proliferación de hongos y producción de Aflatoxinas puede exacerbarse en lugares de almacenamiento con alta temperatura y humedad. El hábitat de *Aspergillus* es el suelo, donde se encuentra en vegetación, heno, granos deteriorados microbiológicamente e invadidos por todo tipo de sustratos orgánicos, mientras las condiciones ambientales sean favorables para su crecimiento (22).

Aflatoxinas en alimentos.

La presencia de la Aflatoxina ha sido detectada, a nivel biológicamente significativos, en una gran variedad de productos agrícolas, como los granos en gran cantidad de aceite como el maní, trigo, cebada, avena, y sorgo. Probablemente, ningún producto agrícola puede ser considerado libre de Aflatoxina (23).



Figura: 2 Maíz y trigo contaminados con aflatoxinas

Efectos de las Aflatoxinas

Los efectos de su acción dependerán de la cantidad ingerida, el tiempo de exposición, la edad, y el estado nutricional del animal. Los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos. Las Aflatoxinas son toxinas hepáticas que afectan a todos los seres vivos. Elevados contenidos de toxinas en el alimento pueden producir la muerte de los animales. Son metabolizadas a nivel hepático, a medida que la concentración de toxina aumenta puede ocurrir hepatomegalia, la estructura de este órgano se ve más firme en función de la fibrogénesis, la vesícula biliar aumenta de tamaño, hay alteraciones parenquimatosas, con necrosis, hay desaparición de hepatocitos y reducción somática del órgano (10).

Las aflatoxinas influyen sobre las resistencias a las infecciones en el desarrollo de inmunidad adquirida, en concentraciones bajas (250 – 500 mg/kg.). Se ha demostrado un descenso en la resistencia de las aves a ciertas enfermedades producidas por bacterias y protozoos entre ellas se tienen: salmonelosis, candidiasis, coccidiosis, pasturellosis y enfermedad de Marek (10).

Patología

La exposición a altos niveles de aflatoxina produce una aguda necrosis, cirrosis, y cáncer de hígado (carcinoma de hígado), con hemorragia, hepatitis aguda, edema, alteración en la digestión, en la absorción o en el metabolismo de los nutrientes, el cuadro clínico incluye hígado graso y

edema cerebral severo; a largo plazo se presentan efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos y neurotóxicos (24).

Ningún animal es inmune a los efectos tóxicos agudos de las aflatoxinas; sin embargo, los humanos tienen una extraordinaria alta tolerancia a la exposición de aflatoxinas y raramente sucumben a una aflatoxicosis aguda. Las exposiciones crónicas, subclínicas no lideran tan dramáticamente los síntomas como la aflatoxicosis aguda. Los niños, sin embargo, son particularmente afectados por la exposición a aflatoxinas con detención del crecimiento. La exposición crónica también da un alto riesgo de desarrollar cáncer de hígado, debido a que el metabolito Aflatoxina M1 puede intercalarse químicamente en el ADN y en la alquilación de bases a través de su metabolito epóxido (25).

La causa de la exposición a aflatoxinas es principalmente la ingestión de comidas contaminadas. La inhalación de estas toxinas también puede suceder ocasionalmente debido a exposición laboral. Se han encontrado casos de daño agudo del hígado que puedan ser atribuidos a aflatoxicosis agudas. Un brote de hepatitis aguda en distritos adyacentes en la India, que afectaron a varios cientos de personas, aparentemente estaban asociados con la ingestión de maíz altamente contaminado. Algunas de estas muestras contenían niveles de aflatoxina en el rango de mg/kg, en el que el mayor nivel registrado fue de 15 mg/kg (26).

El cáncer de hígado es más común en algunas regiones de África y del sudeste asiático que en otras partes del mundo, y cuando se considera la información epidemiológica junto con los datos de experimentación en

animales, parece que una mayor exposición a las aflatoxinas puede incrementar el riesgo de cáncer primario de hígado. Existe una correlación positiva entre la ingesta diaria de aflatoxina con la dieta (en el rango de 3.5 a 222.4 ng/kg de masa corporal por día) y la tasa bruta de incidencia de cáncer primario de hígado (en el rango de 1.2 a 13.0 casos por 100 000 personas por año (27).

En vista de la evidencia de los efectos, particularmente el carcinógeno, de las aflatoxinas en varias especies animales, y de la asociación entre los niveles de exposición y la incidencia en humanos de cáncer de hígado, la exposición a aflatoxinas debería mantenerse tan baja como sea posible. Los niveles de tolerancia para los productos alimenticios establecidos en varios países deberían entenderse como una herramienta para facilitar el desarrollo de los programas de control de dicha toxina (28).

Signos Clínicos

La toxicosis aguda en perros aparecen entre los dos y catorce días y se caracteriza por muerte súbita o signos como: anorexia, depresión, disnea, tos, descarga nasal, anemia, epistaxis, heces sanguinolentas, orina de color biliosa, posibles convulsiones y muerte rápida. En la toxicosis subaguda los animales pueden presentar ictericia, hipoprotrombinemia, hematomas y enteritis hemorrágica una alteración similar a la producida por la warfarina. La toxicosis crónica se manifiesta después de uno a dos meses, se caracteriza por un descenso gradual de la eficacia del pienso, productividad y ganancias de peso, pelo basto, anemia, abdomen dilatado, ligera ictericia, depresión y

anorexia. También pueden presentarse abortos y ocasionalmente edema de los miembros. En otras especies los signos son similares cuando son reconocidos en la mayor parte, están relacionados a interferencias en la función hepática (15).

Las siguientes especies animales son listadas en orden aproximado de susceptibilidad decreciente: patos, conejos, pavos, pollos, ratas, gatos, cerdos, truchas, conejillos de indias, cobayos, monos, ganado vacuno y ovino. Sin embargo, la raza animal y su condición alimenticia pueden tener un profundo efecto en la respuesta. La sintomatología de la intoxicación por aflatoxinas depende de los siguientes factores: la cantidad de la micotoxina presente en la ración, el tiempo de exposición, el estado nutricional, la edad de los animales y la composición de la dieta (29).

www.bdigital.ula.ve

Prevención y control

La primera actitud defensiva sería cuidar la humedad del grano, sea propio o comprado debiendo tener como límite de humedad máxima de 12 a 14 % ya que niveles más altos estimulan el crecimiento de hongos. Limpiar bien los silos y los lugares donde se almacenan los granos ya que la presencia de los hongos en estos lugares, contaminarán el grano almacenado en ellos. Cuidar y controlar los insectos y roedores ya que el grano una vez dañado es 5 veces más susceptible al ataque de hongos. Un periodo largo de almacenaje eleva hasta 4 veces la contaminación de aflatoxinas (30).

Realizar análisis de laboratorio a la materia prima a ser usada en la granja, programar la compra con anticipación para no tener problemas, no dejar las compras cuando se está encima de una cosecha, pues en esta época donde se limpian los silos de los cereales remanentes y viejos y algunos productores de balanceados pueden usar estas materias primas en forma inescrupulosas. Tratar de moler los granos en los establecimientos para no facilitar a los hongos un medio favorable de desarrollo. Se deberá sospechar que puede haber contaminación cuando los granos no cumplan con buenos pesos electrolíticos, ya que los hongos se desarrollan a partir del germen y el bajo peso estará marcando una disminución en la calidad del grano (31).

Los métodos de control de la enfermedad deberán forzosamente y por el momento pasar por una prevención tanto en la contaminación a nivel de campo, como en los distintos pasos de la comercialización o depósito. Recordar que la toxina son altamente resistente a todos los medios usados hasta el momento para su desactivación y a pesar de que en algunos estudios se mencionan nuevo agentes secuestrantés, se deberá ser muy cauto y utilizar los granos menos contaminados en las especies con menor susceptibilidad a dichas toxinas. El consumidor de alimento balanceado deberá tener presente que la materia prima contaminada por ser de bajo valor se presta a que se le utilice la fabricación de alimento para el ganado. Por lo tanto, deberá solicitar al fabricante la especificación de los niveles de toxinas en el alimento terminado (31).

Tratamiento de la micotoxicosis por aflatoxinas

En primer lugar, no hay un tratamiento específico para curar este tipo de intoxicaciones lo único que se puede hacer es:

- Eliminación del alimento tóxico y reemplazarlo con comida sin contaminar. La recuperación de los animales de casi todas las micotoxicosis es posible poco tiempo después de administrar productos libres de toxinas fúngicas.
- Administrar una terapia de soporte a base de vitaminas, aminoácidos, minerales, etc.
- Suministrar Carbón activado vía oral para que impida la absorción intestinal de las micotoxinas presentes en la comida(19)

Toxicocinética

Las aflatoxinas poseen una alta liposolubilidad, por eso son absorbidas en el tracto gastrointestinal, son biotransformadas en el hígado por enzimas microsómicas de la superfamilia del citocromo P450, entre las que se encuentran CYP1A2, 3A4, 3A5 y 3A7. Las dos enzimas más importantes son CYP3A4, que interviene en la formación de la forma exo-epóxido y el metabolito AFQ1, y la CYP1A2, que forma, en su mayoría, la forma endo-epóxido y la AFM1. En humanos se producen además otros metabolitos: aflatoxicol, AFP1, AFB2a y AFB1-2,2 dihidrodiol (24).

La vida media plasmática para la AFB1 es de 36.5 minutos, su volumen de distribución es 14% del peso corporal y el aclaramiento renal 1,25 l/kg/h. Aproximadamente el 80% de la dosis total de AFB1 se excreta en una semana. La AFM1 se excreta en las 48 horas siguientes a la ingestión y representa un 1-4% de la AFB1 ingerida (24).

Toxicodinamica.

La aflatoxina B1 (AFB1) está entre los más potentes carcinógenos conocidos. Su acción carcinogénica se basa en la biotransformación por el sistema hepático microsomal P450 a AFB1-8,9-epóxido, un metabolito altamente reactivo capaz de unirse a las proteínas, al ADN y al ARN; formando un compuesto estable con el N7 de los residuos guanil que puede causar mutaciones en el codón 249 del gen p53 supresor de tumores. Esta alteración es característica de varios carcinomas, especialmente del carcinoma hepático en el hombre. AFB1-8,9-epóxido forma uniones covalentes con los residuos de guanina del ADN, que se excretan por vía urinaria y pueden utilizarse como biomarcadores de exposición en los grupos con riesgo de cáncer de hígado (24).

Cromatografía.

La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las

ramas de la ciencia. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos da como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y por tanto una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla (32).

En este mismo sentido, la cromatografía se refiere a una técnica empleada para la separación de los componentes de una mezcla por medios físicos, para aislar cada uno de estos y proceder a su identificación y cuantificación (32).

Se fundamenta en hacer pasar la mezcla a través de un lecho o fase fija semipermeable, cada componente dependiendo de su naturaleza y de la afinidad que tengan con la fase fija, se desplazaran con mayor o menor velocidad a través de esta, por lo cual a cada componente de la mezcla inicial le corresponderá un tiempo específico atravesarla, a estos tiempos se les conoce como tiempos de retención. (32)

Debido a este diferencial en las velocidades de desplazamiento, pueden separarse los compuestos constitutivos de una mezcla si se hacen pasar por una fase fija lo suficientemente larga, obteniéndose primeramente los compuestos que ofrecen menos resistencia al desplazamiento, así sucesivamente hasta llegar al que ofrece mayor resistencia a fluir en la fase fija seleccionada para la realización del ensayo (32).

Esta técnica aparte de ser utilizada analíticamente, puede ser empleada en la purificación de algunas sustancias, debido a esto tiene múltiples usos en la química, biología y en el área de farmacología. La cromatografía se clasifica en varios tipos dependiendo su método de aplicación (33).

Tipos de cromatografía.

- Cromatografía líquida.
- Cromatografía plana (En papel y de capa fina).
- Cromatografía de fluidos supercríticos.
- Cromatografía de gases (33).

Cromatografía en Capa Fina.

Fundamento: La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica. Entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.

- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los Productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado (34)

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente. La cromatografía en capa fina es la combinación de todos los colores en un papel (34).

Adsorbentes y eluyentes de CCF

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias

más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. El adsorbente interacciona con las sustancias mediante interacción dipolo-dipolo o mediante enlace de hidrógeno si lo presentan (34).

El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En el siguiente recuadro se recoge por orden creciente de fuerza eluyente los disolventes más comúnmente empleados.

Hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol < metanol < agua (34)

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada. El eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y del error"(34)

Determinación del Rf

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los

centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de:

- La polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.
- Naturaleza del disolvente. Así, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa (34)

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa (34).

Para calcular el R_f se aplica la siguiente expresión:

$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X) / distancia recorrida por el eluyente (Y)}$ (34)

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. Si ésta es excesivamente grande se obtendrá un valor erróneo del Rf. Se recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un Rf medio en torno a 0.3-0.5. Para compuestos poco polares, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano/metanol en distintas proporciones (34).

Revelado de las placas

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto (34)

En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cromatograma requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados (34).

Cromatografía de gases.

En este tipo de cromatografía como su nombre lo indica es necesario que la muestra a evaluar se encuentre en estado gaseoso, es por ello que para la evaluación de sólidos o líquidos por este método la muestra debe ser diluida en un solvente determinado, y se procede a vaporizarla una vez ha sido inyectada al cromatógrafo, el equipo viene provisto con un vaporizador para estos casos (35).

Debido a que la muestra debe ser sometida a altas temperaturas para su vaporización, esta técnica cromatográfica presenta ciertas restricciones para muestras de interés biológico ya que muchas de estas se degradan por efecto de la temperatura. Una vez que la muestra ha sido inyectada al cromatógrafo, es necesario mantener la velocidad de flujo y garantizar su desplazamiento o movilidad a través de toda la columna o fase fija, y a su vez debe mantenerse una presión constante durante la realización del ensayo para esto se utiliza un gas portador que debe reunir unas características específicas (35).

Características que debe tener el gas portador en la cromatografía de gases.

Debe ser inerte, esto con la finalidad de evitar que reaccione químicamente con la muestra o con los componentes de la columna cromatográfica. El gas portador debe tener una buena capacidad para minimizar el efecto de difusión gaseosa. Poseer un alto grado de pureza,

para evitar cualquier tipo de interferencias en la determinación. Otro factor importante es que sea económico. Debe ser acorde al tipo de detector empleado por el cromatógrafo. Por lo general los gases empleados para esta función son el Nitrógeno, Argón, Helio o hidrógeno, en algunos casos puede utilizarse Dióxido de carbono pero esto estará sujeto al tipo de detector que utilice el equipo (35)

Volviendo a la descripción del ensayo. La muestra previamente vaporizada se hace pasar a través de la fase fija compuesta por la columna cromatográfica, que en este caso es un capilar el cual por lo general es selectivo al tipo de analito que se desee determinar y a su vez posee características propias de diámetro y longitud, esta columna se encuentra dispuesta en una especie de horno que garantiza las condiciones de temperaturas predefinidas al método de ensayo empleado (35)

Durante el recorrido por el capilar ocurrirá la separación de los componentes de la muestra, quedando rezagados los que presentan mayor afinidad con la fase fija o estacionaria, aquellos que presentan menos afinidad recorrerán la columna en menos tiempo por lo cual sus tiempos de retención serán menores a los demás componentes, cada sustancia presente en la muestra tiene un tiempo de retención característico a su naturaleza fisicoquímica (35).

Al terminar el recorrido por la columna, cada componente de la muestra pasará por un detector en el cual emitirá una señal que será procesado por un computador, información con la cual se puede identificar y cuantificar dicha sustancia dependiendo de la intensidad de la señal emitida y del tiempo de retención respectivo (35).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El interés general por las micotoxinas aumento en 1960, cuando se declaró en animales de granja de Inglaterra una micotoxicosis transmitida por el pienso y denominada enfermedad X del pavo, de la que más tarde se comprobó que era causada por aflatoxinas, la cual causo la muerte repentina de 100 mil pavos alimentados con maní infectado con AF. Se descubrió ulteriormente que estas son hepatocarcinogénicas en animales y seres humanos, lo que fomentó la investigación sobre las micotoxinas. La aflatoxicosis ha sido reportada y descrita en pollos de engorde, así como sus consecuencias en la salud y capacidad productiva del ave como una alteración generalizada que conlleva a la pérdida de peso, alteración de la conversión alimenticia e inmunosupresión, esta última aumenta la susceptibilidad del ave a sufrir enfermedades virales y bacterianas (36).

Durante el año 1999 en los Estados Unidos también se presentaron casos similares donde varias marcas de alimentos estaban contaminadas con toxinas que causaron la muerte de un número elevado de perros. Al parecer el maíz de estos alimentos estaba contaminados con hongos cuya producción de toxinas puede causar en el mejor de los casos vómitos, pérdida de apetito y diarrea, pero en el peor de los casos pérdida de peso, daño severo en el hígado, cojera e incluso la muerte. En esas fechas se retiraron miles de toneladas de alimento del mercado que causaron pérdidas sobre los 20 millones de Dólares solo a una empresa “Nature’s recipe” y fueron 55 marcas en total las afectadas (15).

En Bolivia (2001) estudios de contaminación con aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* en la castaña y el maní se determinó que el maní presenta una mayor contaminación por la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus*. Los factores posibles son, tiempo de exposición y manipulación de éste producto, constituyéndose en un riesgo epidemiológico para la salud de la población (15).

En Venezuela en el año 2005, se reportó 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. De acuerdo a las muestras tomadas al maíz usado en la materia prima para el procesamiento o mezclado del alimento de uso canino permitieron detectar la presencia de aflatoxinas (toxina producida por el hongo *Aspergillus Flavus*). En febrero de ese mismo año fue publicada en prensa un comunicado de Purina de Venezuela donde anunciaba el retiro de los productos DogChow y CatChow del mercado debido a “Reportes de Veterinarios que aparentemente relacionan problemas de salud al consumo de alimento procesado” (14).

Para el año 2008, entre los meses de febrero a marzo se procedió a analizar muestras de alimento balanceado para canes de diferentes marcas y procedencia que se expende en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra del total de muestras analizadas, solamente en una de ellas se encontró presencia de aflatoxinas con niveles superiores al nivel máximo permitido, fijado por la Unión Europea (UE) (15).

A finales del año 2008 se notificó extrañas muertes de etiología desconocida en venados, principalmente con marcador 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 el laboratorio de Toxicología Forense (GITADEF) paralelamente con el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) de esa Facultad. Se iniciaron ensayos analíticos para identificar y confirmar la presencia de aflatoxinas (37).

www.bdigital.ula.ve

HIPÓTESIS

En la detección de la presencia de aflatoxina B1 en alimentos concentrados para perros utilizando el método de cromatografía de capa fina y posterior confirmación con cromatografía de gases es necesario plantarse las siguientes hipótesis:

Hipótesis Alternativa

Se detectó la presencia de aflatoxinas B1 en alimentos concentrados para perros a través de los métodos de cromatografía de capa fina y cromatografía de gases.

Hipótesis Nula

No se detectó la presencia de aflatoxinas B1 en alimentos concentrados para perros a través de los métodos de cromatografía de capa fina y cromatografía de gases.

De esta manera, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Detectar la aflatoxina B1 en alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida, utilizando el método cromatografía de capa fina.

Objetivos Específicos:

- Confirmar por el método de cromatografía de gases en masas la presencia de aflatoxina B1 en alimentos concentrados para perros.
- Establecer los niveles de aflatoxinas B1 en alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida.
- Comparar las diferencias entre los resultados obtenidos por los métodos usados en cada una de las marcas de alimentos para perros.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El grado de importancia que puede llegar a tener la presencia de metabolitos fúngicos en los alimentos, está relacionado con su toxicidad, con la naturaleza e incidencia económica de los productos contaminados, su proporción en la dieta del hombre y de los animales, el tipo de efecto tóxico producido y la posibilidad de que este sea acumulativo con graves efectos a largo plazo, como la oncogénesis o mutagenesis.

Debe tenerse en cuenta que usualmente cuando los alimentos se deterioran, no son consumidos por el hombre o al menos se descartan las partes afectadas, que muchas veces son destinadas al consumo animal. Esto explica que la incidencia de las micotoxicosis agudas es fundamentalmente un problema de sanidad animal, en tanto que para el ser humano la de mayor importancia es la toxicidad crónica, asociada con el consumo de pequeñas cantidades de toxinas durante períodos prolongados.

En general las micotoxicosis agudas son más fácilmente detectables, por la intensidad y especificidad de los síntomas y también por la posibilidad de identificar el material contaminado y toxicidad responsable. En cambio en la toxicidad crónica, muchas veces es difícil establecer una relación causa – efecto por que los síntomas se producen a largo plazo y pueden confundirse con los de otras enfermedades. Es por lo antes expuesto que este trabajo de investigación radica principalmente en la detección de la aflatoxina B1 en alimentos para perros que se expenden en la ciudad de Mérida y por ende

evitar problemas de salud de los canes que son alimentados con estos productos.

El problema es muy complejo, porque existe una cantidad de factores que pueden modificar las respuestas tóxicas. Hoy sabemos que la naturaleza e intensidad de los efectos varía con el sexo, la edad, el estado nutricional, la composición de la dieta, la exposición simultánea a otros agentes tales como pesticidas, drogas, etc. Los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos. Las aflatoxinas son toxinas hepáticas que afectan a todos los seres vivos. Elevados contenidos de toxinas en el alimento pueden producir la muerte de los animales.

www.bdigital.ula.ve

MATERIALES Y MÉTODOS

Variables de estudio:

- Aflatoxina B1
- Alimentos concentrados para perros

Definición de variables:

- **Aflatoxinas B1:** Representan el grupo de toxina más conocido y estudiada hasta el presente. El grupo de hongos que las produce es de la especie ***Aspergillus*** y las dos especies más importantes son el *A. flavus* y el *A. parasiticus*. Se conocen 18 tipos de toxinas dentro de este grupo, los más conocidos son la B1, B2, G1, G2. La aflatoxina B1 es fluorescente a la luz ultravioleta de onda larga a concentraciones de 1 X 10 a la cuarta por microgramo. La aflatoxina B1 es un hepatocarcinógeno potente conocido y que solo basta ingerir 15 microgramo/kg para producir cáncer, (en perros de 1 microgramo/kg día) siendo excretada como aflatoxina M1 en leche u orina al hidroxilarse el Carbono 4, otra forma de transformación de la B1 es como aflatoxina P1 la cual se elimina como glucurónio. La aflatoxina

B1 induce cambios en la composición de la proteína sérica, disminuye la actividad de complemento y causa una interferencia del interferón. La aflatoxina B1, inhibe la síntesis de los lípidos en varias especies de animales como ratas, pato, pollo y el hombre.

- **Alimentos concentrados para perros:** Los animales domésticos, principalmente los perros son alimentados con productos de origen natural, a base de cereales como el maíz, tal es el caso de los alimentos concentrados que se expenden en el mercado nacional, tales alimentos son procesados utilizando aditivos no naturales pero que cuentan con pruebas validadas por instituciones encargadas de la supervisión de los mismos. Pero su fabricación, depósito, temperatura y tiempo de caducidad pueden afectar la calidad del producto, provocando en ellos ciertas contaminaciones, entre la más común se encuentra la aflatoxina B1, cuya presencia está dada por el hongo del género *Aspergillus*.

Operacionalización de las Variables.

Esta investigación se realizó usando muestras de alimentos concentrados para perros con el fin de detectar en ellos la presencia de aflatoxina B1, utilizando los métodos de cromatografía de capa fina y cromatografía de gases. Es así que las variables se operacionalizan de la siguiente manera:

Variable Independiente	Variable Dependiente	Variables Intervinientes
Alimentos concentrados para perros	Aflatoxina B1	Factores que influyen en el desarrollo de los hongos (temperatura, humedad, tiempo de almacenamiento).

Tabla: 2 operacionalización de las variables.

METODOLOGÍA

A continuación se describe detalladamente los aspectos metodológicos que se emplearon en el desarrollo de este estudio, referida a detectar aflatoxinas B1 en alimentos concentrados para perros que se expenden en el estado Mérida, y de esta manera lograr el objetivo deseado.

TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación es de tipo experimental ya que se utilizó la metodología empleada para este tipo de estudio, es decir, los resultados obtenidos se alcanzaron a través del análisis de las muestras problema por medio de técnicas de laboratorio. En efecto, dentro del carácter experimental de este trabajo, se encuentra que es una investigación analítica, ya que se busca analizar el comportamiento del fenómeno objeto de análisis, en este caso, la aflatoxina B1 en muestras de alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida, además la investigación es de la modalidad expofacto haciendo alusión a que primero se produce el hecho, es decir, primero está la producción de la micotoxina aflatoxina y después se analizan las posibles causas y consecuencias, llevándolas al laboratorio para su posterior análisis, para establecer posibles relaciones de causa-efecto. Significa entonces que se recolectaron las muestras de alimentos

concentrados para perros que se expenden en diferentes locales comerciales de la ciudad de Mérida, el criterio de inclusión de tales muestras se enmarcó en la demanda de venta que presentaba el alimento concentrado, esto quiere decir que las muestras seleccionadas fueron aquellas que más se consumen por los canes en la ciudad, estas muestras se prepararon siguiendo un protocolo de análisis para luego ser estudiadas en el laboratorio de toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, tales muestras fueron sometidos al protocolo adecuado para este tipo de análisis, tal procedimiento se explicará con detalle en los incisos siguientes, el estudio experimental y analítico se desarrolló utilizando los métodos cromatográficos con el objetivo de detectar la presencia de la Aflatoxina B1 en la muestras problema.

www.bdigital.ula.ve

POBLACIÓN Y MUESTRA

Población:

Una población es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación. Por lo tanto, en este trabajo la población estuvo conformada por los diferentes tipos de alimentos concentrados para perros que se comercializan en el estado Mérida. Se tomó este tipo de producto ya

que la Aflatoxina B1 puede ser detectada en el mismo bajo condiciones antes expuestas, por lo tanto, se justifica el uso de los diferentes tipos de alimentos para canes.

Muestra:

La muestra es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible, en este sentido, la muestra permite hacer inferencias o generalizar los resultados al resto de la población con un margen de error conocido.

En este caso, la muestra sometida a análisis estuvo representada por seis tipos de alimentos concentrados para perros, tales muestras fueron: Purina Dog Chow, SuperCan Carne, Purina K-nina, ProPlan, NutriCan y Perrarina. Resulta oportuno indicar que la muestra seleccionada se expende en el estado Mérida, con altos números de ventas, por lo que se consideran tales marcas de alimento para perros, las más vendidas y las más consumidas por los canes, por las propiedades que ofrecen en la alimentación de los animales.

En tal sentido, los productos que componen la muestra cuentan con características comunes que son fundamentales para obtener la información necesaria y desarrollar la investigación, estas características se detallan a continuación.

Descripción de la muestra

Los alimentos concentrados para perros sometidos a estudio presentan características comunes entre sí, tales son descritas por la casa comercial que fabrica el producto, y se pueden observar en la etiqueta de información nutricional del empaque del alimento, todas ellas coinciden en que son alimentos nutritivos y ofrecen al animal una dieta balanceada, brindando nutrición, digestibilidad y seguridad a los animales. Se presentan como un alimento completo, rico en vitaminas y proteínas de alta calidad, con ingredientes saludables que satisfacen totalmente todos los requerimientos nutricionales diarios de los perros de cualquier raza.

A cada muestra se le otorgó un valor numérico, esto con el fin de identificarlo en el proceso analítico del laboratorio. Las muestras de alimentos concentrados usados se encontraban dentro del tiempo de uso estipulado por la casa comercial, con referencia al tiempo de caducidad, ya que ellas debían estar en condiciones óptimas para el momento del análisis, es por ello que se expresan los datos siguientes:

Muestra	Nombre del alimento concentrado	Fecha de elaboración	Fecha de vencimiento
1	Purina Dog Chow	31/12/2017	01/06/2019
2	SuperCan Carne	04/01/2018	04/01/2019
3	Purina K-nina	12/04/2018	01/10/2019
4	ProPlan	15/02/2018	15/02/2019
5	NutriCan	20/04/2018	12/06/2018
6	Perrarina	10/10/2017	15/01/2019

Tabla: 3 descripción de la muestra.

www.bdigital.ula.ve

Procedimiento de análisis

Días previos al análisis se procedió a recolectar las muestras que fueron sometidas al protocolo analítico, consistió de 1 kilogramo de alimento para perros de cada marca antes mencionada, es decir, fueron 6 kilogramos de alimento concentrado, cada kilogramo representó una marca distinta, entre las que se tienen: Purina DogChow, SuperCan Carne, Purina K-nina, ProPlan, NutriCan y Perrarina; cada muestra se identificó con un número (1, 2, 3, 4, 5 y 6). Al momento del muestreo se anota la marca del producto su fecha de fabricación y de vencimiento, el producto se adquirió de distintos mercados de la ciudad de Mérida; en este punto del trabajo, se contaba con

las seis muestras representativas, mismas que cumplían con los criterios de inclusión requeridos para el estudio posterior.

La preparación de la muestra se basó en técnicas adecuadas para los tipos de cromatografías que se usaron (Cromatografía en Capa Fina y Cromatografía de Gases), tal procedimiento fue absolutamente necesarios para determinar las aflatoxinas. Luego se procede a la extracción de la AF con solventes orgánicos utilizados para realizar la cromatografía, luego se somete a la luz UV, se revela y se procede a confirmar el positivo por cromatografía de gases.

Debido a que las micotoxinas, se encuentran en pequeñas cantidades y no tienen una distribución homogénea, tanto el muestreo como el análisis de los diferentes sustratos son claves a la hora de su control. Las legislaciones son estrictas pues es necesario detectar niveles más bajos con métodos cada vez más sensibles. Es por esto que existen distintos métodos diagnósticos para su identificación. Los más utilizados son cromatografía en capa fina y cromatografía de gases.

Métodos de análisis de aflatoxina en alimentos concentrados para perros.

Método de Cromatografía de Capa Fina (CCF).

Este método proporciona varias ventajas, debido a que permite analizar gran cantidad de muestras por análisis, lo cual lo hace un método económico

y fácil de aplicar, debido a que sólo es necesaria para su determinación la ayuda de luz ultravioleta, o luz visible. Los compuestos usados en este tipo de análisis son fáciles de conseguir y no son de gran costo, por lo cual se podría indicar que es otra ventaja económica del uso de este método.

Es una técnica cromatográfica utilizada, entre otros posibles usos, para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla. Se utilizaron placas de aluminio precubiertas, Merck. # 5721. D.D. de 20 x 20 cms, activadas durante 60 min a 1000 C, es entonces que se esperaba observar a LUV onda larga, la fluorescencia azul característica de la Aflatoxina B1, con Rf de 0,50.

Método de Cromatografía de Gases.

www.bdigital.ula.ve

Esta técnica es muy usada en la industria alimentaria debido a su capacidad de detección en muestras como semillas y cereales. En la Cromatografía de Gases, el cromatógrafo a utilizar es Hewlett Packard Hp 6890series Gc system, se empleó para cuantificar y confirmar las micotoxinas aflatoxinas presentes en la muestra a estudiar. En la Cromatografía de Gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte; esta fase no interacciona con las moléculas del analito, su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Equipos y materiales a utilizar

- Balanza digital
- Tanque y placa de Cromatografía Silica gel F-254
- Estufa
- Baño de María
- Campana de Extracción
- Columna para purificación
- Material Vidrio: cilindro graduado, fiola, tubo de ensayo Beaker, capsula de porcelana, varilla de vidrio
- Embudo de separación
- Lámpara UV
- Vació con Quitaste
- Agitador Mecánico
- Cromatografo Hewlwt Packard Hp 6890 series

Reactivos

- Cloro
- Metanol
- Cloruro de Sodio al 10 %
- N – Hexano
- Cloroformo
- Silica gel 60 para Cromatografía en columna
- Sulfato de Sodio Anhídrido
- Diclorometano
- Éter Etílico
- Cetona

Preparación de Reactivos

- Solución de Metanol-Agua: Mezclar 170ml de metanol con 30ml de agua.
- Cloruro de Sodio al 10 %: disolver 10g de Cloruro de Sodio en 100ml de agua.
- Solución Cloroformo-Acetona: Mezclar 9ml de cloroformo con 1ml de Acetona.

Preparación de la muestra.

- Pesar 50 gr de alimento concentrado
- Agregar 200ml de una solución metadona-agua (170ml de metanol- 30ml de agua) y luego agitar por 30min, en agitador mecánico
- Luego de agitar, tomar 40ml de la solución (sobrenadante) y agregarlo a un embudo de separación, colocar 40ml de Cloruro de Sodio al 10 % y mezclar, agregar 25ml de N-Hexano y agitar por 10min.
- Se dejan separar las dos fases, colocar la fase inferior en otro embudo de separación y descartar la fase superior.
- Extraer de la fase inferior, de estar presente, la aflatoxina, en doble extracción con 25ml de cloroformo cada una agitando por 10min, dejar separar las fases, recolectar la fase orgánica (inferior) en una fiola con tapa, luego agregar nuevamente 25ml de Cloroformo al embudo (fase acuosa). Agitar por 10min, nuevamente y dejar separar las fases, recolectar la fase orgánica (inferior) mezclarla con la porción recolectada anteriormente y evaporarla a sequedad en baño de maría.



Figura 3. Muestras de alimento y su filtrado

2.) Preparación y acondicionamiento de la columna. (usando una inyectadora de 12 o 15 cc).

- Colocar algodón cristalizado en la parte inferior de la columna.
- Adicionar: 2gr. Sulfato de Sodio Anhídrido, en la parte superior y 2gr de silica para Cromatografía en columna (70-230 mesh).

3.) Acondicionar las columnas.

- Lavar la columna, con 3ml de N-Hexano y 3ml de Diclorometano utilizando vacío.
- Retomar la muestra evaporada anteriormente con 3ml de Diclorometano y adicionar a la columna, sin vacío.
- Lavar la fiola que contenía la muestra con 2 porciones de 1ml c/u de Diclorometano y adicionar la columna.
- Lavar la columna con 3ml de N-Hexano, 3ml de Éter etílico y 3ml de Diclorometano, utilizado vacío.

4.) Extraer la Aflatoxina.

- Apagar el vacío, extraer las aflatoxinas con 3 porciones de 3ml de Cloroformo- Acetona c/u (9ml de Cloroformo + 1ml de Acetona), recolectándola en un tubo de ensayo.

- Evaporar la sequedad en baño de María.

5.) Retomar con 0.5 ml de Cloroformo (CHCL3) y sembrar en la placa Cromatografica T- 254.

- Colocar la placa de cromatografía en el sistema para las aflatoxinas (9 ml de cloroformo y 10 ml de acetona). La placa cuenta con un frente de recorrido, este es de 15 cm, con un tramo de recorrido de 15 cm, el soporte donde se coloca la muestra es de 0,5 cm de altura, allí se sembrará 20ul de cada muestra. En este punto se esperaba el recorrido de la aflatoxina B1 sobre la placa.
- Introducir la placa en un tanque que tiene papel filtro, éste ayuda a saturar más rápido el tanque y de esta manera lograr el recorrido de la aflatoxina sobre a placa, este debe ser horizontal y paralelo.
- Sacar la placa del tanque, dejar secar y luego llevar al ultravioleta.

Procedimiento de cromatografía de gases

Para la separación mediante cromatografía de gases, se realizó en el instituto de investigación de la facultad de Farmacia y Bioanálisis. Se inyectaron los 3 mil que se recolectaron de la extracción de aflatoxina a separar en una corriente de un gas inerte a elevada temperatura; esta

corriente de gas, atraviesa una columna cromatográfica que separa los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o, en muchos casos por medio de una mezcla de ambos. Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recogida de muestra

www.bdigital.ula.ve

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El presente segmento muestra los resultados obtenidos en el estudio destinado a la detección de Aflatoxinas B1 en alimento concentrado para perros, mismos que se expenden en el estado Mérida, tales resultados surgieron de los métodos empleados en el laboratorio, asimismo este apartado describe las deducciones de la investigación, su debida interpretación y posterior análisis.

Cabe destacar que la muestra fue de seis diferentes tipos de alimentos concentrados para perros, estos cumplían con los criterios de inclusión que exigió la investigación. Vale destacar que esas seis muestras, aunque en principio parecían pocas, son consideradas como muestras representativas del resto de la población, es decir, las seis marcas de alimentos concentrados para perros fueron suficientes para el análisis, puesto que en la ciudad de Mérida no existe gran variedad de este tipo de alimento, es por eso que se seleccionaron las muestras mencionadas en los incisos anteriores, a razón de ser las más consumidas por los canes y las que se encontraban con mayor facilidad.

También resulta oportuno mencionar que, en efecto, en el mercado existen otras marcas de alimento para perros, mismas que demanda poca venta, asimismo conviene resaltar que no se tomaron en cuenta para los objetivos de este trabajo por no cumplir con los criterios de exclusión que exigía la investigación.

Seguido de la obtención de las muestras sometida a estudio y luego de su clasificación relacionada con la fecha de caducidad, disposición en el mercado, depósito y condiciones de temperatura y humedad, se procedió a hacer el análisis detallado.

Es importante señalar que los resultados se disponen en tablas con información cualitativa, puesto que el análisis estadístico numérico no fue necesario, esto en busca de confirmar las hipótesis propuestas en esta investigación. Es así que los resultados quedan expresados de la manera que a continuación se presenta:

Determinar la presencia de aflatoxina B1 con el método de cromatografía de capa fina.

www.bdigital.ula.ve

Con respecto a la determinación de la aflatoxina B1 en las muestras de alimentos examinadas, a través del método de cromatografía de capa fina, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4. Resultado de la cromatografía de capa fina a la cual fueron sometidas las muestras

Muestra	Alimento concentrado	Cantidad de muestra	Cromatografía de Capa Fina
1	Purina DogChow	20 ul	No hubo desplazamiento de ningún compuesto

2	SuperCan Carne	20 ul	No hubo desplazamiento de ningún compuesto
3	Purina K-nina	20 ul	No hubo desplazamiento de ningún compuesto
4	ProPlan	20 ul	No hubo desplazamiento de ningún compuesto
5	NutriCan	20 ul	No hubo desplazamiento de ningún compuesto
6	Perrarina	2 ul	No hubo desplazamiento de ningún compuesto

Fuente: Chacón y Valero, 2018

En este sentido, la cromatografía de Capa Fina, fue el primer método de separación usado para buscar la presencia de aflatoxinas B1, encontrándose que no hubo desplazamiento de ninguno de los componentes de la muestra.

Tal como se evidencia en la tabla 4, se depositó 20 ul de cada muestra en el extremo de la lámina (fase estacionaria), se introdujo en la cubeta (fase móvil), se esperó el tiempo necesario de reacción pero aun así

el resultado fue negativo con respecto a la obtención del componente a estudiar (Aflatoxina B1), esto se constató en presencia de la luz UV donde se esperaba la aparición de las marcas de desplazamiento hecho por la aflatoxina revelando un color azul fluorescente.

Esto se fundamenta en el apartado teórico que establece que, en la fase fija semipermeable, la muestra, dependiendo de su naturaleza, debió tener afinidad con la fase fija para que sus componentes, en este caso, la aflatoxina se pudiera desplazar con cierta velocidad por la fase fija, en esa ocasión, tal desplazamiento se correspondería con un tiempo específico que sería el tiempo de retención, evento que no ocurrió ya que no hubo presencia de desplazamiento de ningún componente, más específicamente la aflatoxina B1, con esto se puede deducir, en un primer momento, que ninguno de los tipos de alimentos para perros presentaba contaminación por aflatoxina B1, por lo tanto, se trataba de muestras limpias.

Asimismo, resulta oportuno indicar que la prueba se repitió para obtener un resultado confiable, se cuidó el protocolo y las muestras estaban preparadas para ser sometidas a estudio. Por lo tanto, los resultados que se obtuvieron cuentan con veracidad, sin embargo, fue indispensable usar el método de Cromatografía de Gases para confirmar el resultado obtenido por el método cromatográfico de Capa Fina.

Confirmar por el método de cromatografía de gases la presencia de aflatoxina B1 en alimentos concentrados para perros.

Se empleó el método de cromatografía de gases para confirmar la veracidad del resultado anterior. Es decir, se buscaba la detección de la

aflatoxina B1 con el objetivo de cuantificar y confirmar la presencia de la micotoxina en las muestras. El resultado se presenta en la siguiente tabla, en la cual se dejan ver las muestras examinadas.

Esta técnica es muy usada en la industria alimentaria debido a su capacidad de detección en muestras como semillas y cereales es por eso que se hizo uso del método ya que se trata de un alimento concentrado preparado a base de maíz y con esta técnica se comprueba la presencia de la micotoxina aflatoxina B1 y de esta manera con la Cromatografía de Gases se buscaba cuantificar y confirmar las micotoxinas presentes en la muestra a estudiar. Cabe destacar que en esta técnica la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte; esta fase no interacciona con las moléculas del analito, su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Es así que los resultados obtenidos por la cromatografía de gases fueron los siguientes:

Tabla 5. Resultado de la cromatografía de gases a la cual fueron sometidas las muestras.

Muestra	Alimento concentrado	Cantidad de muestra	Cromatografía de gases
1	Purina DogChow	3ul	No hubo transporte del analito
2	SuperCan Carne	3ul	No hubo transporte del analito

3	Purina K-nina	3ul	No hubo transporte del analito
4	ProPlan	3ul	No hubo transporte del analito
5	NutriCan	3ul	No hubo transporte del analito
6	Perrarina	3ul	No hubo transporte del analito

Fuente: Chacón y Valero, 2018.

Haciendo referencia al resultado que se muestra en la tabla 5, la cromatografía de gases que se realizó con las muestras problema arrojó que todas las muestras de alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida sometidas a estudio no detectaron la presencia de la micotoxina Aflatoxina B1, ya que no hubo transporte del analito que se pretendía detectar.

Esto se basa en el fundamento de la prueba que establece que una vez que los componentes de la muestra fueron separados por la columna, se hizo preciso disponer a la salida de éste de un sistema de detección, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de sustancia que pasa a través de él; este sistema de detección se compone de detectores que son de tipo diferencial, es decir, no ofrece señal cuando pasa por ellos solamente el gas portador, es por eso que la sustancia eluida contenía la muestra en la

columna para de esta manera poder obtener la detección de la aflatoxina B1, ofreciendo un resultado negativo, por lo tanto, en este apartado se confirma que no hubo presencia de la micotoxina, lo que permitió, hasta ese momento, deducir que las muestras utilizadas se encontraban en condiciones óptimas para su uso, libres de micotoxinas Aflatoxinas B1.

Establecer los niveles de aflatoxinas B1 en alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida.

En este caso, no hubo cuantificación de las aflatoxinas B1 para las muestras ya que con la cromatografía de gases se confirmó que las muestras se encontraban limpias de las micotoxinas, por lo tanto no se establecieron niveles de las mismas.

Esto concuerda con las teorías enunciadas que afirman que al obtener la presencia de las Aflatoxinas B1, a través de la cromatografía de gases se cuantificarían y de esa manera establecer un estudio estadístico en el que se expresarían los niveles de la Aflatoxina y de tal forma obtener un resultado numérico en cuanto a concentraciones de la misma.

Comparar las diferencias entre los resultados obtenidos por los métodos usados en cada una de las marcas de alimentos para perros.

Al comparar los resultados obtenidos entre las técnicas empleadas para la detección y cuantificación de la Aflatoxina B1 presentes en las muestras

analizadas se logró determinar que, al momento del análisis, las muestras se encontraban libres de contaminación por micotoxinas de tipo Aflatoxinas B1. Por lo tanto los resultados quedan establecidos de la siguiente manera:

Tabla 6. Comparación de las técnicas de cromatografía de capa fina y cromatografía de gases empleadas en la detección de Aflatoxinas B1

Muestra	Alimento concentrado	Cromatografía de Capa Fina	Cromatografía de Gases	Presencia de Aflatoxinas B1
1	Purina DogChow	No hubo desplazamiento de ningún compuesto	No hubo transporte del analito	NEGATIVO
2	SuperCan Carne	No hubo desplazamiento de ningún compuesto	No hubo transporte del analito	NEGATIVO
3	Purina K-nina	No hubo desplazamiento de ningún compuesto	No hubo transporte del analito	NEGATIVO
4	ProPlan	No hubo desplazamiento de ningún	No hubo transporte del analito	NEGATIVO

		compuesto		
5	NutriCan	No hubo desplazamiento de ningún compuesto	No hubo transporte del analito	NEGATIVO
6	Perrarina	No hubo desplazamiento de ningún del analito	No hubo transporte del analito	NEGATIVO

Fuente: Chacón y Valero, 2018.

www.bdigital.ula.ve

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos en el estudio destinado a la detección de aflatoxinas B1 en seis muestras distintas de alimentos para perros que se expenden en la ciudad de Mérida; se permite inferir que tales muestras se encontraron libres de la aflatoxina B1. La tabla deja en evidencia que el resultado fue negativo, luego del tratamiento que se le realizó a las muestras y de las pruebas de cromatografía de capa fina y de gases, bajo la supervisión de expertos y del protocolo minucioso que se tuvo con respeto a las muestras y las técnicas, se llegó a la conclusión que las marcas de alimentos para perros examinadas no detectaron presencia de la micotoxina, lo que concuerda con la teoría que explica que, la prevención de este tipo de contaminación depende del tratamiento que se le da a los lotes de alimentos, es decir, estos lotes contaban con el depósito adecuado, libre de humedad y de contaminación cruzada con otros elementos, en este sentido, también se

puede establecer que los alimentos se encontraban, para el momento del análisis, en buen estado, referente a su tiempo de caducidad y temperatura. Por lo tanto, se puede decir que son productos que garantizan a los animales una alimentación segura, por lo tanto, se puede expender en el mercado como alimento seguro que brinda al can calidad en su alimentación.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Luego del estudio destinado a la detección de micotoxinas Aflatoxinas B1 en alimentos concentrados para perros que se expenden en la ciudad de Mérida, hecho a partir de análisis de laboratorio empleando las técnicas de Cromatografía de Capa Fina y Cromatografía de Gases, se pudo concluir lo siguiente:

- Se estableció el protocolo de extracción, purificación y determinación de aflatoxinas mediante el uso de las técnicas de cromatografía de capa fina y cromatografía de gases
- Entre las muestras de alimentos para perros que se expenden en la ciudad de Mérida, se determinó que todas las muestras se encontraban en buen estado para su consumo, libre de contaminantes como la micotoxina Aflatoxina B1.
- De acuerdo con el estudio realizado basándose en la técnica de cromatografía de capa fina, utilizando las seis muestras de alimentos objetos de estudio, entre las que destacan: Purina DogChow, SuperCan Carne, Purina K-nina, ProPlan, NutriCan y Perrarina, se obtuvo que no hubo recorrido del analito a estudiar sobre la placa, en este caso la Aflatoxina B1. Esto se verificó en cámara UV presentando ausencia de las bandas azul fluorescente indicativas de la Aflatoxinas B1 (BLUE)
- Con respecto a los resultados obtenidos en la técnica de cromatografía de gases, se logró confirmar la ausencia de la

Aflatoxina B1, ya que no hubo transporte del analito en el sistema empleado para esta técnica, lo que permitió inferir que en efecto las muestras estaban limpias de contaminantes como esta micotoxina.

- Las marcas de aliemntos para perros examinadas se encuentran en condiciones óptimas para ser vendidas en el mercado, por lo tanto son muestras limpias y libres de contaminantes, garantizando a los canes una alimentación de calidad. Además se pudo confirmar que cumplen con las medidas de higiene necesarias para mantener su calidad, como su depósito, humedad y composición.
- Las muestras examinadas arrojaron información de importancia para el mercado que expende estos productos ya que son productos de calidad y que no constituyen una amenaza para la salud de los canes que se alimentan con estas marcas de alimentos.

Recomendaciones.

- Es importante realizar un análisis más completo y exhaustivo de aflatoxinas en alimentos para perros que se expenden en la ciudad de Mérida, ya que son elaborados con materia prima como el maíz, siendo este es un alimento de primera necesidad el cual tiene varios derivados y a su vez sirve como materia prima para fabricar otros productos.
- Se recomienda un estudio en el que se incluyan otras técnicas de detección como ELISA para mayor seguridad de presencia o ausencia de aflatoxinas B1.
- Es necesario utilizar muestras control positivo para comparar los resultados negativos arrojados por las técnicas de laboratorio.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

1. DURAND, S. "los hongos", Mundo Científico, 1997, vol. 185, pp. 1080-1083.
2. RUIZ, J. "El asombroso reino de los hongos" Avance y perspectiva, 2001, vol.20, pp. 275-281.
3. Bogantes- Ledezma. 2004. Aflatoxina- SciELO Costa Rica .
4. FAO (1991). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Alimentación y nutrición. Manual para el control de calidad de los alimentos.
5. D Arrieta, P Arevalo, L Maria, C Gomez, G Molero. Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B1. Revista científica, FCV- LUZ, 2006 16(1)
6. LOPEZ, C. F y Col 1998 Evaluación de Micotoxinas en canes (*canis domesticus*) en la ciudad de Cochabamba - Bolivia, pp1-3
7. 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.

8. Almudema, Aitor, Lizaso, Jordi,2001. "Hongos y Micotoxinas". Madrid-España.pp.1-3.
9. ALEXOPOULUS, C.J. introductory micology, New York, Wiley, 1996. BIAL-ARISTEGUI, "el reino de los hongos", revista Iberoamericana de Micología, 2002, pp. 1-4.
10. Oscar M. Satos, importancia y efectos de la Aflatoxina en los seres humanos, universidad autónoma de Bucaramanga.
11. VAAMONDE, G. Micotoxinas. En: Toxicologia de los alimentos. 2da Ed. Editorial hemisferio sur. Argentina. P.p. 153-193.1996.
12. Davegowda, Gerbu, 1998. "Efectos de las Micotoxinas". Bangalore-India. Pp. 231-232.
13. Razzazi-Fazeli E. (2008) Micotoxinas en alimentos secos para perros, 8º Conferencia Internacional "Micotoxinas y hongo".
14. http://victimasde_dogchaw.blogs.com/victimas_de_dog_chow (www_victimasdedogchow_com) informacion tecnica sobre las aflatoxinas.
15. SAAVEDRA S.W., CRUZ P. J. facultad de ciencias veterinarias (UAGRM) Santa Cruz – Bolivia).
16. www.scielo.oreg.ve.efecto del alimento contaminado con aflatoxina B1.

17. Rojas Olga, wilchez flores. Determinación de aflatoxina en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, norte de Santander, revista de la facultad de Ciencias Básicas, vol. 7. Núm. 1, 2009.

18. Maria J. Vallejo, L. 2012. "determinacionde afaltoxina B1,B2, G1,G2, presente en harina de Maiz"

19. Oscar R. Perusia, Roberto Rodríguez, Micotoxicosis. Revista veterinaria de Perú, 12(2), 87-116,2016.

20. Jusmely Millán, Edgar A. Palacio. 1996. Determinación de Aflatoxina B1 en alimentos concentrados para ganado provenientes de finca de BAILADORES

21. Martínez P. Hadassa Y. 2013 el genero de Aspergillus y sus micotoxina en maíz. Revista mexicana de fitopatología PP. 126-146

22. Evelyn S. Rodríguez, Marcelo I. Vizcarra. 2012. "estudio de la presencia de Aflatoxina B1 en bocaditos a base de Maíz comercializados en la escuela fiscomisionales de las zonas del Guasmos en la ciudad de Guayaquil".

23. Cristian J. Vargas, Veronica P. Velásquez, 2013. "Propuesta de un método biológico para la detección de Aflatoxina en alimentos." Guayaquil-Ecuador.

24. Jose R. Urrego, Gonzalo Diaz, Aflatoxina : mecanismo de toxicidad en la etiología del cáncer hepático. Revista de la Facultad de Medicina 54 (2), 108-116, 2006.
25. Ximena B. Rodriguez. Efecto de micotoxinas presentes en el alimento de bovinos de leche y su impacto en la salud pública. Universidad cooperativa de Colombia.
26. Rojas, M., Mieres, A. 1986. Incidencia de contaminación con aflatoxina B1, en muestras e harina de m maíz precocidad en grano y pico de maíz. Trabajo de ascenso. Faculta de Cs de la salud. Universidad de Carabobo.
27. De Oliveira, PML Germano. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismo de toxicidade e seu envolvimento na etiología do cáncer hepático celular public Health. 1997.14. 30-39.
28. Bastardo, Hilda, Sofia, Sara, Nava. Efecto de la concentración de aflatoxina B1 y tiempo de Exposición sobre la condición hepática de la trucha Arcoíris INC, Jun. 2006, 31(6) 437-440.
29. Murcia H. Micotoxinas y aflatoxina B1, un problema en salud animal. Vol. 5- No .2, Julio. Diciembre 2010.
30. Martinez, M. , Gomez, V., Vargas, L. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. Biosalud vol.12 no.2 Manizales July/Dec.2013.

31. Ortiz, c. 1992. Mⁿual de procedimientos para el análisis de aflatoxinas Andsan Mexico.
32. Contreras, M. libia, Y. " Separación de colorantes y pigmentos vegetales por cromatografía en papel " Universidad de los Andes, Mérida. 2011.
33. Principios básicos de cromatografía. 445/19-2 Teoría de los platos cromatograficos.
34. <https://es.m.wikipedia.org/wiki/cromatografia-en-capa-fina>.
35. [Hhttps://es.m.wikipedia.org/wiki/cromatografia-de-gases](https://es.m.wikipedia.org/wiki/cromatografia-de-gases).
36. Reiss J. Effects of mycotoxins on higgher plants , algae, fungi and bacteria (1978). Vol.3. pp 118-144.
37. GITAEF. Grupo de Investigación en Toxicología Analítica y Estudios Farmacológicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela; (RETEL) revista en toxicología en línea.